



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA EM CURIMATÃ-PACU
PROCHILODUS ARGENTEUS (SPIX & AGASSIZ, 1829): INDUÇÃO À
TRIPLOIDIA**

Larissa Monteiro de Vasconcelos

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

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

Orientadora

Prof. Dr. Athiê Jorge Guerra Santos

Co-orientador

Recife

Fevereiro/ 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

V331m Vasconcelos, Larissa Monteiro de
Manipulação cromossômica em curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* (Spix e Agassiz, 1829) / Larissa Monteiro de Vasconcelos.
– 2017.
62 f. : il.

Orientadora: Maria Raquel Moura Coimbra.
Coorientador: Athiê Jorge Guerra Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Biotecnologia 2. Manipulação cromossômica 3. Aquicultura
I. Coimbra, Maria Raquel Moura, orient. II. Santos, Athiê Jorge Guerra, coorient. III. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA EM CURIMATÃ-PACU
PROCHILODUS ARGENTEUS (SPIX & AGASSIZ, 1829): INDUÇÃO À
TRIPLOIDIA**

Larissa Monteiro de Vasconcelos

Dissertação julgada adequada para obtenção do título
de mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.
Defendida e aprovada em 22/02/2017

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

(Orientadora)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr.^a. Sílvia Helena Lima Schwamborn

(Membro externo)

[Centro Acadêmico de Vitória]

[Universidade Federal de Pernambuco]

Prof. Dr.^a. Vilma Loreto da Silva

(Membro externo)

[Departamento de Genética]

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsas durante esses dois anos de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela infra-estrutura e suporte.

À todos das CODEVASFs de Itiúba, Betume e Bebedouro: Sérgio Marinho, Paulo Pantoja, Kley Lustosa, Marcos, Almir, Ana Helena, Iru, Rozzano e todos que de alguma forma possibilitaram a realização desse trabalho... muito obrigada!

À minha orientadora, Dr^a Raquel Coimbra, por ter me recebido em seu laboratório e por toda a confiança em mim depositada. Pelo exemplo, amizade, conselhos, conversas, e sobretudo, paciência ao longo desses anos. Obrigada pela eterna disponibilidade e, como não podia faltar, pelos dias lavando tanques e caixas d'água comigo!

Ao meu co-orientador, Dr. Athiê Guerra, pelo entusiasmo a cada experimento, pelas conversas e viagens à Codevasf e por tudo que me foi ensinado.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal da UFPE, em especial à Lucas Alexandre e aos professores Marcelo Guerra e Gustavo Souza.

Aos colegas de laboratório, Raquel, Patrícia, Sandra, Karine, e principalmente a Leandro, Manuela e Allyne, por toda a ajuda!

À todos os meus amigos que me apoiaram e ajudaram de alguma forma, e a família que Recife me deu: Léo, Lucas, Ludimila e Carol, por esse convívio durante o mestrado.

À Camilla Falconi, por todo companheirismo, incentivo e paciência, nessa jornada, nas passadas e nas que ainda virão. Te amo!

E por fim, mas que são a base de tudo: à toda a minha família, em especial aos meus pais e meu irmão, pelo amor incondicional e pelo eterno apoio e incentivo!

À todos que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho!

Resumo

A manipulação cromossômica apresenta-se como uma ferramenta promissora nos programas de criação de peixes e de conservação biológica. Dentre elas, a indução à triploidia apresenta benefícios que vão desde a otimização da produção à minimização dos impactos causados na natureza pelos escapes de peixes cultivados. Tais benefícios ocorrem, principalmente, em virtude da característica mais provável dos triploides: a esterilidade; que permite que o gasto energético antes empregado no desenvolvimento gonadal seja realocado para o crescimento somático, podendo resultar em taxas de crescimento mais elevadas e na melhoria da qualidade do filé. A curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*) é um peixe endêmico do rio São Francisco muito apreciado por sua carne, que tem sua abundância comprometida pelos barramentos das hidrelétricas dessa bacia, e que apresenta grande potencial para a aquicultura extensiva. Nesse trabalho foi avaliado a eficiência de choques térmicos quentes e frios para indução à triploidia em curimatã-pacu. Para os choques frios (0 – 4 °C), foram testadas aplicações aos 2,5 min, 5 min, 10 e 12 min pós-fertilização (mpf), com durações de 10, 15, 20 e 25 minutos. Os testes com choques quentes (39 e 41°C) foram aplicados também aos 5 mpf com duração de três minutos. Para cada um dos choques testados foi mantido um grupo controle para avaliação da qualidade gamética. Nenhuma eclosão foi observada para os choques quentes. Para os choques frios, embora as taxas de triploidização não tenham sido obtidas para os testes realizados aos 2,5 e 12 mpf, os choques aplicados aos 5 mpf com duração de 25 minutos produziram 100% de triploides. Para os demais choques com 20, 15 e 10 minutos de duração, as taxas de triploidização obtidas foram de 89,12, 76,92 e 63,33%, respectivamente. Os animais foram mantidos em aquários por um período de 21 dias, no qual à exceção das taxas de fertilização e sobrevivência inicial, peso e tamanho não foram significativas entre diploides e triploides. Esse é o segundo protocolo com 100% de produção de triploides para uma espécie nativa brasileira e, o primeiro a conseguir esse feito com o uso de choques térmicos.

Palavras chave: biotecnologia; manipulação cromossômica; aquicultura.

Abstract

Chromosomal set manipulation is a promising tool for breeding programs and biological conservation. Triploidy induction provides benefits that increase fish production and reduces the impact of escapes from fish farming on wild populations. These benefits are due to the most probable characteristics of triploid fish: sterility; because of its assumed ability to increase yield by conducting the energy required from gonadal development to somatic growth, leading to better growth rates and fillet quality. The curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*) is an endemic migratory fish species of the São Francisco River, which abundance have been compromising by the hydroelectric dams along the river and is known for its highly appreciated meat, with a great potential for extensive aquaculture. In this study, the efficiency of thermal shocks (cold and heat) to triploid production was evaluated. Cold shocks (0-4°C) were tested at 2.5 min, 5 min, 10 and 12 min postfertilization (mpf), lasting for 10, 15, 20 and 25 minutes. Heat shocks were also investigated at 5 mpf, lasting for three minutes at 39 and at 41°C. In each treatment, a control group was maintained to analyze egg quality. No hatches were observed for the heat shock treatments. For cold shock treatment applied at 5mpf and lasting for 25 minutes, 100% triploids were obtained. For others cold shock treatments also applied at 5mpf, but lasting for 20, 15 and 10 minutes, triploid rates were 89.12, 76.92 and 63.33%, respectively. Although fertilization rates were statistically different between diploid and triploid, survival, weigh and size were similar between triploids and control groups after being reared for 21 days in tanks. This is the second protocol for a Brazilian native species with 100% triploidization yield and the first one to achieve this by means of thermal shocks.

Key words: biotechnology, chromosomal manipulation, aquaculture.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1- . Processo de fecundação a) em indivíduos diploides; b) retenção do 2ª corpo polar para produção de organismos triploides. Imagem retirada de Moreira et al., 2014 (Adaptado de Triploid Salmon by hydrostatic pressure, AUMS – Coastal and Offshore Biologists).	17
Figura 2 - Figura 2. Exemplar de <i>Prochilodus argenteus</i> .	23
Figura 1 - Extrusão manual dos ovócitos (a) e do sêmen (b). Foto: Acervo LAGA/UFRPE.	40
Figura 2 - Recipientes com água dos tanques pré aquecida (A) e resfriada (B) conforme o tratamento aplicado. Foto: LAGA/UFRPE.	41
Figura 3 - Recipientes com água dos tanques pré aquecida (A) e resfriada (B) conforme o tratamento aplicado. Foto: LAGA/UFRPE.	42
Figura 4 - Ovos para contagem das taxas de eclosão	43
Figura 5 - Embriões com desenvolvimento normal contabilizados durante a análise das taxas de eclosão.	43
Figura 6 - Unidade experimental utilizada para os tratamentos T7-T12 e repetições do T2. Foto: LAGA/UFRPE.	47
Figura 7 - Hapas em tanques de alvenaria para engorda dos indivíduos oriundos dos T2 e seus controles.	48
Figura 8 - Conteúdo de DNA em diploides (acima) e triploides (abaixo) de <i>Prochilodus argenteus</i>	50
Esquema 1- Testes iniciais realizados para determinação do momento, duração e temperatura dos choques térmicos. Os dois primeiros algoritmos na frente da identificação do tratamento refere-se à nomenclatura estabelecida para cada teste. Logo, F1C significa controle da fêmea 1, F1T1 significa fêmea 1, tratamento 1; F2T2, fêmea 2, tratamento 2, e assim por diante.	45
Esquema 2 - Testes para indução à triploidia com choques aplicados em outros momentos e durações.	46
Esquema 3 - Esquema referente à fase final do experimento, com todas as repetições feitas para o T2.	47

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1 - Alguns trabalhos envolvendo a produção de triploides a partir do uso de choques térmicos.	18
Tabela 2- Choques frios aplicados em diferentes momentos e durações para a obtenção de triploides.	45
Tabela 3- Tabela com as repetições finais para o T2, com choques aplicados aos 5 m.p.f por 25 minutos.	46
Tabela 4 - Resultados obtidos a partir dos testes iniciais. Os dados biométricos estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão e as taxas de fecundação e triploidização em porcentagem.	49
Tabela 5 - Dados obtidos com as repetições do T2 (choque térmico frio aplicado aos 5mpf com 25 min de duração). Valores relacionados a taxa de fertilização e biometrias realizadas ao 21 ^a e 43 ^a dia	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1. Breve panorama da aquicultura mundial e brasileira	11
2.2 A oogênese e a formação dos corpos polares	13
2.3 Biotecnologia na aquicultura: manipulação cromossômica	14
2.4. Verificação da ploidia: aplicação da citometria de fluxo	20
2.5. Caracterização da espécie: <i>Prochilodus argenteus</i> (Characiformes: Prochilodontidae).....	21
3- OBJETIVOS	24
4. REFERÊNCIAS	25
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

1. INTRODUÇÃO

O processo de maturação sexual nos peixes pode acarretar algumas consequências indesejadas para aquicultura, como redução nas taxas de crescimento, aumento da mortalidade associada ao período reprodutivo e perda da qualidade do filé (FELIP et al., 1999; KJESBU et al., 1996).

Uma das ferramentas mais promissoras para burlar os problemas associados à reprodução é a produção de lotes estéreis através de manipulação cromossômica, sendo a triploidia o método mais eficiente para produção desses indivíduos em larga escala (XU et al., 2015). Além disso, a produção de triploides pode reduzir ou até mesmo eliminar as interações reprodutivas entre indivíduos selvagens e oriundos de escapes de cultivos, impedindo, inclusive, que escapes de espécies exóticas formem populações e se estabeleçam em ambiente natural (DONALDSON, 1996).

Os indivíduos triploides são caracterizados por possuírem um conjunto cromossômico a mais ($3n$) em relação aos diploides ($2n$). Por essa razão, são organismos estéreis e, embora alguns machos possam desenvolver gônadas, são incapazes de gerar proles viáveis (BENFEY, 1999).

A produção desses indivíduos consiste na retenção do segundo corpo polar, ao final da meiose II, através de choques térmicos, de pressão hidrostática ou até mesmo do uso de substâncias químicas (BENFEY, 2015). Os corpúsculos ou corpos polares são subprodutos da divisão meiótica do oócito, formados tipicamente pela citocinese assimétrica. Sendo por muitos anos, desde o seu descobrimento em gastrópodes, confundidos como fragmentos do ovo ou massas de vitelo expelidas (SCHMELER e WESSEL, 2011)

Outra maneira de obtenção de triploides é a partir do cruzamento de indivíduos tetraploides ($4n$) com indivíduos diploides ($2n$) (CHOURROUT et al. 1986; WEBER et al. 2014). A produção de tetraploides também é feita com o uso de choques físicos ou químicos, que devem ser aplicados de forma a inibir a primeira clivagem após a fertilização (MACLEAN e PENMAN, 1990).

Organismos triploides vem sendo produzidos em inúmeras espécies de interesse comercial, como carpas, bagres, tilápia, salmonídeos e bivalves, como ostras, mariscos, vieiras e abalones (BEAUMONT e HOARE, 2003).

Dentre as espécies nativas brasileiras candidatas a aplicação desta técnica está a *Prochilodus argenteus*, que é uma espécie endêmica da bacia do Rio São Francisco com

grande potencial aquícola (SANTOS, 1981; FURUYA et al., 1999; KOBERSTEIN et al., 2001; FURUYA 2001; SATO et al., 2003;), constituindo um importante recurso pesqueiro das regiões Norte e Nordeste juntamente com os demais do seu gênero, (IBAMA, 2005). No entanto, assim como as demais espécies migradoras, tem sua reprodução prejudicada pelos barramentos destinados à construção de reservatórios de usinas hidrelétricas (AGOSTINHO et al., 2007).

O presente trabalho teve propôs-se a desenvolver um protocolo para indução à triploidia na espécie *P. argenteus* através do uso de choques térmicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Breve panorama da aquicultura mundial e brasileira

A aquicultura é uma prática milenar originada na China, com o registro mais antigo da manutenção de peixes em cativeiro atribuído ao período da Dinastia Chou (1112 a.C - 221 a.C.) (NASH, 2010). No Brasil, a aquicultura tem seu início apenas nos anos 1930, com os estudos do pesquisador brasileiro Rodolpho Von Ihering, relacionados à reprodução de espécies nativas (CASTAGNOLLI, 2004). No entanto, apenas foi firmada como uma atividade econômica no cenário nacional da produção de alimentos a partir de 1990, com a consolidação das técnicas de reprodução natural e artificial de peixes em cativeiro (ANDRADE e YASUI, 2003).

De acordo com a Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), a aquicultura é uma das indústrias agrícolas de maior expansão no mundo, com a demanda mundial por pescado aumentando ao longo das últimas duas décadas (FAO, 2014). No período compreendido entre 2002 e 2012, a produção aquícola obteve crescimentos a uma taxa média de 6,1% ao ano no mundo inteiro (FAO, 2014). Os dados mais recentes dessa organização apontam que em 2014, pela primeira vez, a produção aquícola mundial ultrapassou a contribuição feita por capturas de pesca para o consumo direto. Nesse mesmo ano, a aquicultura foi responsável por 44,1% da produção mundial de peixes, incluindo a produção não relacionada a fins alimentícios (FAO, 2016).

Esse crescimento vem sendo impulsionado principalmente pelo crescimento demográfico e pela busca dos consumidores por uma dieta mais benéfica à saúde humana. Com a estagnação da pesca extrativa, que se encontra estabilizada desde 1990, foi imposta

à aquicultura a tarefa de aumentar a oferta dos produtos desse setor nos próximos anos (FAO, 2014; BRABO, 2016).

Nesse cenário de incremento mundial da aquicultura, o Brasil vem ganhando destaque e subindo posições entre os maiores produtores mundiais, passando da 32ª posição, em 1994, para a 14ª em 2014, com uma produção total de 514.5 mil toneladas por ano, das quais 474.3 mil toneladas são oriundas da piscicultura em águas interiores (FAO, 2016). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2015), a criação de peixes de água doce é responsável por 84% da produção da aquicultura brasileira. As expectativas do Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2016 (SOFIA) para o país são de que até 2025 as produções pesqueiras e aquícolas registrem um aumento de 104%, bem como uma elevação de 32,3% no consumo de peixe *per capita*, que atualmente encontra-se em 9,6 kg/ano, correspondendo a aproximadamente metade da média global e abaixo do nível recomendado pela Organização Mundial de Saúde, devendo subir para 12,7 kg.

Todo o potencial acima citado vem da vocação do país para essa atividade. O Brasil é detentor de um amplo território com áreas favoráveis a construção de tanques e açudes, 4,2 milhões de hectares de águas represadas em grandes reservatórios, 8.500 km de faixa costeira com potencial para maricultura, disponibilidade hídrica e clima favorável, possuindo um forte mercado doméstico com indústrias de rações estabelecidas e produção recorde de grãos (KUBITZA, 2015).

Além disso, o Brasil possui uma ampla diversidade de peixes, com mais de 2500 espécies nativas de água doce (BUCKUP, et al. 2007), correspondendo a aproximadamente 55% das espécies registradas para a Região Neotropical (REIS et al. 2003). Pelo menos 40 dessas espécies apresentam potencial para aquicultura em larga escala, o que representa 1,5% de suas espécies conhecidas (GODINHO, 2007). No entanto, a aquicultura brasileira é amplamente dominada por espécies exóticas tanto na piscicultura, com predominância da tilápia, responsável por 45,4% do total da produção de peixes em 2014, como na carcinicultura, com o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* sendo a terceira espécie mais produzida na aquicultura brasileira (IBGE, 2015).

Um dos principais entraves ao cultivo de espécies nativas é a falta de pacotes tecnológicos, que promovam um crescimento competitivo com espécies exóticas com manejos já bem estabelecidos, incluindo alimentação adequada, domínio da reprodução, alta sobrevivência e disponibilidade de sementes (KUBITZA, 2007). A biotecnologia apresenta diversas alternativas para superar tais obstáculos com ferramentas bastante promissoras, como a manipulação cromossômica (LAKRA e AYYAPPAN 2003).

2.2 A oogênese e a formação dos corpos polares

Nos teleósteos, a oogênese é um processo bastante complexo. Uma das suas peculiaridades é a contínua proliferação da oogonia em fêmeas sexualmente maduras, permitindo o recrutamento constante de oócitos quando estão em períodos férteis (PANDIAN 2011 e 2013; WOTTON e SMITH, 2014).

As oogônias se multiplicam por mitose e geram células pequenas, que se tornarão os oócitos primários. Na transição de oogônia para oócito, cada cromossomo se divide para produzir duas cromátides irmãs, unidas por um centrômero, e a célula entra na prófase I da meiose I, se tornando um oócito primário. A meiose é pausada no estágio de prófase I, e nesse momento ocorre o crescimento primário do oócito, em que o núcleo [nessa fase denominado de vesícula germinal (VG)] aumenta de tamanho. O oócito cresce bastante em volume, porém os ovários continuam ocupando apenas uma pequena porção do peso corpóreo do indivíduo. O crescimento do oócito continua até que este atinja um ponto crítico, a partir do qual a segunda fase do crescimento se inicia (PANDIAN 2011 e 2013; WOTTON e SMITH, 2014).

O crescimento secundário do oócito tem como processo dominante a vitelogênese. O crescimento nessa fase é medido em termos de massa seca, sendo um reflexo primário da acumulação de vitelo pelo oócito. Nessa fase, o tamanho dos ovários em relação a massa corpórea total dos peixes aumenta consideravelmente, podendo chegar, em algumas espécies, a 20% da massa corpórea. Esse crescimento representa um desvio massivo de recursos energéticos do crescimento somático para o crescimento gonadal. Ainda na fase de crescimento secundário (vitelogênese) é evidenciado a polarização do oócito ao longo de um eixo animal - vegetal, sendo o eixo animal indicado pelo desenvolvimento da micrópila, local de entrada do espermatozóide para a fecundação do óvulo (PANDIAN 2011 e 2013; WOTTON e SMITH, 2014).

A meiose I é retomada quando a vesícula germinal (GP) migra em direção ao pólo animal, posicionando-se próximo a micrópila, e se rompendo. Com a condensação dos cromossomos e formação do fuso, a meiose I finaliza com duas células desiguais formadas, um largo oócito, chamado oócito II, e o primeiro (e pequeno) corpo polar, que logo se degenera (PANDIAN 2011 e 2013; WOTTON e SMITH, 2014).

Entre o fim da meiose I e o início da meiose II, o oócito entra na fase de maturação, caracterizada: 1) pelo fim da meiose I e seguindo até a metáfase II, quando novamente é

suprimida; e 2) por um período de hidratação do oócito, no qual embora ocorra aumento de volume não há aumento da massa seca (PANDIAN 2011 e 2013; WOTTON e SMITH, 2014).

O processo de maturação do oócito tem fim quando este se torna ovulado no lúmen ovariano pronto para desova ou extrusão. A retomada da meiose só ocorre quando o oócito é fertilizado (ou ativado por algum estímulo alternativo, como por exemplo, o espermatozóide de uma outra espécie ou mudança na osmolaridade do meio), resultando na formação de duas células haploides, o óvulo e o segundo corpo polar (PANDIAN 2011 e 2013; WOTTON e SMITH, 2014). Dessa forma, a divisão meiótica produz um único gameta funcional haploide. A transição de óvulo para ovo é definida pela mudança do estado haploide do gameta para o estado diploide, resultante da fusão dos pró-núcleos do óvulo e espermatozóide (PANDIAN 2011 e 2013; WOTTON e SMITH, 2014).

2.3 Biotecnologia na aquicultura: manipulação cromossômica

A biotecnologia pode ser definida como a aplicação de técnicas científicas para modificar plantas, animais e microrganismos buscando a sua melhoria (WIECZOREK, 2003).

O avanço na biotecnologia tem fornecido as ferramentas necessárias para manipulação artificial de genes e cromossomos em organismos vivos (RASMUSSEN e MORRISSEY, 2007). Abordagens genéticas, envolvendo tanto a manipulação cromossômica como marcadores moleculares, passaram a contribuir crescentemente nos programas de criação de peixes e conservação biológica, extrapolando as fases experimentais e alcançando patamares que as permitem serem incluídas no âmbito da aquicultura aplicada (HULATA, 2001).

Os primeiros programas genéticos para peixes surgiram nos anos 1900, após o estabelecimento dos princípios básicos em genética e da genética quantitativa. No entanto, até a década de 1960 pouco esforço foi direcionado às pesquisas de melhoramento genético, uma vez que a prática da aquicultura ainda era realizada em pequena escala e os conhecimentos acerca dos aspectos genéticos dos peixes eram escassos (DUNHAM, 2011).

Ainda de acordo com Dunham (2011), as novas biotecnologias como reversão sexual e poliploidia começaram a ter um maior impacto na produção aquícola a partir do final da década de 80 e início da década de 90, não só aumentando as taxas de crescimento como também propiciando melhorias na qualidade do filé.

As técnicas de manipulação cromossômica como ginogênese, androgênese e poliploidia têm grande aplicação para aquicultura, variando desde a produção de lotes monosexo para eliminar as diferenças sexo-específicas relacionadas à maturação sexual e crescimento, à produção de peixes triploides para a obtenção de progênes estéreis (ARAI, 2001) diminuindo os impactos causados pelos escapes de organismos cultivados em ambientes naturais (COTTER et al., 2000; KOZFKAY et al., 2006).

A ginogênese (ou herança materna exclusiva), que ocorre de forma natural em algumas espécies de peixes, como na carpa prussiana, *Carassius gibelio*, e muitas espécies de poecílídeos (SCHARTL et al., 1995), permite a criação de lotes monosexo feminino a partir do desenvolvimento de progênes com herança genética estritamente materna.

Para esse propósito, os óvulos precisam ser fecundados por espermatozoides geneticamente inativos, mas biologicamente funcionais, para que a sua motilidade e capacidade de penetração sejam mantidas. Essa inativação pode ser feita por técnicas que vão desde o uso de raios gama, ao uso de substâncias químicas e irradiação com luz ultravioleta. Sendo essa última a mais comumente utilizada por não deixar resíduos contaminantes nas amostras e pela conveniência e facilidade de manuseio em relação às demais técnicas (THORGAARD 1986; GUO et al., 1993; LUTZ, 2001). Em seguida, choques térmicos são aplicados aos ovos para reestabelecer a diploidia, podendo ser aplicados ao final da meiose II, para reter a saída do segundo corpo polar (CP2), gerando indivíduos ginogenéticos meióticos, ou quando o zigoto haploide inicia a primeira clivagem mitótica, bloqueando a metáfase dessa primeira divisão após duplicação do genoma haploide, produzindo indivíduos ginogenéticos mitóticos (PURDOM 1983).

A produção de ginogenéticos já foi aplicada para espécies comercialmente importantes como salmonídeos (CHOURROUT, 1982; PURDOM et al., 1985), carpas (KOMEN et al., 1991), catfish (GOUDIE et al., 1995); tilápias (HUSSAIN et al., 1995a), linguado japonês (YAMAMOTO, 1999), linguado do Senegal (MOLINA-LÚZON et al., 2015), dentre outros.

Os mecanismos de realização da androgênese são semelhantes àqueles utilizados na produção de ginogenéticos mitóticos. A grande diferença consiste no fato de que para esta, o material genético materno é que deve ser inativado, sendo a radiação aplicada nos oócitos maduros. Após a fecundação, os choques térmicos ou de pressão são utilizados para interromper a mitose e gerar um indivíduo $2n$ com herança genética apenas paterna (LUTZ, 2001).

Em alguns países, organismos androgenéticos de algumas espécies já vem sendo utilizados em programas de reprodução, como a truta arco íris, no Japão e nos Estados Unidos, salmão amago, no Japão e a carpa comum, no Japão e nos Países Baixos (HULATA 2001).

O método mais popular de manipulação cromossômica é a produção de peixes com conjuntos cromossômicos além do esperado para sua espécie, os denominados poliploides (ARAI, 2001). Enquanto a maioria dos organismos tipicamente possuem dois conjuntos de cromossomos, e por isso recebem a classificação de diploides ($2n$), organismos poliploides são caracterizados por possuírem conjuntos cromossômicos extras além do seu número diploide, sendo a triploidia uma forma de poliploidia na qual a célula possui um conjunto a mais ($3n$) (LUTZ, 2001).

A ocorrência espontânea da triploidia em peixes já foi relatada para algumas espécies, como a truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) (AEGERTER e JALABERT, 2004), salmão prateado (DEVLIN et al., 2010), bagre europeu (*Silurus glanis*) (VÁRKONYI et al., 1998), enguia japonesa (*Anguilla japonica*) (NOMURA et al., 2013), tenca (*Tinca tinca*) (FLAJŠHANS et al., 1993) e o piauí *Leporinus elongatus* (MOLINA et al., 2007).

No entanto, essa forma de poliploidia também pode ser induzida. Para isso, duas formas de produção podem ser empregadas: uma delas é a produção de indivíduos tetraploides ($4n$) para que a partir do cruzamento com diploides originem organismos $3n$, sendo estes chamados de interplóides-triploides (MACLEAN E PENMAN, 1990). No entanto, esse é um método menos frequente de obtenção de triploides, uma vez que são poucas as espécies que apresentam adultos tetraploides viáveis e férteis (YOSHIKAWA et al., 2008).

A segunda forma de obter indivíduos triploides é a mais comum e também a utilizada neste trabalho. Nela, choques de temperatura, pressão hidrostática ou até mesmo substâncias químicas (ex. cafeína, citocalasina B), são aplicadas logo após a fecundação, impedindo a saída do segundo corpúsculo ou corpo polar (CP2) ao final da meiose II (Figura 1) (PIFERRER et al., 2009; TURAN e GURAGAC, 2014). Os mecanismos envolvidos na retenção do CP2 estão associados ao desarranjo dos aparatos do fuso meiótico ou dos filamentos de actina responsáveis por separar o pró-núcleo do ovo e o CP2, como sugerido por Mair (1993).

Os choques térmicos são um modo eficiente de produção de triploides por apresentarem baixo custo e facilidade de execução (RUSTIDJA, 1989). O sucesso da técnica é diretamente influenciado pelo momento após a fertilização em que o choque é aplicado, e

pela sua duração e à temperatura (quente ou fria) (FELIP et al. 2001). Geralmente, espécies de águas quentes são mais suscetíveis a choques térmicos frios, enquanto os choques térmicos quentes são mais eficazes em espécies de águas frias (CHOURROUT 1980). Alguns dos trabalhos utilizando choques térmicos já desenvolvidos para algumas espécies, bem com as taxas de triploidização obtidas estão reunidos na tabela 1.

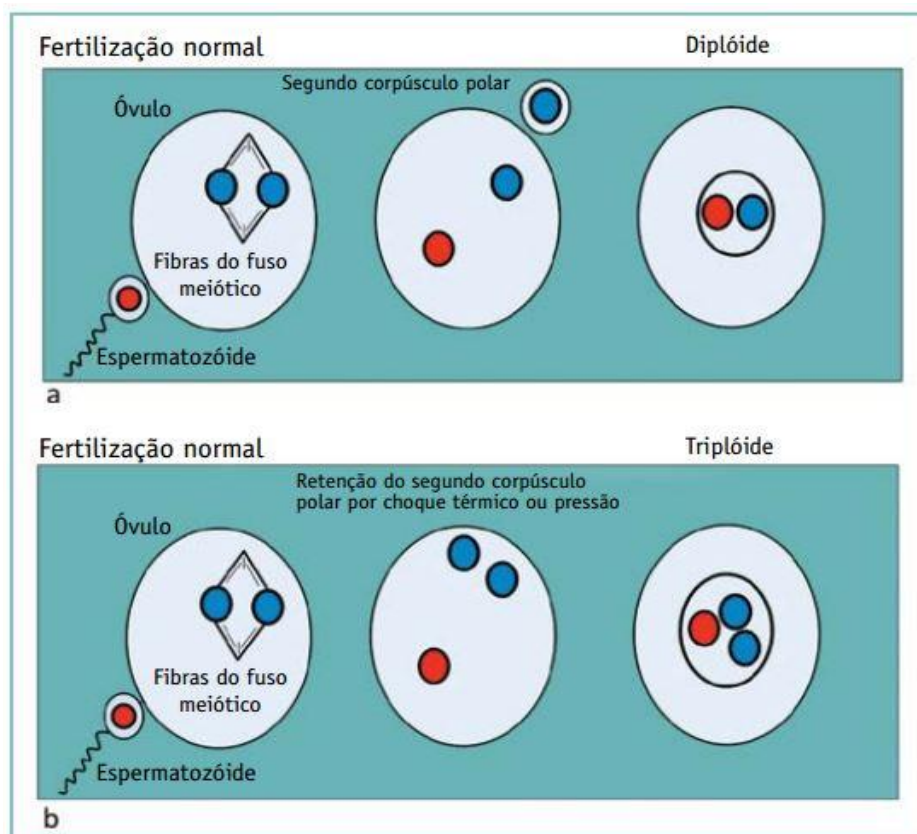


Figura 1. Processo de fecundação a) em indivíduos diploides; b) retenção do 2º corpo polar para produção de organismos triploides. Imagem retirada de Moreira et al., 2014 (Adaptado de Triploid Salmon by hydrostatic pressure, AUMS – Coastal and Offshore Biologists).

Tabela 1. Alguns trabalhos envolvendo a produção de triploides a partir do uso de choques térmicos.

Espécie	Tipo do choque	Taxa de triploidização	Referência
<i>Ictalurus punctatus</i>	frio	100%	Wolters et al., 1981
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Quente	58-84%	Utter et al., 1983
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Quente	100%	Solar et al., 1984
<i>Oreochromis niloticus</i>	Quente	100%	Don e Avtalion, 1986; Hussain et al., 1991
<i>Danio rerio</i>	frio	100%	Marian 1997
<i>Scophthalmus maximus</i>	frio	90%	Piferrer et al., 2000
<i>Perca fluviatilis</i>	quente	100%	Rougeot et al., 2003
<i>Astyanax altiparanae</i>	quente	~92%	Adamov et al., 2016
tilápia vermelha (híbrido)	frio	82,10%	Pradeep et al., 2013
<i>Rhamdia quellen</i>	frio	~97%	Da Silva et al., 2007
<i>Clarias gariepinus</i>	frio	55%	Hammed et al., 2010
<i>Takifugu niphobles</i>	frio	90%	Hamazaki et al. 2013
<i>Solea senegalensis</i>	frio	100%	Molina-Luzón et al., 2015
<i>Siniperca chuatsi</i>	quente	40%	Xu et al., 2015

A principal característica da condição triploide é a esterilidade, causada pelo pareamento cromossômico irregular durante a meiose, uma vez que os três conjuntos cromossômicos são incapazes de progredirem no evento de recombinação que ocorre na primeira divisão meiótica (GRIFFITHS et al., 2013). Como o processo de formação de gametas difere entre fêmeas e machos, estes últimos podem ainda apresentar algum desenvolvimento gonadal e até produzir espermatozoides aneuploides, que por sua vez não são capazes de gerar proles viáveis a partir do cruzamento com fêmeas diploides (BENFEY et al. 1986; UEDA, 1987).

Durante o período de maturação sexual, os indivíduos ficam mais propensos a níveis elevados de estresse, maior susceptibilidade a doenças e apresentam redução da qualidade da carne. Com a condição estéril, a triploidia pode contribuir com a melhoria da qualidade do filé, aumento da taxa de conversão alimentar, rendimento de carcaça, e permitindo que o gasto energético direcionado ao crescimento gonadal seja realocado para o crescimento somático, podendo gerar indivíduos com tamanhos maiores (PURDOM e LINCOLN, 1973; HUSSAIN et al., 1995b; MOREIRA et al., 2014; GOO et al., 2015). Além disso, permite o

confinamento genético dos animais criados em cativeiro, evitando a introgressão de indivíduos cultivados, incluindo não nativos, em populações naturais e também o estabelecimento de espécies não nativas (LIDDER e SONNINO, 2012).

No entanto, o desempenho dos triploides em relação aos diploides pode variar por diversos fatores, a exemplo da espécie analisada, do local de criação dos peixes, da temperatura e da idade dos indivíduos (WOLTERS, et al., 1982; DUNHAM e SMITHERMAN, 1987; QIN et al., 1998; FELIP et al., 1999; CAL et al., 2006).

De forma geral, alguns exemplos em que o crescimento de triploides se sobressai ao dos diploides são apontados por Florence e Harrison (2013), que identificaram taxas de crescimento superiores para triploides de *Clarias anguillarias*, assim como Lawson e Ishola (2010), que também verificaram esse mesmo padrão para *Clarias gariepinus*, apesar das baixas taxas de sobrevivência, e Bramick et al. (1995) para *Oreochromis niloticus*, dentre outros.

Os maiores esforços relacionados ao estudo dos desdobramentos da condição triploide estão, provavelmente, voltados ao salmão (BENFEY e SUTTERLIN, 1984a; BENFEY e SUTTERLIN, 1984b; CARTER et al., 1994; GALBREATH et al., 1995; LANGSTON et al., 2001; COTTER et al., 2002; COTTERELL et al., 2004; LANGSTON et al., 2001; ATKINS e BENFEY, 2008; LIJALAD et al., 2009), impelidos não só pelos problemas enfrentados com a maturação sexual desses animais (MAZEAUD et al., 1977), mas principalmente pela necessidade de confinamento genético dos indivíduos de cativeiro, devido às dezenas de milhares de escapes anuais de tanques para ambientes naturais (THORSTAD et al., 2008). A interação desses indivíduos com os de populações selvagens vem trazendo impactos genéticos, tendo como exemplo as alterações nas frequências alélicas de populações nativas de alguns rios da Noruega (GLOVER et al., 2012), com registros de níveis de introgressão de até 47% (GLOVER, et al., 2013), Irlanda (CLIFFORD et al., 1998), e América do Norte (BOURRET et al. 2011).

Nos Estados Unidos, onde a carpa capim é comumente utilizada para controle da vegetação, 19 estados o uso de carpas capim diploides, pelo fato de serem espécies invasoras, que quando estabelecidas no ambiente podem trazer prejuízo não só à fauna nativa, como também à vegetação aquática local. Cerca de 12 estados permitem ainda a reprodução e estoque desses indivíduos na sua forma diploide, no entanto, são mantidas em pequeno número e utilizadas em sistemas fechados, para fins de policultivo (PIPALOVÁ 2006). No Reino Unido, estoques monosexo feminino de truta arco íris são cultivados pelo seu crescimento superior aos diploides perto do período de maturação sexual (DUNHAM 2011).

Além do salmão do Atlântico comercializado no Canadá, da carpa capim nos Estados Unidos e da truta arco-íris no Reino Unido, peixes triploides de outras espécies são comercializados ao redor do mundo, como a truta marrom, comercializada na França e o salmão amago, salmão masu e o linguado japonês, comercializados no Japão (HULATA, 2001).

No Brasil, alguns estudos sobre triploidia vem sendo desenvolvidos para algumas espécies nativas e seus híbridos, como é o caso do tambaqui e do pacu, com taxas de triploidização de 29,4% e 11,8%, respectivamente, e do seu híbrido, o tambacu, 57,8% de triploides, todos detectados na fase juvenil e obtidos a partir do uso de choques térmicos quentes (SATO, 2015). Para outras espécies, como o lambari (*Astyanax altiparanae*), 92% de triploides foram produzidos também com o uso de choques térmicos quentes (ADAMOV et al., 2016; DO NASCIMENTO et al., 2017). Os trabalhos mais consolidados de triploidia em espécies nativas estão concentrados no jundiá, *Rhamdia quelen*, com protocolos que permitem a obtenção de 100% de triploides utilizando choques de pressão hidrostática (VOZZI et al., 2003; HUERGO e ZANIBONI-FILHO, 2006; DA SILVA et al., 2007; WEISS e ZANIBONI-FILHO, 2009, 2010). No entanto, à exceção da ostreicultura, esses trabalhos estão restritos ao âmbito acadêmico. Em Santa Catarina triploides da ostra *Crassostrea gigas* já vêm sendo comercializados por apresentarem maior resistência ao aquecimento da água durante o verão, possuírem mais carne e pelo fato de serem estéreis, inibindo seu estabelecimento como uma espécie invasora (MOREIRA et al., 2014).

2.4. Verificação da ploidia: aplicação da citometria de fluxo

A análise dos níveis de ploidia obtidos nas populações submetidas à manipulação cromossômica é de suma importância para a verificação do sucesso da metodologia empregada e validação do protocolo de indução à triploidia.

Vários métodos podem ser empregados para tal verificação, como cariotipagem, contagem das regiões organizadoras de nucléolos, (HARRELL et al., 1995), medida do diâmetro nuclear de eritrócitos (BENFEY, 1999), além do uso de marcadores moleculares polimórficos para realização de testes de paternidade, como os marcadores microssatélites, e da citometria de fluxo (SLABBERT et al., 2012).

A citometria de fluxo permite determinar a ploidia dos indivíduos pela análise do conteúdo de DNA das células (THORGAARD et al., 1982), sendo uma das metodologias mais seguras e aceitáveis para essa finalidade (HARRELL et al., 1998).

O citômetro de fluxo analisa as partículas em movimento em uma suspensão celular a partir da adição de um fluorocromo que se liga especificamente e estequiometricamente ao DNA em uma suspensão de núcleos, que podem ser isolados por cortes, pipetagens consecutivas, através da passagem por seringas de diferentes tamanhos, ou a partir do sangue dos animais. Esses fluorocromos, como o iodeto de propídeo (PI) que se intercala quantitativamente à dupla fita (LEPECQ e PAOLETTI, 1967) ou o 4, '6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que tem maior afinidade com as regiões ricas em A-T (PORTUGAL e WARING, 1988), são excitados por uma fonte de luz (UV ou laser) e, como princípio da análise, o material corado deve incorporar o corante e emitir uma fluorescência correspondente ao seu conteúdo de DNA (EWING et al., 1991; NUNEZ, 2001).

2.5. Caracterização da espécie: *Prochilodus argenteus* (Characiformes: Prochilodontidae)

A ordem Characiformes engloba cerca de 1700 espécies de peixes exclusivamente de água doce, divididos em 270 gêneros e 18 famílias, com representantes na África, sul da América do Norte (sul dos Estados Unidos e México), América Central e América do Sul (exceto sul da Argentina e o Chile) (NELSON, 2006; BUCKUP, 2007), sendo, juntamente com os Siluriformes, uma das ordens mais representativas da ictiofauna dulcícola neotropical (LOWE-McCONEELL, 1999). Muitos Characiformes apresentam grande importância comercial, como é o caso da família Prochilodontidae, uma das principais componentes da pesca de água doce da América do Sul, seja para finalidades comerciais ou de subsistência (CASTRO e VARI, 2004).

Os membros desta família são facilmente distinguíveis pela sua morfologia singular. Exceto na fase larval, possuem lábios grossos contendo duas fileiras de dentes relativamente pequenos, em formato falciforme ou de espátula, unidos aos lábios protáteis ao invés dos ossos da maxila, formando uma espécie de disco oral quando o maxilar se protraí (CASTRO e VARI, 2003 e 2004).

A família é composta por três gêneros: *Ichthyoelephas*, com apenas duas espécies, *Semaprochilodus*, com seis espécies conhecidas e o gênero *Prochilodus*, com treze espécies, considerado o mais abundante e disperso dentre a fauna neotropical dos rios sul americanos, dentre elas a *Prochilodus argenteus*, espécie alvo desse estudo (CASTRO e VARI, 2003 e 2004).

O gênero *Prochilodus* possui representantes nas grandes bacias sul-americanas, como as Bacias Amazônica, Araguaia-Tocantins, Prata e São Francisco (CASTRO e VARI, 2004; COSTA, 2006). Os integrantes desse gênero são considerados os mais conspícuos migradores de longa distância dentre os Prochilodontidae (DUQUE et al., 1998), com tais migrações associadas à alimentação e, principalmente, à reprodução (CASTRO e VARI, 2004). Possuem hábito alimentar detritívoro e desempenham um papel ecológico fundamental, participando da reciclagem de nutrientes através da pré-mineralização da matéria orgânica presente no lodo, tornando-a mais facilmente degradável pelos microrganismos ambientais (LOWE-McCONNEL, 1999), e atuando como condutores de energia e biomassa de áreas ricas em nutrientes para áreas mais pobres, especialmente quando migram de um sistema hídrico para outro (WINEMILLER AND JEPSEN, 1998; LUCAS e BARAS, 2001; CASTRO e VARI 2004).

Prochilodus argenteus (Spix e Agassiz 1829) (Figura 2) é um peixe endêmico da bacia do rio São Francisco, embora existam registros de introduções em vários rios do Nordeste brasileiro pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas - DNOCS (CASTRO e VARI, 2004). É popularmente conhecido como curimba, curimatã-pacu, xira, bambá ou zulega (CASTRO e VARI, 2003), sendo a espécie de maior tamanho da família, podendo atingir até 15 kg de peso corporal (SATO et al., 1996; GODINHO e GODINHO, 2003).

Quanto à sua reprodução, é um peixe reofílico que realiza longas migrações durante o período reprodutivo de novembro a janeiro, atrelado aos períodos de chuvas e altas temperaturas (FONTENELE, 1953). As fêmeas atingem a maturidade sexual mais tardiamente que os machos (BONCOMPAGNI-JR et al., 2013). Não apresentam cuidado parental e os ovos possuem características peculiares aos peixes migratórios e de desova total: são livres, demersais e cinzas. Durante a fase de hidratação, o diâmetro aumenta de $1.6 \pm 0.1\text{mm}$ para $3.1 \pm 0.2\text{mm}$ (SATO et al., 1996).

Historicamente na bacia do rio São Francisco, os peixes migratórios de porte elevado estão entre os mais valorizados para o comércio e pesca esportiva (PETRERE et al., 2002), sendo também presas importantes para espécies piscívoras (DUQUE et al. 1998). No entanto, os barramentos e construções de reservatórios ao longo dessa bacia, transformando trechos do rio em ambientes lênticos, possuem impacto negativo para a reprodução dessas espécies migradoras (AGOSTINHO et al., 2007), levando ao declínio dos estoques naturais.

Dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (2011) revelaram que o grupo dos curimatãs (*Prochilodus spp.*) apresentou o maior volume de desembarque da pesca

continental, com 28.643,0 toneladas, um valor quatro vezes maior do que as 7.143,1 toneladas obtidas com a sua produção.

No entanto, embora os valores da pesca extrativa sejam bastante elevados em relação a criação em cativeiro, sendo as regiões Norte e Nordeste as maiores produtoras (IBAMA, 2005), esse grupo apresenta um enorme potencial aquícola, devido a características como boa aceitação à ração (FURUYA, 2001), rápido crescimento em sistema intensivo de produção (FURUYA et al., 1999), rusticidade e alta prolificidade (SANTOS, 1981; KOBERSTEIN et al., 2001), excelentes candidatos ao policultivo e resposta positiva à indução hormonal (SATO et al., 2003).

Além disso por apresentar desova total, *P. argenteus* é um excelente candidato à manipulação cromossômica. Peixes que apresentam desova parcelada liberam poucos ovos de uma única vez, dificultando a produção de triploides em escala industrial.



Figura 2. Exemplar de *Prochilodus argenteus*.

3- OBJETIVOS

Geral

Gerar indivíduos triploides de *Prochilodus argenteus* através de manipulação cromossômica, elaborando uma metodologia viável para execução dessa técnica no contexto da aquicultura aplicada.

Específicos

- Gerar lotes triploides a partir do uso de choques térmicos para retenção do segundo corpo polar;
- Determinar a ploidia e a origem da herança genética herdada pelos embriões através de citometria de fluxo;
- Avaliar o crescimento dos triploides em relação aos diploides nos primeiros dias de vida.

4. REFERÊNCIAS

ADAMOV, N. S. M.; NASCIMENTO, N. V.; 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 the World Aquaculture Society**, 2016.

AEGERTER, S.; JALABERT, B. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 231, n. 1, p. 59-71, 2004.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: EDUEM: 501p., 2007.

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

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v.27, p. 166- 172, 2003.

ATKINS, M. E.; BENFEY, T. J. Effect of acclimation temperature on routine metabolic rate in triploid salmonids. **Comp. Biochem. Physiol.** v.149A, p.157-161, 2008. BEAUMONT, A.R.; HOARE, K. Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK, 2003.

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

BENFEY, Tillmann J. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. **Reviews in Aquaculture**, 2015.

BENFEY, T. J.; SOLAR, I. I.; DE JONG, G.; DONALDSON, E. M. Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.115, p.838–840, 1986.

BENFEY, T. J.; SUTTERLIN, A. M. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **J. Fish Biol.** v.24, p.333-338, 1984a.

- BENFEY, T. J.; SUTTERLIN, A. M. Oxygen utilization by triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v.42, n.69-73, 1984b..
- BONCOMPAGNI-JÚNIOR, O.; NORMANDO, F. T.; BRITO, M. F. G.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Pisces: Prochilodontidae) in São Francisco River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v.29, p.132-138, 2013.
- BOURRET, V; O'REILLY, P. T.; CARR, J. W, BERG PR, BERNATCHEZ L (2011) Temporal change in genetic integrity suggests loss of local adaptation in a wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) population following introgression by farmed escapees. **Heredity**, v.106, p.500–510, 2011.
- BRABO, Marcos Ferreira et al. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016.
- BRÄMICK, U.; PUCKHABER, B.; LANGHOLZ, H. J.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Testing of triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*) under tropical pond conditions. **Aquaculture**, v.137, n.1, p.343-353, 1995.
- BUCKUP, Paulo Andreas; MENEZES, Naércio Aquino; GHAZZI, Miriam Sant'Anna. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.
- CAL, R. M.; VIDAL, S.; GOMEZ, C.; ALVAREZ-BLAZQUEZ, B., MARTINEZ, P., PIFERRER, F. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v.251, p.99–108, 2006.
- CARTER, C. G.; McMARTHY, I .D.; HOULIHAN, D. F. Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. **Can. J. Zool.** v.72, p.609-617, 1994
- CASTAGNOLLI, N. Estado da arte da aquicultura brasileira. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSS, D.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt. 533 p, 2004.
- CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JUNIOR, C.J. (Org.). 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs,. p.65-70.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South American fish family prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.622, p.83-89, 2004.

CHOURROUT, D. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). **Reprod. Nutr. Dev.** v.20, p.727-733, 1980.

CHOURROUT, D. Gynogenesis caused by ultraviolet radiation of salmonid sperm. **J. Exp. Zool.**, v.223, p.175-181, 1982.

CHOURROUT, D.; CHEVASSUS, B.; KRIEG, F.; HAPPE, A.; BURGER, G.; RENARD, P. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—potential of tetraploid fish. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, n. 2, p. 193-206, 1986.

CLIFFORD, S. L.; MCGINNITY, P.; FERGUSON, A. Genetic changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations of northwest Irish rivers resulting from escapes of adult farm salmon. **Can J Fish Aquat Sci**, v.55, p.358–363, 1998.

COSTA, L. F. C. **Estudo da variação genética em *Prochilodus Costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na bacia do Rio São Francisco, na região de Três Marias (MG)**. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais. 73p. Universidade Federal de São Carlos, 2006.

COTTER, D.; O'DONOVAN, V.; O'MAOILEIDIGH, N.; ROGAN, G.; ROCHE, N.; WILKINS, N. P. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations. **Aquaculture**, v.186, p.61 75, 2000.

COTTERELL, S. P.; WARDLE, C. S. Endurance swimming of diploid and triploid Atlantic salmon. **J. Fish Biol.** v.65 (Suppl. A): 55-68, 2004.

DA SILVA, F. S. D.; MOREIRA, R. G.; OROZCO-ZAPATA, C. R.; HILSDORF, A. W. S. Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes)(Quoy & Gaimard, 1824). **Aquaculture**, v. 272, p. S110-S114, 2007.

DEVLIN, R. H., SAKHRANI, D., BIAGI, C. A., & EOM, K. W. Occurrence of incomplete paternal-chromosome retention in GH-transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure-shock-induced triploidy. **Aquaculture**, v. 304, n. 1, p. 66-78, 2010.

DON, J.; AVTALION, R. R. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, n. 2, p. 186-192, 1986.

DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1-4, p.381-392, 1996.

DO NASCIMENTO, N. F.; PEREIRA-SANTOS, M; PIVA, L. H.; MANZINI, B.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. N. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, 2017.

DUNHAM, R. A. **Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches**. Cabi, 2011.

DUNHAM, R. A.; SMITHERMAN, R. O.; GOODMAN, R. K. Comparison of mass selection, crossbreeding, and hybridization for improving growth of channel catfish. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 49, n. 4, p. 293-296, 1987.

DUQUE, A. N.; TAPHORN, D. C.; WINEMILLER, K. O. Ecology of the coporo, *Prochilodus mariae* (Characiformes, Prochilodontidae), and status of annual migrations in western Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, v.53, p.33-46, 1998.

EWING, R. R.; SCALET, C. G.; EVENSON, D. P. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 53, n. 3, p. 177-180, 1991.

FELIP, A.; PIFERRER, F.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Heredity**, v.83, n.4, p. 387-397, 1999.

FELIP, A.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; PIFERRER, F. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. **Genetica**, 111, p. 175– 195, 2001.

FLAJŠHANS, M.; KVASNIČKA, P.; RÁB, P. Genetic studies in tench (*Tinca tinca* L.): high incidence of spontaneous triploidy. **Aquaculture**, v. 110, n. 3-4, p. 243-248, 1993.

FLORENCE, O. N.; HARRISON, T. O. Optimization of Triploidy Induction and Growth Performance of *Clarias Anguillarias* (African Catfish) Using Cold Shock. **International Proceedings of Social and Behavioral Sciences**, v.1,n.1, p.33-40, 2013.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia da curimata pacu, “*Prochilodus argenteus*” Spix in Spix, Agassiz (Pisces: Characidae, Prochilodinae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 13, n. 1, p. 87-102, 1953.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**, Rome, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2016.

FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C.; FURUYA, W.M.; SOARES, C.M.; GALDIOLI, E.M. Efeitos da dieta sobre o desempenho de curimbatá. **Acta Scientiarum**, v.2, n.3, p.699-703, 1999.

FURUYA, W. M. Espécies nativas. In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.. P.; ZIMMERMANN, S. (Eds.). **Fundamentos da Moderna Aqüicultura**. ULBRA: Canoas, 83-90p. 2001.

GALBREATH, P. F.; THORGAARD, G. H. Saltwater performance of all-female triploid Atlantic salmon. **Aquaculture**, v.138, p.77-85, 1995.

GLOVER, K. A.; QUINTELA, M.; WENNEVIK, V.; BESNIER, F.; SØRVIK, A.; SKAALA, O. Three decades of farmed escapees in the wild: a spatio-temporal analysis of population genetic structure throughout Norway. **PLoS ONE** v.7: e43129, 2012.

GLOVER, K. A.; PERTOLDI, C.; BESNIER, F.; WENNEVIK, V.; KENT, M.; SKAALA, Ø. Atlantic salmon populations invaded by farmed escapees: quantifying genetic introgression with a Bayesian approach and SNPs. **BMC Genet**, v.14, p.74, 2013.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.351-360, 2007.

GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. Breve visão do São Francisco **In** Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais (H.P. Godinho & A.L. Godinho, eds.). PUC Minas, Belo Horizonte, p. 15-25, 2003.

GOO, I. B.; IM, J. H.; GIL, H. W.; LIM, S. G.; PARK, I. S. Comparison of cell and nuclear size difference between diploid and induced Triploid in marine medaka, *Oryzias dancena*. **Development & reproduction**, v.19, n.3, p.127, 2015.

GOUDIE, C. A.; KHAN, G.; PARKER, N. Gynogenesis and sex manipulation with evidence for female homogameity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). In: **Annual**

Progress Report 1 October–30 September. USFWS, Southeastern Fish Culture Laboratory, Marion, Alabama, 1985,

GUO, X.; HERSHBERGER, W. K.; COOPER, K.; CHEW, K. K. Artificial gynogenesis with ultravioleta light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Induction and survival. **Aquaculture**, v.113, p.201-214, 1993.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBARTET, W. M. An Introduction to Genetic Analysis. 10th edition. New York: W. H. Freeman; 2013.

HAMASAKI, M.; TAKEUCHI, Y.; MIYAKI, K.; YOSHIZAKI, G. Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment. **Marine biotechnology**, v.15, n.2, p133-144, 2013.

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

T HARRELL, R. M.; HEUKELEM, V. W.; KERBY, J. H. Triploid induction validation techniques: a comparison of karyotyping, flow cytometry, particle size analysis and staining nucleolar organizer regions. **Aquaculture**, v.137, p.159–160, 1995.

HARRELL, R. M.; HEUKELEM, V. W.; KERBY, J. H. A comparison of triploid induction validation techniques. **Progressive Fish-Culturist**, v.60, p.221–226, 1998.

HUERGO, G. M.; ZANIBONI-FILHO, E. Triploidy induction in Jundiá, *Rhamdia quelen*, through hydrostatic pressure shock. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 18, n. 4, p. 45-57, 2006.

HULATA, G. Genetics manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern Technologies. **Genetica**, v.111, p.155-173, 2001.

HUSSAIN, M. G.; CHATTERJI, A.; MCANDREW, B. J.; JOHNSTONE, R. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, n. 1, p. 6-12, 1991.

HUSSAIN, M. G.; McANDREW, B. J.; PENNAM, D. J. Phenotypic variation in meiotic and mitotic gynogenetic diploids of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v.26, p.205-212, 1995a.

HUSSAIN, M. G.; HUMAYUN, N. M.; RANDALL, C. F.; PENMAN, D. J.; KIME, D. BROMAGE, N.R.; MYERS, J. M.; McANDREW, J. Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 138, n. 1, p. 87-97, 1995b.

IBAMA **Estatística da pesca 2004/Brasil grandes regiões e unidades da Federação**. Brasília: IBAMA/MMA, 2005. 98 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ppm/default.asp?o=27&i=P>. Acesso em: 20 de setembro de 2015.

KJESBU, O. S.; KRYVI, H.; NORBERG, B. Oocyte size and structure in relation to blood plasma steroid hormones in individually monitored, spawning Atlantic cod. **Journal of Fish Biology**, v.49, n.6, p.1197-1215, 1996.

KOBERSTEIN, T.C.R.D; DURIGAN, J. G. Produção de larvas de Curimatã (*Prochilodus lineatus*) submetidas a diferentes densidades de estocagem e níveis de proteína bruta na dieta. *Rev. Ciên. Rur.* V.31, n.1, p.123-127, 2001.

KOMEN, J.; BONGERS, A. B.J.; RICHTER, C. J. J.; VAN MUISWINKEL, W.B.; HUISMAN, E. A. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids. **Aquaculture**, v.92, p.127-142, 1991.

KOZFKAY, J. R.; DILLON, J. C.; SCHILL, D. J. Routine use of sterile fish in salmonid sport fisheries: Are we there yet? **Fisheries**, v.31, p.392–401, 2006.

KUBITZA, F. Produção de pescado no mundo e a aquicultura. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.17, n.100, p.14-23, 2007.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v. 25, p. 10-23, ago. 2015.

LAKRA, W. S.; AYYAPPAN, S. Recent advances in biotechnology applications to aquaculture. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v.16, n.3, p.455-462, 2003.

LANGSTON, A. L.; JOHNSTONE, R.; ELLIS, A. E. The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic salmon, following injection of lipopolysaccharide. **Fish Shellfish Immunol**, v.11, p.333-345, 2001.

LAWSON, E. O.; ISHOLA, H. A. Effects of Cold Shock Treatment on the Survival of Fertilized Eggs and Growth Performance of the Larvae of African Mud Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Research Journal of Fisheries and Hydrobiology**, v.5, n.2, p.85-91, 2010.

LEPECQ, J. B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids - physical-chemical characterization. **Journal of Molecular Biology** v.27, n.1, p.87-&, 1967. LIDDER, P.; SONNINO, A. Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture. In: FRIEDMANN, T.; DUNLAP, J. C.; GOODWIN, S. F. **Advances in Genetics**, p. 88.

Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO. Elsevier, 209p, 2012.

LIJALAD, M.; POWELL, M. D. Effects of lower jaw deformity on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid and diploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Aquaculture** v.290, p.145-154, 2009.

LOWE-MCCONNELL, R.H. Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais. São Paulo: EDUSP, 1999. 534 p. LUCAS, M. C.; BARAS, E. *Migration of Freshwater Fishes.. Oxford: Blackwcll Science Ltd.* 420 p. 200 .

LUTZ, C. G. Practical Genetics for Aquaculture, Blackwell, London, 2001.

MACLEAN, N.; PENMAN, D. The application of gene manipulation to aquaculture. **Aquaculture**, v.85, n.1-4, p.1-20, 1990.

MAIR, G. C. Chromosome-set manipulation in tilapia – techniques, problems and prospects. **Aquaculture**, v.111, p.227-244, 1993.

MARIAN, L. A. Production of triploid transgenic zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton). **Indian Journal of Experimental Biology** v.35, p.1237-1242, 1997.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.106, p.201–212, 1977.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**: Brasil 2011. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013. 60p.

MOLINA-LUZÓN, M. J.; LÓPEZ, J. R.; ROBLES, F.; NAVAJAS,-PÉREZ, R.; RUIZREJÓN, C. HERRÁN, R. D.; NAVAS, J. I. Chromosomal manipulation in Senegale

sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and gynogenesis. **Journal of Applied Genetics**, v.56, n.1, p.77-84, 2015.

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

MOREIRA, H. L. M.; HILSDORF, W. S. A; MOREIRA, C. G. A.; FREITAS, R. T. F. O que é peixe triploide e o quanto esta técnica pode ser útil no melhoramento genético. **Panorama da aquicultura**, v.24, n.142, 2014.

NASH, C. **The history of aquaculture**. John Wiley & Sons, 2010.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley & Sons, 2006. 601p.

NOMURA, K.; TAKEDA, Y.; UNUMA, T.; MORISHIMA, K.; TANAKA, H; ARAI, K.; OHTA, H. Post-ovulatory oocyte aging induces spontaneous occurrence of polyploids and mosaics in artificial fertilization of Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Aquaculture**, v. 404, p. 15-21, 2013.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current issues in molecular biology**, v. 3, p. 67-70, 2001.

PANDIAN, T. J. **Sex determination in fish**. Science Publishers, 2011.

PANDIAN, Thavamani J. **Endocrine sex differentiation in fish**. CRC Press, 2013.

PETREIRE, M. JR.; AGOSTINHO, A. A.; OKADA, H. F.; JULIO, JR. Review of the fisheries in the Brazilian portion of the Paraná/Pantanal basin. In: I. G. Cowx. (ed). **Management and ecology of lake and reservoir fisheries**. Oxford, Fishing News Books. p. 123-143, 2002.

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J-C; FLAJŠHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v.293, n.3, p.125-156, 2009. PIFERRER, F.; CAL, R. M.; ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; SÁNCHEZ, L.; MARTINEZ, P. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. **Aquaculture**, v.188, n.1, p.79-90, 2000.

- PÍPALOVÁ, I. A review of grass carp use for aquatic weed control and its impact on water bodies. **Journal of Aquatic Plant Management**, v. 44, n. 1, p. 1-12, 2006.
- PORTUGAL, J.; WARING, M. J. Assignment of DNA-binding sites for 4',6- Diamidine-2-Phenylindole and Bisbenzimidazole (Hoechst-33258) - a Comparative footprinting study. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.949, n.2, p.158-168, 1988.
- PRADEEP, P. J.; SRIJAYA, T. C.; HASSAN, A.; CHATTERJI, A. K.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; JEFFS, A. PRADEEP, Optimal conditions for cold shock induction of triploidy in red tilapia. **Aquaculture international**, v. 22, n. 3, p. 1163- 1174, 2014.
- PURDOM, C. E. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. **Aquaculture**, v.33, p.287-300, 1983.
- PURDOM, C.E.; LINCOLN, R. F. Chromosome manipulation in fish. **Genetics and Mutagenesis of fish** (ed. by J.H.Schroder), p. 83-89. Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1973.
- PURDOM C. E; THOMPSON, D.; LOU, Y. D. Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase. **J. Fish Biol.**, v.27, p.73-79, 1985.
- QIN, J.G.; FAST, A.W.; AKO, H. Growout performance of diploid and triploid Chinese catfish *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, v.166, p.247–258, 1998.
- RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Biotechnology in aquaculture: transgenics and polyploidy. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.6, n.1, p.2-16, 2007.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (eds.). 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS. xi+729p.
- ROUGEOT, C.; MINET, L.; PRIGNON, C.; VANDERPLASSCHEN, A.; DETRY, B.; PASTORET, P. P.; MÉLARD, C. Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 2, p. 90-94, 2003.
- RUSTIDJA, S.. Artificial induced breeding and Triploidy in the Asian catfish (*Clarias batrachus* L.). **Ph.D. Thesis**, Institute Pertanian Bogor, 1989.
- SANTOS, E. **Peixes da água doce**: vida e costumes dos peixes do Brasil. Belo Horizonte: Itatiaia, 1981. 268 p.

SATO, L. S. Indução à triploidia no tambaqui *Colossoma macropomum*, pacu *Piaractus mesopotamicus* e o respectivo híbrido tambacu. 2015. 53p. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura.

SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; GODINHO, A. L; GODINHO, H. P. Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, v56, p.59-64, 1996.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N; GODINHO, H.P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. p. 275-290. In. **Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Ed. Godinho Hugo Pereira e Godinho Alexandre Lima, Editora PUCMinas, Belo Horizonte, 468 p, 2003.

SCHARTL, M.; WILDE, B.; SCHLUPP, I.; PARZEFALL, J. Evolutionary origin of a parthenoform, the Amazon molly *Poecilia formosa*, on the basis of a molecular genealogy. **Evolution**, v.49, p.827–835, 1995.

SCHMERLER, S.; WESSEL, G. M. Polar bodies—more a lack of understanding than a lack of respect. **Molecular reproduction and development**, v.78, n.1, p.3-8, 2011.

SLABBERT, R.; PRINS, N.; BRINK, D. A microsatellite panel for triploid verification in the abalone *Haliotis midae*. **African Journal of Marine Science**, v.32, n.2, p.259-264, 2010.

SOLAR, I. I.; DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. **Aquaculture**, v,42, n.1, p.57-67, 1984.

THORGAARD, G. H. Ploidy manipulation and performance. **Aquaculture** v.57, p.57–64, 1986.

THORGAARD, G. H.; RABINOVITCH, P. S.; SHEN, M. W.; GALL, G. A.; PROPP, J.; UTTER, F. M. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. **Aquaculture**, v.29, n.3-4, p.305-309, 1982.

THORSTAD, E. B. LEMING, I. A.; MCGINNITY, P.; SOTO, D.; WENNEVIK, V.; WHORISKEY, F. Incidence and impacts of escaped farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in nature. **NINA Special Report**, v. 36, p. 110, 2008.

TURAN, F.; GUCARAC, R. Induction of triploidy with caffeine treatment in the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Iran. J. Fish. Sci**, v. 13, n. 4, p. 1014-1020, 2014.

UEDA, T.; SAWADA, M.; KOBAYASHI, J. Cytogenetical characteristics of the embryos between diploid female and triploid male in rainbow trout. **Japanese Journal of Genetics**, v.62, p.461–465, 1987.

UTTER, F. M.; JOHNSON, O. W.; THORGAARD, G. H.; RABINOVITCH, P. S. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. **Aquaculture**, v.35, p.125-135, 1983.

VÁRKONYI, E.; BERCSÉANYI, M.; OZOUF-COSTAZ, C.; BILLARD, R. Chromosomal and morphological abnormalities caused by oocyte ageing in *Silurus glanis*. **Journal of fish biology**, v. 52, n. 5, p. 899-906, 1998.

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

WEBER, G. M.; HOSTUTTLE, M. A.; CLEVELAND, B. M.; LEEDS, T. D. Growth performance comparison of intercross-triploid, induced triploid, and diploid rainbow trout. **Aquaculture**, v. 433, p. 85-93, 2014.

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

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

WOLTERS, W. R.; LIBEY, G. S.; CHRISMAN, C. L. Induction of triploidy in channel catfish. **Transactions of the American Fisheries Society** v.110, p.310-312, 1981.

WOLTERS, W. R.; LIBEY, G. S.; CHRISMAN, C. L. Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 111, n. 1, p. 102-105, 1982.

WIECZOREK, Ania. Use of Biotechnology in Agriculture--Benefits and Risks. 2003. WINEMILLER, K. O; JEPSEN, D. B. Effects of seasonality and fish movement on tropical river food webs. **Journal of fish Biology**, v. 53, n. sA, p. 267-296, 1998.

WOOTTON, R. J.; SMITH, C. **Reproductive biology of teleost fishes**. John Wiley & Sons, 2014. XU, P.; ZENG, S.; WANG, P.; TANG, Q.; ZENG, L.; ZHOU, L.; LI, G. Triploidy

Induction by Heat Shock in Mandarin Fish *Siniperca chuatsi*. **The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 2015.

YAMAMOTO, E. The development of the techniques to induce all female offspring and clones in Japanese flounder. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v65, p.638-641, 1999.

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

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Manipulação Cromossômica em curimatã-pacu *Prochilodus argenteus*:
Indução à triploidia

INTRODUÇÃO

A família Prochilodontidae constitui um dos principais componentes da pesca de água doce da América do Sul, seja para finalidades comerciais ou de subsistência (CASTRO & VARI, 2004).

Dentre os integrantes dessa família, *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 é um peixe endêmico da bacia do rio São Francisco e popularmente conhecido como curimba, curimatã-pacu, xira, bambá ou zulega (CASTRO & VARI, 2004). Dentre os membros da sua família, essa é a espécie de maior tamanho, podendo pesar até 15 kg (SATO & GODINHO, 2003; SATO et al., 2003). Possui hábito alimentar detritívoro e no que diz respeito à sua reprodução, é um peixe reofílico, realizando migrações de longas distâncias, apresentando desova total e ovos livres (SATO & GODINHO, 2003; BONCOMPAGNI-JR et al., 2013).

Devido ao seu caráter migratório, essa espécie encontra-se negativamente impactada pelos barramentos e construções de reservatórios ao longo do rio São Francisco, uma vez que essas construções transformam ambientes lênticos em lóticos, prejudicando assim a reprodução não só da curimatã-pacu, como também de outros peixes de piracema (AGOSTINHO et al., 2007).

Trata-se de uma espécie com notório potencial aquícola, sendo excelente candidato ao policultivo por apresentar resposta positiva à indução hormonal (SATO et al., 2003), boa aceitação à ração (FURUYA, 2001), rápido crescimento em sistema intensivo de produção (FURUYA et al., 1999), rusticidade e alta prolificidade (SANTOS, 1981; KOBERSTEIN e DURIGAN, 2001). Devido às inúmeras espécies de peixes e aves predadoras que se alimentam desta espécie, pode ser considerada a “sardinha” dos rios brasileiros (BERNARDES e PÚBLIO, 2012). Contudo, assim como muitas outras espécies nativas, *P. argenteus* carece de um pacote tecnológico que otimize e incentive a sua produção.

Uma das questões chave na aquicultura é o controle da reprodução (BOBE & LABBÉ, 2010), principalmente relacionado a algumas consequências negativas trazidas pela fase de maturação sexual, como a redução no crescimento, na sobrevivência e na qualidade da carne (FELIP et al., 2001). A triploidia constitui uma alternativa para minimização desses impactos, através da produção de lotes estéreis.

Indivíduos triploides possuem um conjunto cromossômico a mais ($3n$), diferente da maioria dos vertebrados diploides que possuem apenas dois conjuntos ($2n$). A grande vantagem da triploidia está na esterilidade dos indivíduos, gerada pelo conjunto de cromossomos a mais, que restringe o pareamento cromossômico durante a meiose e leva a

divisões irregulares, resultando em crescimento gonadal reduzido e formação de gametas aneuploides (BASANT et al., 2004). Ainda por serem estéreis, os triploides podem apresentar maiores taxas de conversão alimentar e crescimento somático contínuo (GOO et al., 2015). Além disso, a triploidia pode ser aplicada na redução dos impactos dos escapes de animais de cativeiro em ambiente natural (LIDDER e SONNINO, 2012).

Embora a ocorrência de triploidia de forma natural tenha sido registrada para algumas espécies, o uso de choques térmicos, pressão hidrostática e substâncias químicas podem produzir indivíduos triploides através da retenção do segundo corpo polar ao final da meiose II (ROTTMAN et al., 1991). Organismos triploides podem ainda ser obtidos pelo cruzamento de indivíduos tetraploides com diploides (GUO et al., 1996), sendo um método mais laborioso, uma vez que os tetraploides que deveriam ser previamente produzidos possuem baixa viabilidade na maioria das vezes (ROTHBARD et al., 1997).

O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma metodologia de obtenção de triploides a partir de choque térmico em curimatã-pacu, um importante recurso pesqueiro do nordeste do Brasil com elevado potencial aquícola.

METODOLOGIA

2.1. Reprodutores utilizados

Os reprodutores de curimatã-pacu foram obtidos nas estações das Companhias de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba (CODEVASFs) em Betume (Sergipe) e Itiúba (Alagoas), durante o mês de maio de 2016 e no período de outubro a dezembro deste mesmo ano. Um total de 10 machos e 10 fêmeas foram utilizados tendo como critério de escolha, o formato do abdômen e papila urogenital vascularizada e dilatada no momento da captura - para as fêmeas; enquanto a seleção dos machos se deu mediante a liberação de sêmen, sob leve pressão abdominal.

As desovas foram induzidas utilizando extrato bruto de hipófise de carpa-comum (EBHC) dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) e aplicados em duas doses para as fêmeas, sendo a primeira dose de 0,5 mg/Kg⁻¹ e a segunda de 5 mg/kg⁻¹, aplicadas em um intervalo de doze horas. Para os machos uma dose única de 2,5 mg/kg⁻¹ foi aplicada no momento da aplicação da segunda dose das fêmeas. O tempo entre a injeção da segunda dose e a extrusão dos ovócitos foi contabilizado em horas-grau.

Os ovócitos foram extrusados manualmente e coletados em bacias secas (Figura 1a) para evitar que fossem ativados antes do momento desejado. As mesmas precauções também foram tomadas durante a coleta do sêmen (Figura 1b), evitando que entrasse em contato prévio com a água.

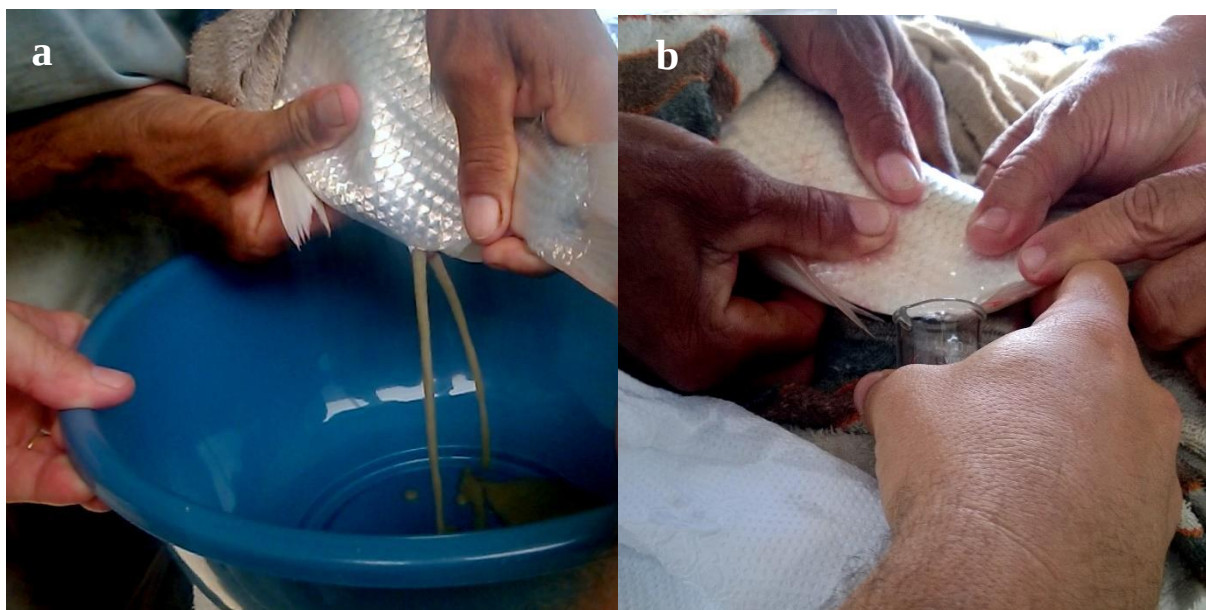


Figura 1. Extrusão manual dos ovócitos (a) e do sêmen (b). Foto: Acervo LAGA/UFRPE.

Para cada tratamento testado, 20 gramas de ovócitos (de uma mesma fêmea) foram misturados a 200 μ l de sêmen (de um único macho), homogeneizados e ativados com 500 ml da mesma água do tanque em que os reprodutores estavam sendo mantidos (aproximadamente 29°C). O momento da adição de água à mistura foi determinado como tempo 0 e a partir daí foram contabilizados os minutos referentes ao momento do choque de cada tratamento. Uma vez atingido o momento desejado, os ovos foram transferidos para outro recipiente com água dos tanques previamente aquecida ou resfriada (Figura 2), conforme o teste a ser realizado. Durante todo o tempo, os ovos foram gentilmente agitados para que não houvesse decantação. Em todos os testes realizados, um grupo foi estabelecido como controle para verificação da qualidade gamética, e não foi submetido aos choques térmicos. No entanto, esses grupos foram submetidos aos mesmos choques mecânicos (transferências de recipientes e movimentação mecânica) que seus respectivos tratamentos, para avaliar o impacto negativo que estes poderiam trazer.

Após os choques térmicos, os indivíduos foram transferidos para incubadoras de 120 L de fibra de vidro do tipo funil e com fluxo ascendente (Figura 3). A taxa de fertilização foi calculada cerca de 10 horas após a fecundação, e apenas os ovos e embriões que

apresentavam desenvolvimento normal (de acordo com NAKATANI et al., 2001) foram contabilizados como viáveis (Figuras 4 e 5). Para a estimativa dessa taxa, duas amostragens foram realizadas em cada incubadora e cerca de 100 ovos foram avaliados em estereoscópio binocular. Foi considerada a taxa de fertilização média entre cada amostragem, a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de fertilização} = \frac{n^{\text{a}} \text{ de ovos e embriões viáveis}}{n^{\text{a}} \text{ de ovos e embriões viáveis} + n^{\text{a}} \text{ de ovos e embriões inviáveis}} \times 100$$

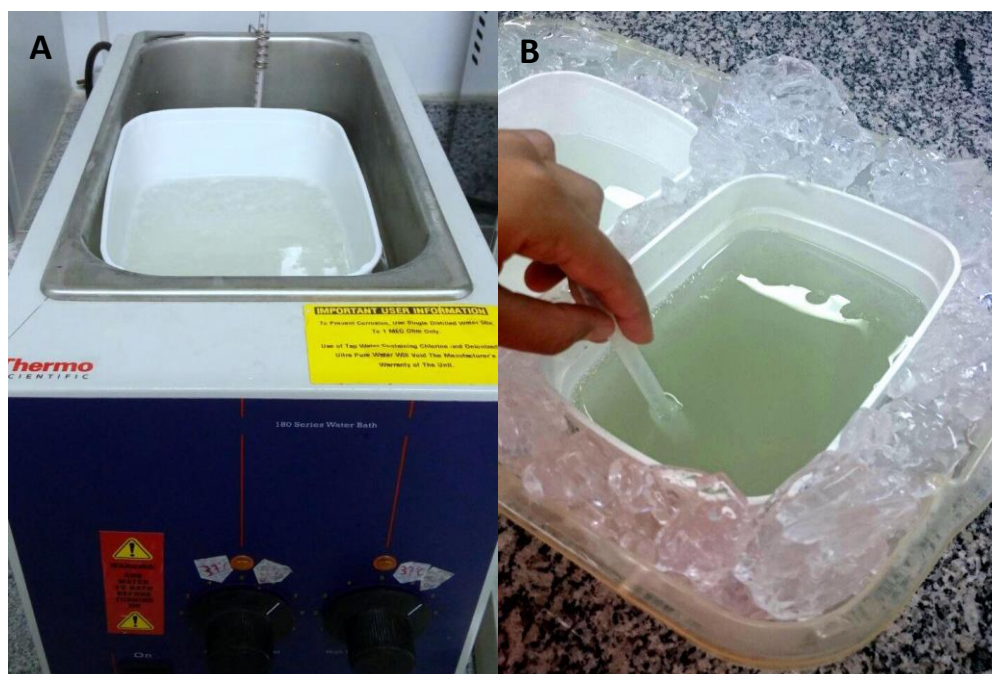


Figura 2. Recipientes com água dos tanques pré aquecida (A) e resfriada (B) conforme o tratamento aplicado. Foto: LAGA/UFRPE



Figura 3. Incubadoras de fibra de vidro com capacidade de 120 L utilizadas no estudo. Foto: LAGA/UFRPE



Figura 4. Ovos para contagem das taxas de eclosão



Foto: Larissa Vasconcelos



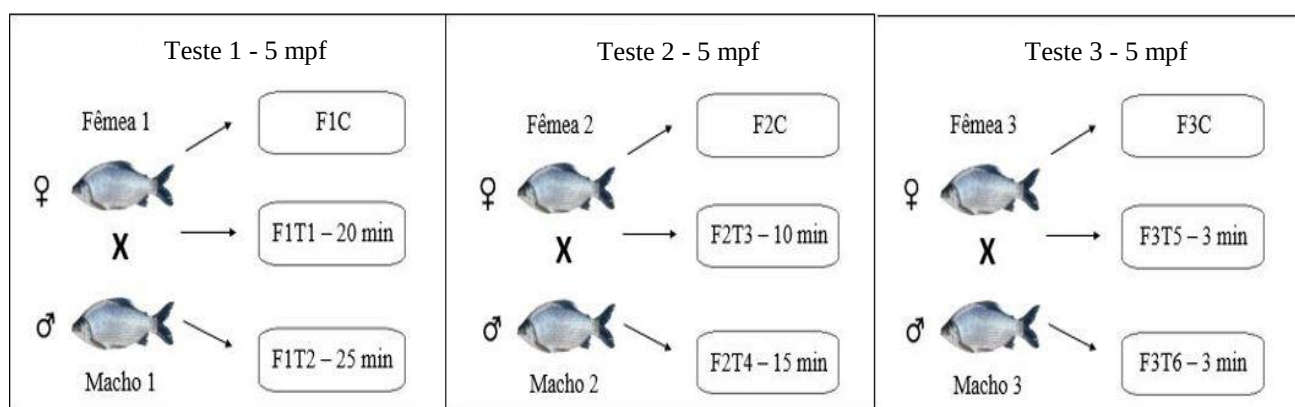
Figura 5. Embriões com desenvolvimento normal contabilizados durante a análise das taxas de eclosão.

2.2 Indução à triploidia

No intuito de elucidar o momento, a duração e a temperatura em que os choques térmicos deveriam ser aplicados, três testes foram realizados utilizando diferentes temperaturas quentes (39 e 41°C) e frias (0 a 4°C). Na ocasião, todos os choques foram aplicados aos cinco minutos pós-fertilização (mpf) com diferentes durações (Tabela 1; Esquema 1). Para cada teste, foi utilizado um único macho e uma única fêmea.

Tabela 1. Tratamentos inicialmente testados para obtenção de triploides de *P. argenteus* com choques térmicos aplicados aos cinco minutos pós fertilização)

Teste	Tratamento	Duração do choque (min)	Temperatura (°C)
Teste 1	Controle	-	-
	T1	20	0 - 4
	T2	25	0 - 4
Teste 2	Controle	-	-
	T3	10	0 - 4
	T4	15	0 - 4
Teste 3	Controle	-	-
	T5	3	39
	T6	3	41

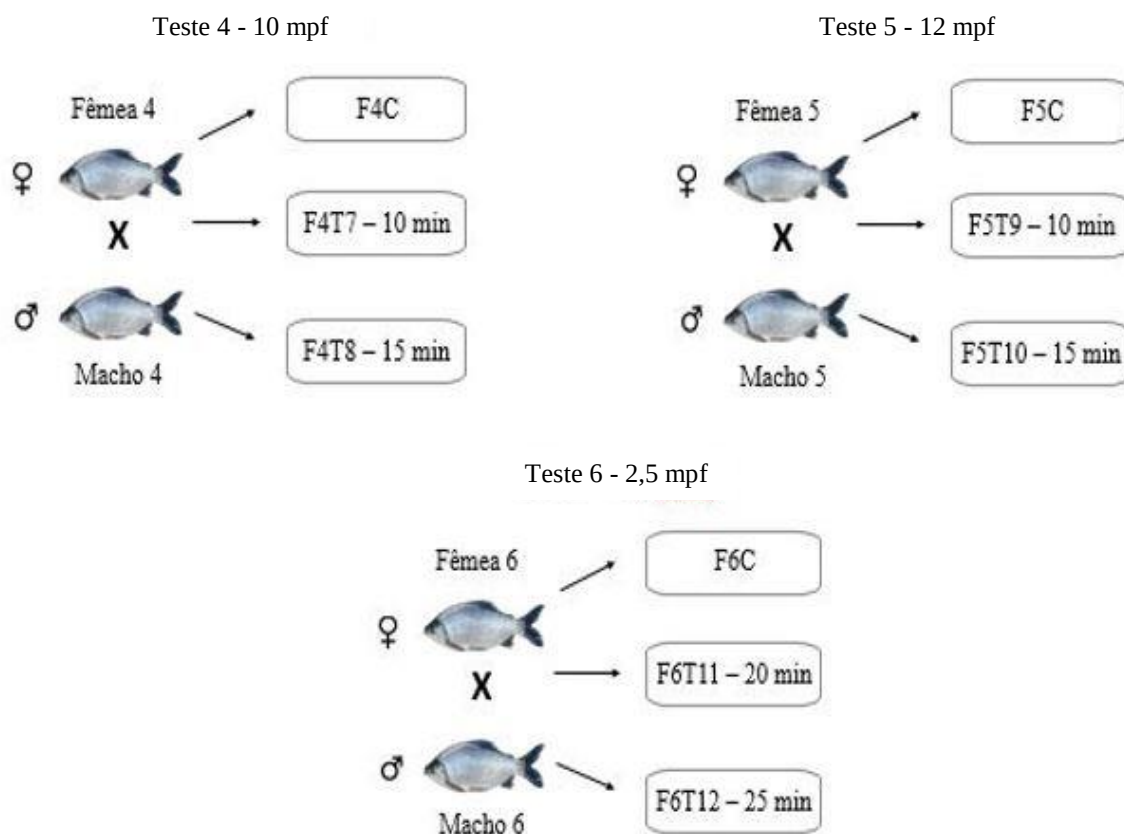


Esquema 1. Testes iniciais realizados para determinação do momento, duração e temperatura dos choques térmicos. Os dois primeiros algoritmos na frente da identificação do tratamento refere-se à nomenclatura estabelecida para cada teste. Logo, F1C significa controle da fêmea 1, F1T1 significa fêmea 1, tratamento 1; F2T2, fêmea 2, tratamento 2, e assim por diante.

Diante dos resultados obtidos a partir dos testes elencados na Tabela e Esquema 1, outras tentativas foram realizadas buscando o aprimoramento dos choques frios (0-4°C) em detrimento aos quentes (39 e 41°C). Esses testes podem ser vistos na Tabela e Esquema 2.

Tabela 2. Choques frios aplicados em diferentes momentos e durações para a obtenção de triploides.

Teste	Tratamento	Momento da aplicação do choque (minutos após a fertilização)	Duração do choque (min)	Temperatura (°C)
Teste 4	Controle	-	-	-
	T7	10 m.p.f	10	0 - 4
	T8	10 m.p.f	15	0 - 4
Teste 5	Controle	-	-	-
	T9	12 m.p.f	10	0 - 4
	T10	12 m.p.f	15	0 - 4
Teste 6	Controle	-	-	-
	T11	2,5 m.p.f	20	0 - 4
	T12	2,5 m.p.f	25	0 - 4

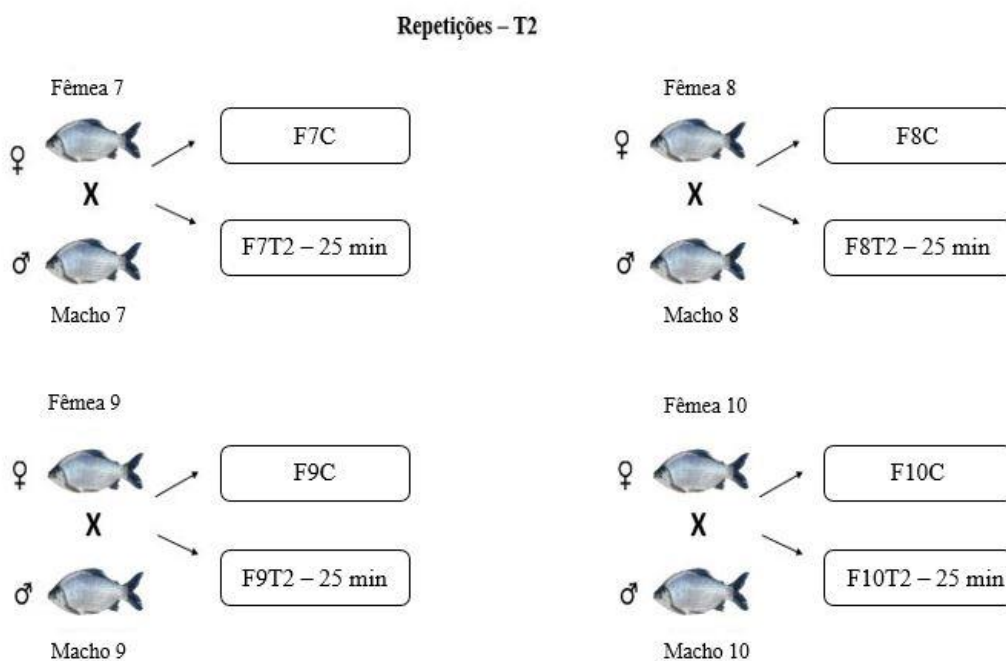


Esquema 2. Testes para indução à triploidia com choques aplicados em outros momentos e durações.

A fase final dos experimentos ficou restrita à repetição do tratamento T2, afim de comprovar a sua eficiência. Para cada réplica, assim como para os testes anteriores, foram utilizados diferentes casais de reprodutores, como pode ser visto na Tabela e Esquema 3.

Tabela 3. Tabela com as repetições finais para o T2, com choques aplicados aos 5 m.p.f por 25 minutos.

Teste	Grupo	Momento da aplicação do choque (minutos após a fertilização)	Duração do choque (min)	Temperatura (°C)
Repetição	Controle	-	-	-
	T2	5 m.p.f	25	0 - 4
Repetição	Controle	-	-	-
	T2	5 m.p.f	25	0 - 4
Repetição	Controle	-	-	-
	T2	5 m.p.f	25	0 - 4
Repetição	Controle	-	-	-
	T2	5 m.p.f	25	0 - 4



Esquema 3. Esquema referente à fase final do experimento, com todas as repetições feitas para o T2.

2.3. Manejo das larvas e alevinos

As larvas oriundas dos choques frios dos experimentos iniciais (F1T1 a F2T4 e seus controles) foram transferidas para viveiros escavados de 500 m³ ao terceiro dia após a eclosão, onde foram mantidas por cerca de três meses. Nos experimentos posteriores (F7T7-F12T12 e seus controles) e nas repetições de T2, 200 larvas de cada tratamento foram contadas e transferidas para aquários de aproximadamente 40L (Figura 6)

Os indivíduos permaneceram nos aquários por 21 dias e, então, sacrificados utilizando-se óleo de cravo, para que um fragmento de músculo pudesse ser removido sem contaminação estomacal, prejudicial às análises de ploidia.

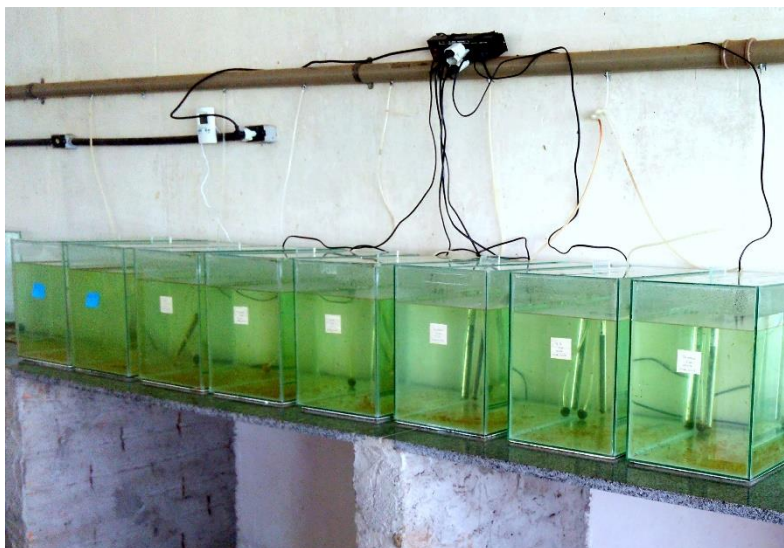


Figura 6. Unidade experimental utilizada para os tratamentos T7-T12 e repetições do T2. Foto: LAGA/UFRPE.

Até o 15º dia, as larvas foram alimentadas vezes ao dia: às 6, 10, 14 e 17 horas com ração comercial, na quantidade de 5% da biomassa presente no aquário, e cerca de 600 náuplios de artêmias recém-eclodidas/larvas, sendo estes divididos nas 4 refeições. Do 15ª dia em diante, embora a alimentação continuasse a mesma, o alimento passou a ser ofertado 3 vezes ao dia, às 9, 13 e 17 horas.

Os parâmetros de qualidade da água, tais como nitrito e amônia, foram monitorados a cada três dias. A temperatura da água foi mantida a 30° C com auxílio de termostatos e cada unidade experimental era sifonada diariamente para remoção dos dejetos. Até o 13º dia, a renovação de água consistiu em 40% do volume, sendo 20% pela manhã e 20% a tarde. A

partir do 14º dia, as trocas de água aumentaram para aproximadamente 70%, sendo 30% pela manhã e 40% à tarde.

Após 21 dias, 60 a 80 indivíduos de três grupos das repetições do tratamento T2, incluindo seus controles, foram remanejados para hapas de 1 x 1 x 10 m de comprimento, divididas em 2 tanques de 4x10 m e protegidas com tela anti-pássaro (Figura 7). Uma nova biometria foi conduzida nesses indivíduos no 43ª dia de vida, para monitoramento do crescimento.



Figura 7. Hapas em tanques de alvenaria para engorda dos indivíduos oriundos dos T2 e seus controles.

2.3. Análise de ploidia

Após três meses, 30 indivíduos de cada um dos tratamentos iniciais (T1-T4) tiveram um fragmento de músculo removido para análise de ploidia por citometria de fluxo. Nos experimentos subsequentes, 60 indivíduos de cada tratamento foram amostrados para a mesma finalidade.

Inicialmente, as amostras foram digeridas com o tampão WPB (1400 µl), coradas com iodeto de propídeo (20 µl) e posteriormente processadas no citômetro CyFLOW® Space, com auxílio do software FloMax. A cada três ou quatro corridas, amostras referentes ao grupo controle eram utilizadas como padrão interno diploide para comparação com os triploides e calibração do citômetro.

As análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, na Universidade Federal de Pernambuco.

2.4. Análise estatística

Os dados biométricos iniciais e finais foram apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão. Os de sobrevivência, por sua vez, em porcentagem em relação aos seus respectivos controles.

Para as análises de peso e comprimento, cada tratamento foi comparado com o seu respectivo controle no intuito de minimizar as diferenças de crescimento atreladas aos fatores parentais. As análises foram feitas com o software Statistica 8.0 (STATSOFT, 2008), com a normalidade dos dados calculada pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os grupos com apenas um tratamento e controle as diferenças foram calculadas com o teste t-student. Os testes foram considerados significativos quando seus resultados demonstraram um nível de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A extrusão dos ovócitos das fêmeas ocorreu em torno de 200 horas-grau após a aplicação da segunda dose hormonal.

Os resultados dos tratamentos iniciais para avaliação dos parâmetros relacionados à aplicação dos choques térmicos estão reunidos na tabela 4, à exceção daqueles realizados com choques quentes, em que não se observou nenhum ovo fecundado.

Tabela 4. Resultados obtidos a partir dos testes iniciais. Os dados biométricos estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão e as taxas de fecundação e triploidização em porcentagem

Grupo/ Tratamento	Taxa de fertilização	Taxa de triploidização	n ^a de indivíduos analisados	Biometria final	
				Peso (g)	C.P (cm)
F1C	63,57%	-	5	11,41 $\pm$ 1,44	19,18 $\pm$ 2,96
F1T1	29%	89,12	30	160 $\pm$ 13,1	20,92 $\pm$ 0,67
F1T2	40,83%	100%	30	62,18 $\pm$ 7,30	16,57 $\pm$ 0,79
Controle	33,94%	-	5	17,41 $\pm$ 1,14	24,36 $\pm$ 1,77
F2T3	22,8%	63,33%	30	128,36 $\pm$ 12,19	20,29 $\pm$ 0,63
F2T4	29,33%	76,92%	26	162,54 $\pm$ 12,91	21,27 $\pm$ 0,66

Para esses tratamentos iniciais (T1 - T4), embora as diferenças entre diploides e triploides relacionadas ao comprimento não sejam significativas ($p = 0,058$), quando

analisado o peso dos dois grupos (3n e 2n), os triploides apresentaram valores mais elevados ($p < 0,00$).

Nenhuma eclosão foi observada nos tratamentos T5 a T10, exceto para os seus controles. Para os tratamentos T11 e T12 não foi possível realizar as análises de ploidia, provavelmente por problemas relacionados ao armazenamento e ao processamento das amostras (corte para separação do estômago etc.), que quando submetidas à citometria de fluxo apresentaram uma alta quantidade de debris celulares. Para as demais amostras, a verificação da ploidia foi bem sucedida (Figura 8).

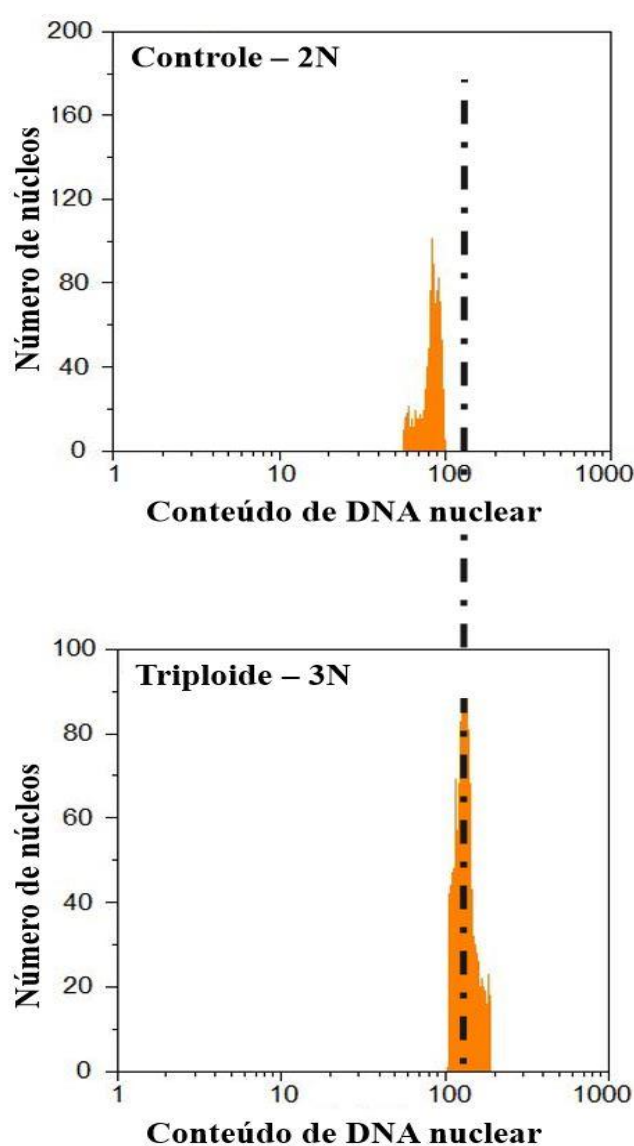


Figura 8. Conteúdo de DNA em diploides (acima) e triploides (abaixo) de *Prochilodus argenteus*

Os dados referentes à biometria dos indivíduos dos demais tratamentos, taxas de fertilização e sobrevivência e a quantidade de triploides produzidas por tratamento, podem ser vistos na tabela 5. Não houve diferença significativa para os pesos e comprimentos desses tratamentos e dos seus respectivos controles, diferente dos dados referentes à taxa de sobrevivência até o 21^a dia. É importante ressaltar que no cálculo de sobrevivência realizado ao 43^o dia foi contabilizado a partir do período em que os indivíduos foram transferidos para as hapas (21^a ao 43^a dia). Para essa segunda fase de sobrevivência, não houve diferenças significativas entre os tratamentos e seus grupos controle.

Embora não tenha sido realizado nenhum tipo de quantificação, pelo censo visual foi perceptível a presença de embriões e larvas deformadas em todos os tratamentos empregados. No entanto, nos tratamentos T11 e T12, cujos choques foram aplicados antes dos 5 m.p.f., foi observado um aumento no número de indivíduos que apresentaram esse quadro de deformidades, como embriões siameses, com deformação lateral na notocorda e encurtamento no corpo com algumas curvaturas. Como essas características inviabilizam o indivíduo, apenas os animais sadios foram levados adiante no experimento.

Ao todo, 12 tratamentos (incluindo choques quentes e frios) foram testados para obtenção de triploides. Dentre esses, o único tratamento em que a taxa de triploidização alcançou 100% foi o T2, com choques térmicos frios aplicados aos 5 minutos após a fertilização com duração de 25 minutos. Este resultado foi confirmado nas quatro repetições que se seguiram após a realização do teste inicial.

Tabela 5. Dados obtidos com as repetições do T2 (choque térmico frio aplicado aos 5mpf com 25 min de duração). Valores relacionados a taxa de fertilização e biometrias realizadas ao 21ª e 43ª dia

Grupo/ Tratamento	Taxa de fertilização	Biometria (21ª dia)			Biometria (43ª dia)		
		Peso (g)	C.P (cm)	Sobrevivência	Peso (g)	C.P (cm)	Sobrevivência
F15C	62,23%	0,13 ± 0,09	1,63 ± 0,38	94,50%	-	-	-
F15T2	15,69%	0,12 ± 0,10	1,61 ± 0,39	43%	-	-	-
F16C	78,19%	0,12 ± 0,10	1,65 ± 0,41	88,50%	7,14 ± 2,67	6,16 ± 7,68	80%
F16T2	36,11%	0,11 ± 0,08	1,62 ± 0,37	79%	7,32 ± ,01	6,02 ± 10,7	83%
F17C	71%	0,016 ± 0,09	1,80 ± 0,30	72,50%	9,41 ± 4,39	6,28 ± 14,63	87%
F17T2	45,97%	0,18 ± 0,12	1,82 ± 0,41	55%	8,98 ± 5,43	5,91 ± 17,63	92%
F18C	45%	0,15 ± 0,8	1,76 ± 0,43	83,50%	8,26 ± 2,71	6,35 ± 6,94	93%
F18T2	16,52%	0,17 ± 0,1	1,78 ± 0,39	75%	7,44 ± 2,45	6,04 ± 7,81	90%

DISCUSSÃO

Embora alguns autores defendam que a indução à triploidia através de choques térmicos não seja 100% eficiente (LUTZ, 2001; ALCÁNTAR-VÁZQUEZ et al., 2016), os resultados aqui obtidos comprovaram que choques aplicados aos 5 minutos pós-fertilização com duração de 25 minutos se mostraram eficazes na produção de lotes completamente triploides para essa espécie. Rougeot et al. (2003) encontraram resultados semelhantes para a *Perca fluviatilis*, utilizando choques com a mesma duração e aplicados no mesmo momento que os choques aqui utilizados. Outras espécies também já alcançaram 100% de triploidização com choques térmicos aplicados em outros momentos e durações, como o bagre americano (*Ictalurus punctatus*) (WOLTERS et al., 1982) e a tilápia azul *Oreochromis aureus* (DON e AVTALION, 1986; HUSSAIN et al. 1991).

Além disso, o uso de choques térmicos também é uma alternativa mais viável quando uma grande quantidade de ovos precisa ser manipulada ao mesmo tempo, por ser mais barato em relação às outras metodologias, como os sistemas que fazem uso de pressão hidrostática, por exemplo (THORGAARD, 1986; IHSEN et al., 1990; MALISON et al., 1993).

O momento da aplicação dos choques é um dos principais parâmetros para obtenção de altas porcentagens de triploides (FELIP et al., 1997), sendo específicos para cada espécie (PIFERRER et al., 2000) em virtude das variações no desenvolvimento embrionário de cada uma delas. Há espécies em que os choques térmicos podem durar horas, como é o caso do bacalhau do atlântico *Gadus morhua*, cujo choque térmico é aplicado aos 40 mpf com duração de duas horas (KETTUNEN et al, 2004), e do peixe-rei *Odontesthes bonariensis* com choques de 80 minutos de duração aplicados aos seis minutos após fertilização (STRUSSMANN et al., 1993).

Nesse trabalho, os fatores que culminaram nas baixas taxas de fertilização e elevados números de deformações encontrados em alguns tratamentos não foram investigados. Porém, o estabelecimento de um grupo controle permitiu comparar os resultados encontrados para os indivíduos que foram submetidos aos choques e os que não foram e, por consequência, inferir se tais ocorrências estavam associadas à qualidade gamética ou aos tratamentos utilizados.

As baixas taxas de eclosão encontradas no segundo teste (T3 e T4) estão provavelmente associadas à má qualidade gamética, uma vez que tais desovas foram conduzidas fora do período reprodutivo da espécie, e o baixo desempenho também esteve presente no grupo controle. No entanto, para os demais tratamentos, esses acontecimentos

provavelmente estão relacionados aos efeitos dos choques frios, já que os grupos controles apresentaram resultados satisfatórios.

As deformidades dos embriões observadas nesse estudo foram atribuídas ao uso dos choques térmicos e não à condição triploide em si, uma vez que tais deformidades foram apresentadas tanto em indivíduos diploides (cujo tempo de choque não foi suficiente para induzir a triploidia) quanto em triploides.

Os choques térmicos por si só apresentam efeitos colaterais atrelados à sua prática, como o agrupamento de núcleos e formação de fusos polipolares. Essas alterações geram embriões com deformações que inviabilizam o indivíduo (KOBAYASHI, 1997). Em estudos com zebrafish, os choques térmicos para destruição dos microtúbulos do citoplasma do ovo para retenção do CP2 também geraram indivíduos inviáveis, uma vez que esses filamentos são responsáveis por carrear partículas e fatores citoplasmáticos. Esses fatores regulam a diferenciação celular dos blastômeros dos hemisférios vegetal para animal (ou vice-versa) dos embriões durante a formação do blastodisco, gerando indivíduos com anomalias dorsais (JESUTHASAN e STRÄHLE, 1996). Para o peixe japonês *Carassius auratus*, choques de pressão e térmicos em ovos fertilizados acarretaram em anomalias no desenvolvimento como formação de um blastodisco delgado, atraso na epibolia e deficiência de estruturas dorso-anteriores (YAMAHA et al., 2002).

No entanto, o aumento no número de embriões com desenvolvimento anormal nos tratamentos T11 e T12, cuja aplicação do choque se deu em um curto intervalo de tempo após a fertilização, também foi relatado em outras espécies. Experimentos de triploidia conduzidos em dojôs *Misgurnus anguillicaudatus* (MORISHIMA et al., 2011) e lambaris *Astyanax altiparanae* (ADAMOV et al., 2016) demonstraram que quando os choques térmicos são aplicados muito cedo no desenvolvimento provavelmente levam à destruição do núcleo materno, gerando indivíduos haploides com características da chamada síndrome do haploidismo, como corpo mais curto e curvado, cavidade pericardial inchada e olhos não desenvolvidos (CHERFAS, 1981). Assumindo que a curimatã-pacu segue a cronologia do desenvolvimento embrionário de *Prochilodus brevis* descrita por Alves et al. (2016) e de outros Prochilodontidae, relatada por Ninhaus-Silveira et al. (2006), espera-se que até o 15^a minuto pós-fecundação os ovos de *P. argenteus* estejam no estágio de zigoto, com o corpo polar sendo expelido no 14^a minuto após a fertilização, como indicado por Freire-Brasil (2001) para *Prochilodus brevis*. E assim, é possível especular que os tratamentos T11 e T12 desse trabalho tenham inativado o material genético materno dos ovos, gerando condições

de haploidismo, uma vez que os choques foram aplicados muito precocemente. Entretanto, nenhuma análise de ploidia foi conduzida para os embriões deformados.

Ainda que a formação de indivíduos androgenéticos haploides a partir da aplicação de choques precoces não explique totalmente as deformações encontradas nesses tratamentos, outros autores apontam outras consequências relacionadas aos choques aplicados nos momentos iniciais do desenvolvimento do indivíduo. Em diferentes espécies de linguado, submetidos à choques térmicos, que alterações no padrão de crescimento simétrico dos blastômeros, que são formados por sucessivas divisões mitóticas no início da embriogênese, podem ser consideradas um risco para o embrião (AVERY e BROWN, 2005). De acordo com Kjørsvik et al. (1990), danos ao crescimento dos blastômeros são mais prejudiciais do que deformações em uma ou duas células em momentos posteriores do desenvolvimento.

Todavia, não só os choques precoces apresentaram inviabilidade dos indivíduos, pois os choques tardios (T7 à T10) também apresentaram resultados insatisfatórios, nos quais nenhum indivíduo eclodiu ou sequer foi observado formação das larvas. Os efeitos negativos dos choques aplicados em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário são corroborados por outros autores, como Zhang e Onozato (2004), que demonstraram que os ovos de trutas arco-íris submetidos a choques de pressão hidrostática ou térmico em estágios mais avançados (segunda divisão mitótica) tiveram a formação de dois fusos monopares e a divisão abortada, não permitindo o desenvolvimento dos indivíduos. Vallin e Nissling (1998), em estudos com salmonídeos, também apontam que as anormalidades de crescimento em estágios embrionários mais tardios são mais severas do que aquelas apresentadas no começo do desenvolvimento, uma vez que nessa fase inicial alguns graus de deformidade podem ser reversíveis, mas em fases mais adiantadas há menos tempo para recuperação antes que os tecidos e órgãos vitais comecem a se desenvolver.

Além dos fatores relacionados ao desenvolvimento embrionário, a qualidade do oócito e o seu grau de maturação no momento da extrusão também podem afetar os resultados dos choques (LEVANDUSKI et al., 1990; DÍAZ et al., 1993). Nesse aspecto, é importante ressaltar o cuidado empenhado tanto na observação do momento ideal para extrusar os ovócitos da fêmea quanto no tempo entre a extrusão e a mistura dos ovócitos com sêmen, uma vez que quando a ovulação é induzida por meio de hormônios, os ovócitos de *P. argenteus* perdem a sua viabilidade rapidamente, diminuindo não só a fecundidade, como aumentando a deformidade nas larvas (RIZZO et al., 2003).

A janela de tempo para aplicação do choque varia ainda dentre os indivíduos de um mesmo tratamento. Deve-se observar a possibilidade de ocorrência de ovos em diferentes estágios de desenvolvimento, mesmo que sob a ótica de um curto espaço de tempo. Afinal, a ativação dos óvulos pode não ter acontecido coletivamente, de forma que os pontos que entraram em contato com a água primeiro podem ter sido fecundados antes dos demais, e, até mesmo o breve intervalo de tempo em que a micrópila permaneceu aberta para entrada do espermatozoide e o momento em que a fecundação ocorreu, provavelmente não foram simultâneos para todos os ovos, explicando assim a ocorrência de diploides e triploides dentro do mesmo tratamento. Isso significa que há diversos aspectos críticos relacionados ao tempo que podem variar em função da especificidade da cronologia dos eventos celulares também em cada indivíduo.

À exceção do primeiro teste, não houve diferenças significativas entre tamanho e peso de diploides e triploides nesse estudo. Acredita-se que essas diferenças encontradas estejam bem mais relacionadas às densidades em que os indivíduos se encontravam do que ao estado $3n$. Como não foi feito monitoramento da mortalidade enquanto esses indivíduos estavam nos viveiros, as densidades no momento da despesca estavam bem diferentes. Essa diferença por si só permite o maior crescimento dos animais, como mostrado por Koberstein e Durigan (2001) em que indivíduos de *Prochilodus argenteus* cultivados em densidades de estocagem mais baixas apresentaram crescimento superior àqueles cultivados em densidades mais elevadas.

De uma forma geral, afirmar categoricamente sobre o crescimento de triploides em relação à diploides deve ser bastante cauteloso, posto que diversos fatores têm influência sobre isso. Para o bagre americano *Ictalurus punctatus*, os triploides apresentaram performances superiores aos diploides em tanques experimentais (WOLTERS, et al., 1982), mas em condições comerciais, como viveiros escavados, apresentaram taxas de crescimento inferiores (DUNHAM e SMITHERMAN, 1987). Os triploides do bagre *Clarias fuscus* apresentaram tamanho e taxas de crescimento maiores quando cultivado em temperaturas acima de 25 °C (QIN et al., 1998).

Há um consenso de que a disparidade de performances entre diploides e triploides se iniciam perto do período de maturação final do oócito (ARAI, 2001), por ser a fase de maior crescimento gonadal e desvio energético do crescimento somático. Até os dois primeiros anos de vida, indivíduos diploides e triploides do robalo europeu *Dicentrarchus labrax* apresentaram performances iguais relacionadas ao crescimento (FELIP et al., 1999). Para o linguado *Scophthalmus maximus*, as diferenças de performance entre diploides e triploides

ocorreram só após o primeiro ano de vida, com ambos apresentando crescimentos iguais até então. Só a partir da primeira maturação sexual que os triploides obtiveram sobrevivência maior em relação aos diploides por não apresentarem mortalidades relacionadas à desova, como também exibiram taxas de crescimento mais elevadas, com as diferenças se acentuando ainda mais a cada estação reprodutiva (CAL, et al., 2006).

Embora a avaliação dos parâmetros zootécnicos não possa ainda ser realizada para os triploides de *P. argenteus* obtidos, a eficiência de um protocolo que produza 100% de triploides para uma espécie amplamente utilizada no policultivo e com grande potencial aquícola pode representar um ganho significativo de produção desse importante recurso pesqueiro. Inclusive, por ser uma metodologia de simples aplicação do ponto de vista tecnológico, permite que até as pisciculturas localizadas longe de centros urbanos consigam utilizá-la, uma vez que um balde de gelo é tudo o que é necessário para aplicá-la.

No presente trabalho, foi gerada uma metodologia que permite a produção de 100% de triploides para uma espécie nativa, um feito até então só alcançado para o jundiá (*Rhamdia quellen*) com o uso de choques de pressão hidrostática (VOZZI et al., 2003; HUERGO e ZANIBONI-FILHO, 2006; DA SILVA, et al. 2007; WEISS e ZANIBONI-FILHO 2009, 2010). Se avaliado pelo método de indução, este é o primeiro protocolo com 100% de triploidização por meio de choques térmicos para uma espécie brasileira.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos complementares estão sendo realizados com os animais que permanecem nas hapas na Estação de Piscicultura de Betume (Codevasf), com a realização de biometrias mensais e análises de sobrevivência, para que a performance de diploides e triploides de *P. argenteus* possa ser comparada.

REFERÊNCIAS

- ADAMOV, N. S. M.; NASCIMENTO, N. V.; 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 the World Aquaculture Society**, 2016.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: EDUEM: 501p, 2007.
- ALCÁNTAR-VAZQUEZ, J. P.; DUMAS, S.; PEÑA, R.; IBARRA, A. M. Effects of coldshock triploidy induction treatment on cell cleavage, hatching rate, and survival of triploid larvae of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). **Ciencias Marinas**, v.42, n.2, p.111-122, 2016.
- ALVES, D. E. O.; DA SILVA, M. D. F. M.; MOLINA, W. F.; DA COSTA, S. A. G. L.; DO NASCIMENTO, R. S. S. Desenvolvimento ontogenético inicial de *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875)(Characiformes). **Biota Amazônia**, v.6, n.1, p.70-75, 2016.
- AVERY, T. S.; BROWN, J. A. Investigating the relationship among abnormal patterns of cell cleavage, egg mortality and early larval condition in *Limanda ferruginea*. **Journal of Fish Biology**, v.67, n.3, p.890-896, 2005.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.535-548, 2010.
- BERNARDES, C. L.; PÚBLIO, J. Y.. Proteína bruta no desenvolvimento de curimbas (*Prochilodus scrofa*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 381-390, 2012.
- BONCOMPAGNI-JÚNIOR, O.; NORMANDO, F. T.; BRITO, M. F. G.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Pisces: Prochilodontidae) in São Francisco River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v.29, p.132-138, 2013.
- CAL, R. M.; VIDAL, S.; GÓMEZ, C.; ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; MARTÍNEZ, P.; PIFERRER, F. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v.251, n.1, p.99-108, 2006.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South American fish family prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.622, p.83-89, 2004.

- CHERFAS, N. B. Gynogenesis in fishes. **Genetic bases of fish selection**, p. 255-273, 1981.
- DON, J.; AVTALION, R. R. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, n. 2, p. 186-192, 1986.
- DUNHAM, R. A.; SMITHERMAN, R. O.; GOODMAN, R. K. Comparison of mass selection, crossbreeding, and hybridization for improving growth of channel catfish. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 49, n. 4, p. 293-296, 1987.
- FELIP, A.; PIFERRER, F.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Heredity**, v.83, n.4,p. 387-397, 1999.
- FELIP, A.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; MARTÍNEZ, G.; RAMOS, J.; PIFERRER, F. Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture**, v.152, n.1, p.287-298, 1997.
- FELIP, A.; ZANUY, S. CARRILLO, M.; PIFERRER, F. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. **Genetica**, v. 111, n. 1 -3, p. 175-195, 2001.
- FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C.; FURUYA, W.M.; SOARES, C.M.; GALDIOLI, E.M. Efeitos da dieta sobre o desempenho de curimatã. **Acta Scientiarum**, v.2, n.3, p.699-703, 1999.
- FURUYA, W. M. Espécies nativas. In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.. P.; ZIMMERMANN, S. (Eds.). **Fundamentos da Moderna Aquicultura**. ULBRA: Canoas, 83-90p. 2001.
- GOO, I. B.; IM, J. H.; GIL, H. W.; LIM, S. G.; PARK, I. S. Comparison of cell and nuclear size difference between diploid and induced Triploid in marine medaka, *Oryzias dancena*. **Development & reproduction**, v.19, n.3, p.127, 2015.
- HUSSAIN, M. G.; CHATTERJI, A.; MCANDREW, B. J.; JOHNSTONE, R. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, n. 1, p. 6-12, 1991.
- IHSSEN, P. E.; MCKAY, L.R.; McMILLAN, I., PHILLIPS, R. B. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. **Trans. Am. Fish. Soc.** v. 119, p. 698–717, 1990.

JESUTHASAN, S.; STRÄHLE, U. Dynamic microtubules and specification of the zebrafish embryonic axis. **Current Biology**, v7, p.31–42, 1996.

KETTUNEN, A.; KAURIC, G.; PERUZZI, S. Induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua*) by cold shocks. **Biotechnologies for quality**. Aquaculture Europe 2004, Barcelona, Spain, October, p.20-23: 461-462, 2004.

KJØRSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. Egg Quality In Fishes. **Advances In Marine Biology**, v.26, p.71–113, 1990.

KOBAYASHI, T. Survival and cytological observations on early development of normal, hybrid, and gynogenetic embryos of amago salmon. **Fisheries science**, v. 63, n. 1, p. 33- 36, 1997.

KOBERSTEIN, T.C.R.D; DURIGAN, J. G. Produção de larvas de Curimatã (*Prochilodus lineatus*) submetidas a diferentes densidades de estocagem e níveis de proteína bruta na dieta. *Rev. Ciên. Rur.* V.31, n.1, p.123-127, 2001.

LEVANDUSKI, M. J.; BECK, J. C.; SEEB, J. E. Optimal thermal shocks for induced diploid gynogenesis in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, v.90, n.3-4, p. 239-250, 1990.

LIDDER, P.; SONNINO, A. Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture. In: FRIEDMANN, T.; DUNLAP, J. C.; GOODWIN, S. F. **Advances in Genetics**, p. 88. Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO. Elsevier, 209p, 2012.

LUTZ, C. G. Practical Genetics for Aquaculture, Blackwell, London, 2001. MALISON, J. A.; KAYES, T. B.; HELD, J. A.; BARRY, T. P.; AMUNDSON, C. H. Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock and spermatozoa inactivation. **Aquaculture** v.110, p.229–242, 1993.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217-229, 2006.

MORISHIMA, K. FUJIMOTO, T; SATO, M.; KAWAE, A.; ZHAO, Y.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to induce androgenesis in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), a teleost fish. **BMC biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 116, 2011.

NAKATANI, K. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. **Eletrobrás; Uem**, 2001. il., 2001.

PIFERRER, F.; CAL, R. M.; ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; SÁNCHEZ, L.; MARTINEZ, P. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. **Aquaculture**, v.188, n.1, p.79-90, 2000.

QIN, J.G.; FAST, A.W.; AKO, H. Growout performance of diploid and triploid Chinese catfish *Clarias fuscus*. **Aquaculture**, v.166, p.247–258, 1998.

ROUGEOT, C.; MINET, L.; PRIGNON, C.; VANDERPLASSCHEN, A.; DETRY, B.; PASTORET, P. P.; MÉLARD, C. Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 2, p. 90-94, 2003.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. **Theriogenology** v.60, p.1059–1070, 2003.

ROTHBARD, S.; SHELTON, W. L.; KULIKOVSKY, Z.; RUBINSHTAIN, I.; HAGANI, Y.; MOAV, B. Chromosome set manipulations in the black carp. **Aquaculture International**, v.5, n.1, p.51-64, 1997.

SANTOS, E. **Peixes da água doce**: vida e costumes dos peixes do Brasil. Belo Horizonte: Itatiaia, 1981. 268 p.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N; GODINHO, H.P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. p. 275-290. In. **Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Ed. Godinho Hugo Pereira e Godinho Alexandre Lima, Editora PUCMinas, Belo Horizonte, 468 p, 2003.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco river. In: Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. CARLSFELD J, HARVEY B, ROSS C, BAER A (eds.). **World Fisheries Trust**: Victoria, BC, Canada; p.195-232, 2003.

STRÜSSMANN, C. A.; Choon, N. B.; Takashima, F.; Oshiro, T. Triploidy induction in an atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). **The Progressive FishCulturist**, v.55, n.2, p.83-89, 1993.

THORGAARD, G. H. Ploidy manipulation and performance. **Aquaculture** v.57, p.57–64, 1986.

VALLIN, L.; NISSILING, A. Cell morphology as an early indicator of viability of cod eggs- results from an experimental study. **Fisheries Research**, v.38, p.247-255, 1998.

WOLTERS, W. R.; LIBEY, G. S.; CHRISMAN, C. L. Induction of triploidy in channel catfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.110, n.2, p.310-312, 1981.

YAMAHA, E.; OTANI, S.; MINAMI, A.; ARAI, K. Dorso-ventral axis perturbation in goldfish embryos caused by heat- and pressureshock treatments for chromosome set manipulation. **Fisheries Science**, v.68, p.313–319, 2002.

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