



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNANBUCO – UFRPE

UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA – UAST

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA

Hibridização e produção de peixes triploides de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) e *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819).

MARCOS NATOM PEREIRA DIAS

SERRA TALHADA - PE

2023

MARCOS NATOM PEREIRA DIAS

Hibridização e produção de peixes triploides de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) e *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento

SERRA TALHADA - PE

2023

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

D541h Dias, Marcos Natom Pereira
Hibridização e produção de peixes triploides de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) e *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819).: Manipulação cromossômica em *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) e *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819). / Marcos Natom Pereira Dias. - 2023.
32 f. : il.

Orientador: Nivaldo Ferreira do Nascimento.
Coorientadora: Lucia Suarez Lopez.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Engenharia de Pesca, Serra Talhada, 2023.

1. Biotecnologia. 2. Citometria de fluxo. 3. Citogenética. 4. Manipulação Cromossômica. I. Nascimento, Nivaldo Ferreira do, orient. II. Lopez, Lucia Suarez, coorient. III. Título

MARCOS NATOM PEREIRA DIAS

Hibridização e produção de peixes triploides de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) e *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819).

Parecer da banca examinadora da defesa de Monografia de graduação em Engenharia de Pesca de Marcos Natom Pereira Dias

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento

A banca examinadora composta pelos membros abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o aluno Marcos Natom Pereira Dias do curso de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal Rural de Pernambuco da Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como APROVADO.

Banca Examinadora

.....
Prof. Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento

Unidade Acadêmica de Serra Talhada, UFRPE.

Orientador

.....
Prof. Dr. Elton José de França

Unidade Acadêmica de Serra Talhada, UFRPE.

Membro Interno

.....
Prof. Dr. Francisco Marcante Santana da Silva

Unidade Acadêmica de Serra Talhada, UFRPE.

Membro Interno

Serra Talhada, 27 de Abril de 2023.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe, Gracivany Pereira de Araujo, que sempre esteve ao meu lado me ajudando nas horas difíceis, me motivando quando eu pensava em desistir e que sempre me apoiou e esteve ao meu lado durante toda minha vida. Dedico também esse trabalho ao meu tio, Fabiano Pereira De Araujo, que sempre me deu conselhos e que sempre me ajudou quando precisei.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sempre me deu saúde e coragem para não desistir, sempre me guiou pelo caminho certo e sempre me livrou dos perigos, mesmo nas dificuldades ele nunca me abandonou, e sei que ele está me abençoando e permitindo que eu realize meus sonhos.

A meu orientador, Prof. Dr. Nivaldo Ferreira Do Nascimento, pela confiança, pela toda ajuda que está me dando, pelas oportunidades que surgiu em minha vida através dele, pela amizade dele, não só como professor mais como pessoa, por ter me aceitado já no fim do curso como seu orientando e por tudo que tem me ajudado.

A todos os docentes, discentes e técnicos da Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco que contribuíram de alguma maneira durante todo período de formação, por todo conhecimento, pela paciência, pelas boas amizades ao longo desse período de graduação na Universidade.

Ao laboratório de biotecnologia de peixes, onde realizei meu experimento, agradecer ao pessoal que me receberam muito bem, me ajudaram no meu experimento, que foram superatenciosos comigo e que sem eles não teria conseguido realizar meu experimento, que aprendi outras coisas que poderei usar na minha carreira profissional, quero agradecer em especial A George Yasui, José Augusto Senhorini, que me receberam no laboratório, a Lúcia e ao Andreoli que foram os principais pessoas a me ajudar a realizar meu experimento, e aos demais do laboratório.

Aos componentes da minha banca, Prof. Dr. Francisco Marcante Santana da Silva e Prof. Dr. Elton José de França, que aceitaram fazer parte desse momento que é um dos melhores da minha vida, que se disponibilizaram a fazer parte desse momento, fico muito feliz pois foram professores com que convivi, aprendi, e que vou levar para vida toda, não só como professores mais como amigos.

A minha família, que sempre ficou ao meu lado, me ajudou e que não me deixaram desistir, em especial minha mãe Gracivany Pereira de Araújo, que sempre me motivou, sempre esteve ao lado me ajudando nas dificuldades, ao meu Tio Fabiano Pereira de Araújo, que sempre me ajudou, me deu conselhos e que nunca me deixou na mão, A minha Irmã Jhennyfer Emanuela Isabela Pereira Dias, ao meu irmão Emanuel Dias Pereira Neto e a toda minha família que contribuíram nessa jornada.

Aos meus companheiros de graduação, Francisco Gustavo, Amanda Menezes, Milena Nogueira, Wisley Wilke, Wilian, Candice Milena, Weverton Cesar, Ana Clara, Mathews Brenner, Flávia Kleityane, Rodrigo Lacerda, Wilk Maik, e aos demais colegas que estiveram comigo durante minha graduação e que levarei pra minha vida.

RESUMO

A criação de peixes estéreis é uma interessante alternativa para aumentar a produção aquícola e evitar impactos nos ecossistemas naturais causados por escapes acidentais. Além disso, também podem ser utilizados como receptores de células germinativas de espécies ameaçadas de extinção, contribuindo para conservação de recursos genéticos. Portanto, este trabalho teve como objetivo utilizar duas técnicas potenciais para produzir peixes estéreis, a hibridização e triploidização. Após a indução a reprodução, ovócitos de *Astyanax lacustris* foram extrusados e fertilizados com sêmen de *Psalidodon fasciatus*. Posteriormente, metade dos ovos recém-fertilizados foram submetidos a choque de temperatura (40°C, 2 min) para evitar a liberação do segundo corpúsculo polar e induzir a triploidização. O mesmo procedimento foi realizado com os parentais puros de *A. lacustris*, servindo assim como o grupo controle. No momento da eclosão, a ploidia foi avaliada por citometria de fluxo e citogenética. O híbrido obtido mostrou-se viável e com alta porcentagem de triploidização (97%), similar ao grupo controle (98%). A citogenética mostrou que os peixes diploides e triploides de *A. lacustris* apresentaram 50 e 75 cromossomos, respectivamente. Já os peixes híbridos diploides e triploides apresentaram 49 e 74 cromossomos, respectivamente. Este trabalho também mostrou, pela primeira vez, que foi possível identificar peixes híbridos utilizando citometria de fluxo. Em conclusão, a hibridização juntamente com a triploidização mostrou-se como uma eficiente alternativa para a obtenção de peixes estéreis em duas espécies do gênero *Astyanax* sp. e a citometria de fluxo mostrou-se eficaz para identificar peixes híbridos de *A. lacustris* e *P. fasciatus*. Este trabalho abre possibilidade para estudos em outras espécies com futuras aplicações na produção e conservação de recursos genéticos.

Palavras-chaves: biotecnologia, citometria de fluxo, citogenética, manipulação cromossômica.

ABSTRACT

Fish sterilization is an interesting alternative to increase aquaculture production and avoid impacts on natural ecosystems caused by accidental escapes. In addition, they can also be used as recipients of germ cells from endangered species, contributing to the conservation of genetic resources. Therefore, this study aimed to use two potential techniques to produce sterile fish, hybridization and triploidization. After inducing reproduction, oocytes from *Astyanax lacustris* were extruded and fertilized with semen from *Psalidodon fasciatus*. Subsequently, half of the newly fertilized eggs were subjected to a temperature shock (40°C, 2 min) to prevent the release of the second polar body and induce triploidization. The same procedure was performed with pure parental *A. lacustris*, serving as the control group. At hatching, ploidy was evaluated by flow cytometry and cytogenetics. The obtained hybrid was viable and showed a high percentage of triploidization (97%), similar to the control group (98%). Cytogenetics showed that diploid and triploid *A. lacustris* fish had 50 and 75 chromosomes, respectively. The diploid and triploid hybrid fish had 49 and 74 chromosomes, respectively. This study also showed, for the first time, that it was possible to identify hybrid fish using flow cytometry. In conclusion, hybridization along with triploidization proved to be an efficient alternative for obtaining sterile fish in two species of the *Astyanax sp.* genus, and flow cytometry was effective in identifying hybrid fish from *A. lacustris* and *P. fasciatus*. This study opens up possibilities for research in other species with future applications in the production and conservation of genetic resources.

Keywords: biotechnology, chromosome set manipulation, cytogenetics, flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Procedimentos de manipulação cromossômica em peixes. Para induzir peixes triploides é aplicado choque para inibir a liberação do segundo corpúsculo polar logo após a fertilização. Já para gerar peixes tetraploides é aplicado choque para inibir a primeira divisão celular ou clivagem..... 14
- Figura 2. Procedimentos de citometria de fluxo. Remoção da membrana e coloração do DNA (A, B, C). Quantificação do conteúdo relativo de DNA em citômetro de fluxo (D, E).....15
- Figura 3. Esfregaço sanguíneo e citogenética de um peixe diploide (A,C) e tetraploide (C,D) de *Astyanax lacustris*. 16
- Figura 4. Exemplar de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*)..... 18
- Figura 5. Exemplar de lambari-do-rabo-vermelho (*Psalidodon fasciatus*)..... 19
- Figura 6. Tempo médio estimado de divergência entre as duas espécies.....20
- Figura 7. Procedimentos para hibridação e indução de triploides. A. extrusão de ovócitos de *Astyanax lacustris*. B. Separação dos ovócitos em duas alíquotas que são fertilizadas com sêmen de *Astyanax lacustris* e *Psalidodon fasciatus*. Divisão das alíquotas em dois grupos, sendo um deles submetido a choque de temperatura (40°C; duração de 2 min) com dois minutos pós-fertilização. Esse procedimento foi realizado em triplicata com diferentes fontes de gametas23
- Figura 8. Histogramas de citometria de fluxo de larvas diploides (A) e triploides (B) de *Astyanax lacustris* e de híbridos diploides (C) e triploides (D) de *A.lacustris* x *A. fasciatus*. 1: controle haplóide. 2: Diploide. 3: Triploide. 4: Híbrido diploide; 5: Híbrido triploide25
- Figura 9. Cromossomos metafásicos de larvas diploides (A) e triploides (B) de *Astyanax lacustris* e de híbridos diploides (C) e triploides (D) de *A.lacustris* x *P. fasciatus*. 1: controle haplóide. 2: Diploide. 3: Triploide. 4: Híbrido diploide; 5: Híbrido triploide26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ploidia de peixes diploides e triploides provenientes do cruzamento entre fêmeas de <i>Astyanax lacustris</i> e machos de <i>A. lacustris</i> e <i>P. fasciatus</i>25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICAS EM PEIXES	12
2.2 MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO DE PLOIDIA	15
2.3 HIBRIDAÇÃO INTERESPECÍFICA EM PEIXES	17
2.4 ESPÉCIES UTILIZADAS (<i>ASTYANAX LACUSTRIS</i> E <i>PSALIDODON FASCIATUS</i>)	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 ÉTICA E LOCAL	20
4.2 ORIGEM DOS PARENTAIS	21
4.3 REPRODUÇÃO E OBTENÇÃO DOS GAMETAS	21
4.4 INDUÇÃO DE PEIXES TRIPLOIDES	22
4.5 CONFORMAÇÃO DA PLOIDIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	23
4.6 CONFIRMAÇÃO DA PLOIDIA POR CITOGENÉTICA	24
5. RESULTADOS	24
5.1 CITOMETRIA DE FLUXO	24
5.2 CITOGENÉTICA	25
6. DISCURSÃO	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

A Aquicultura é a produção de organismos aquáticos, em cativeiro, em qualquer um dos seus estágios de desenvolvimento. Essa prática de produção zootécnica tem origem milenar e vem apresentando constante expansão, principalmente pela estagnação da pesca extrativa e aumento da demanda de proteína devido à explosão demográfica observada nas últimas décadas (BERTOLINE, R. M. et al. 2020). A piscicultura, principal atividade aquícola no Brasil, vem apresentando números crescentes. Onde em 2022, segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR, 2023), foram produzidas 860.355 toneladas de peixes, um aumento de 2,3% em relação ao ano anterior. Além disso, a piscicultura gera em torno de 3 milhões de empregos diretos e indiretos, movimentando cerca de 9 bilhões de reais por ano.

No entanto, o potencial de produção é enorme, principalmente pelo ainda baixo consumo interno (cerca de 9,5 kg/hab/ano), bem inferior à média mundial. Assim, para garantir a crescente demanda de produtos oriundos da piscicultura, fica evidente a necessidade de exploração de tecnologias relacionadas ao controle e potencialização da reprodução das espécies. Para isso, a biotecnologia aplicada apresenta-se como uma ferramenta valiosa que atende ao viés produtivo e que também fornece subsídios para o desenvolvimento de pesquisas na área de preservação dos recursos genéticos (KOMEN; THORGAARD, 2007).

Na manipulação cromossômica, pode ser destacada como um exemplo de tecnologia que atende às demandas supracitadas (PIFERRER et al., 2009). conjuntos de cromossomos podem ser adicionados ou subtraídos durante os processos de divisão celular (meiose e mitose) (ARAI, 2001) e o principal fenômeno que pode ser induzido é a poliploidização. Nesta, os indivíduos apresentam um ou mais conjuntos de cromossomos além do considerado “normal” para a espécie (PIFERRER et al., 2009). Assim, triploides, tetraploides e pentaploides são poliploides com três, quatro e cinco conjuntos de cromossomos, respectivamente.

Em cultivo, a produção de peixes triploides tem sido a técnica mais estudada, principalmente pelos impactos diretos na produção. Peixes triploides apresentam três conjuntos de cromossomos, e portanto, podem ser estéreis, conferindo várias

vantagens para aquicultura, como maior desempenho zootécnico, redução na agressividade e melhor qualidade da carne (DO NASCIMENTO et al., 2017)

Peixes triploides também pode ser utilizado como receptores de células germinativas tronco (células germinativas primordiais, espermatogônias e oogônias) em estudos de transplante celular. Esta técnica consiste na transferência de células de um animal doador para outro receptor, com o objetivo que este último produza gametas exclusivamente do doador (GOLPOUR et al., 2016). Entretanto, para o sucesso do transplante, é necessário que o hospedeiro seja estéril (livre de gametogênese), para evitar que células do doador e receptor coexistam no mesmo indivíduo (OKUTSU et al., 2007).

No entanto, em alguns casos, peixes triploides podem não ser totalmente estéreis, dificultando ou ainda inviabilizando o transplante de células germinativas (GOLPOUR et al., 2016). Deste modo, uma alternativa para produção de peixes estéreis é a hibridização, que tem potencial para suprimir a gametogênese endógena (PIVA et al., 2018). Como este método também pode falhar e gerar proles férteis, uma interessante possibilidade é combinar a técnica de hibridização com a triploidização, pois híbridos triploides tem maiores chances de apresentar esterilidade com completo esvaziamento da gônada (PIVA et al., 2018), facilitando assim futuros trabalhos de transplante de células germinativas.

Independente da técnica empregada (triploidização, hibridização ou ambas) é imprescindível a confirmação do resultado. No caso dos triploides, as técnicas mais comuns são a citometria de fluxo, esfregaço sanguíneo e citogenética (PIFERRER et al., 2009). Por outro lado, para identificação de híbridos, os métodos mais empregados são pela análise da morfologia corporal ou por técnicas de biologia molecular (BARTLEY; et al, 2000; RAHMAN et al., 2018). No entanto, a avaliação da morfologia vem se mostrando com muitas falhas e até o momento, a única forma de identificar com confiança é através de técnicas moleculares. Que apresenta um alto custo e demanda muito esforço e mão de obra o que remete a necessidade de novos métodos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Manipulação cromossômica e produção de peixes triploides

Para aquicultura, os organismos triploides ($3n$) são interessantes, principalmente pelas vantagens em relação aos diploides ($2n$) os peixes de valores econômicos do Brasil (CLEVELAND; WEBER, 2013). É importante frisar a possibilidade de esterilização pela supressão do desenvolvimento gonadal e conseqüentemente maior crescimento somático (FELIP; CARRILLO; ZANUY, 2009; PIFERRER et al., 2009). Além disso, ao se cultivar peixes estéreis, os impactos ambientais são reduzidos em caso de escapes (FRASER et al., 2012).

A técnica mais comumente empregada para induzir triploides é através da inibição da liberação do segundo corpúsculo polar, por meio de um choque de temperatura, químico ou de pressão (ARAI, 2001). A esterilidade em triploides, uma das principais características, está relacionada a etapa reducional da meiose, a qual é comprometida em tais indivíduos devido a presença de número ímpar de cromossomos ($3n$). Assim, a energia que seria utilizada para o desenvolvimento gonadal é direcionada para o crescimento somático (DO NASCIMENTO et al., 2017). Peixes triploides também podem ser utilizados como receptores de células germinativas em experimentos de quimerismo, o que já foi evidenciado por Okutsu et al., (2007) pelo êxito na produção de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) através do salmão triploide.

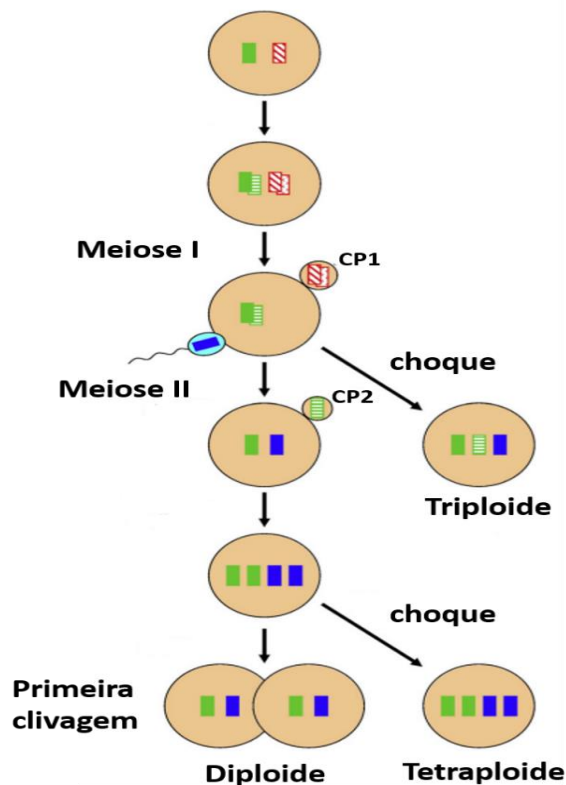
Como visto acima, a técnica comumente empregada para induzir triploides, embora eficaz, pode não ser 100% efetiva, por exemplo, o choque de temperatura levou a uma produção de 92% de peixes triploides e 8% diploides (ADAMOV et al., 2017). Adicionalmente, os choques aplicados podem afetar negativamente a sobrevivência e o crescimento dos organismos triploides (OPSTAD et al., 2013). Assim, como solução para esses problemas, pode-se utilizar basicamente duas estratégias: 1) pode-se simplesmente cruzar peixes tetraploides com diploides, evitando os efeitos deletérios dos choques supramencionados ou 2) pode-se otimizar o protocolo de triploidização empregado, de forma a garantir que este seja 100% eficaz e/ou com maior sobrevivência.

Para indução de peixes tetraploides são utilizadas estratégias similares à triploidização (PIFERRER et al., 2009; ZHANG; ONOZATO, 2004). No entanto, os choques são aplicados posteriormente, em diferentes fases do ciclo celular antes da

primeira mitose, atuando na destruição dos filamentos do fuso mitótico e impedindo a divisão celular (ZHANG; ONOZATO, 2004).

Em comparação com a triploidização, protocolos de peixes tetraploides são escassos e difíceis de conseguir, sendo geralmente observada baixa sobrevivência. Além disso, para que sejam empregados na produção em massa de peixes triploides, é necessário que os tetraploides sejam viáveis, ou seja, produzam gametas diploides com qualidade e capacidade de fertilização (ZHAO et al., 2014). No entanto, tetraploides com gametas viáveis também são escassos, sendo limitados para algumas espécies (MORISHIMA; YOSHIKAWA; ARAI, 2008). Em espécies nativas, apenas para o *A. lacustris* foi observado que tetraploides são capazes de produzir gametas viáveis para produção de lotes 100% triploides (DO NASCIMENTO et al., 2020a). Portanto, mais estudos devem ser conduzidos para viabilizar esta técnica. Um esquema da manipulação cromossômica em peixes é descrito na figura abaixo.

Figura 1. Procedimentos de manipulação cromossômica em peixes. Para induzir peixes triploides é aplicado choque para inibir a liberação do segundo corpúsculo polar logo após a fertilização. Já para gerar peixes tetraploides é aplicado choque para inibir a primeira divisão celular ou clivagem.

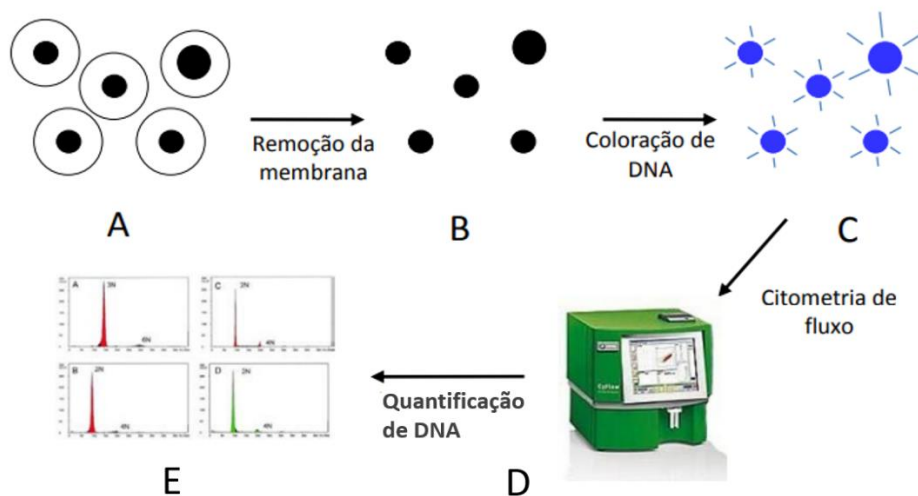


Fonte: Adaptado de Piferrer et al., (2009).

2.2. Métodos de confirmação de ploidia

Após a indução de um organismo triploide ou tetraploide é necessário realizar a confirmação do resultado. Para tanto, várias técnicas podem ser empregadas, como: citometria de fluxo, esfregaço sanguíneo e citogenética (DUNHAM, 2004; LUTZ, 2003). Dentre estes, a citometria de fluxo é o método mais comum e ele é baseado na mensuração do conteúdo de DNA das células. Nesta técnica, são utilizados reagentes para retirar os núcleos de uma amostra (Ex: uma larva recém eclodia ou um pedaço de nadadeira). Posteriormente, é adicionada uma solução (corante fluorescente) para coloração dos núcleos e a amostra é então levada para um aparelho chamado citômetro de fluxo, que irá medir a intensidade de DNA. Como o peixe poliploide apresenta núcleos com mais DNA, eles irão liberar fluorescência de maior intensidade. O resultado final é apresentado em gráficos chamados de Histogramas (Figura 2). A principal vantagem desta técnica é que os procedimentos são realizados rapidamente e pode ser executado em larvas e/ou com apenas um pedaço de nadadeira de peixes adultos.

Figura 2. Procedimentos de citometria de fluxo. Remoção da membrana e coloração do DNA (A, B, C). Quantificação do conteúdo relativo de DNA em citômetro de fluxo (D, E).

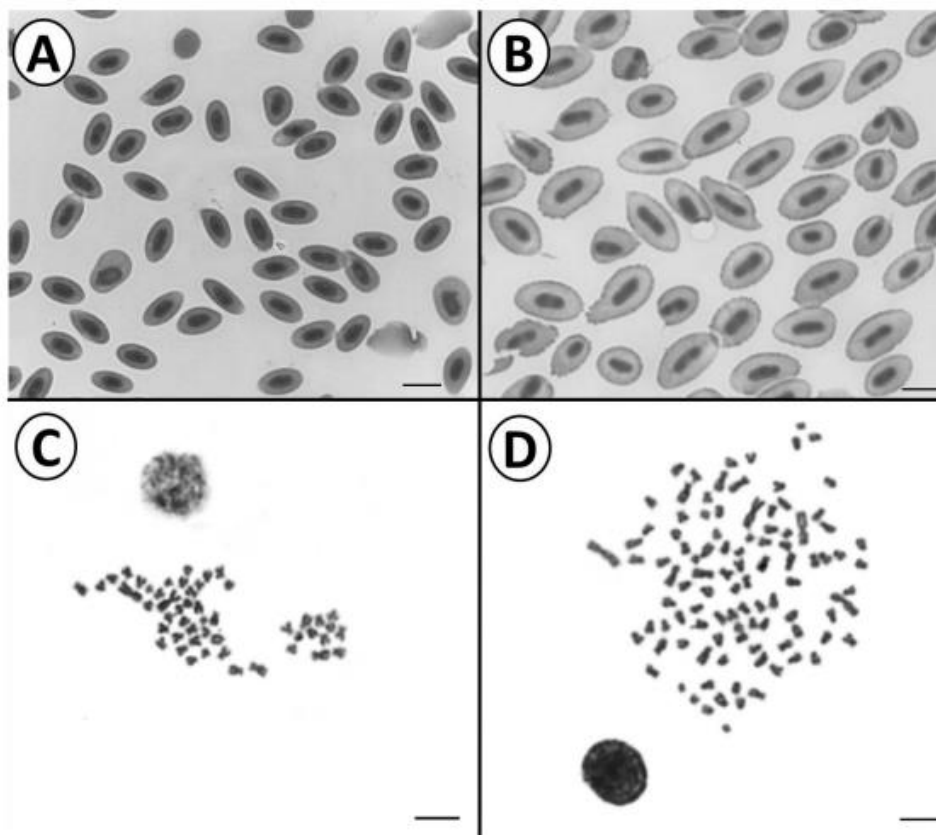


Fonte: Xavier (2013).

A avaliação da ploidia através do volume nuclear dos eritrócitos é muito comum. (LU et al., 2009) avaliaram o sangue de peixes com diferentes ploidias (2n, 3n, 4n e 5n), constatando que quanto maior o conteúdo de DNA, maior o volume nuclear. Portanto, concomitante ao aumento da ploidia, o diâmetro celular destes animais também aumentam (OPSTAD et al., 2013) e este fenômeno é compensado pela diminuição no número de células. A principal vantagem desta técnica é a rapidez e facilidade da técnica. No entanto, é necessário esperar que o animal tenha um tamanho mínimo para que o sangue seja coletado (Figura 3 A, B).

Outra metodologia muito comum é por meio da contagem direta de cromossomos através da citogenética (ADAMOV et al., 2017). Esta técnica é considerada infalível para identificar poliploides, pois o número de cromossomos é facilmente quantificado. No entanto, para que seja realizado em peixes adultos é necessário sacrificar os animais para coleta do rim cranial e preparo do material (Figura 3 C, D).

Figura 3. Esfregaço sanguíneo e citogenética de um peixe diploide (A,C) e tetraploide (C,D) de *Astyanax lacustres*.



2.3. Hibridização interespecífica em peixes

A hibridização ou hibridação pode ser definida como o cruzamento de grupos ou indivíduos geneticamente distintos, podendo ocorrer dentro da mesma espécie (entre linhagens) ou entre exemplares de espécies diferentes (BARTLEY; RANA; IMMINK, 2000). Em peixes, a hibridação é um fenômeno relativamente comum e ocorre naturalmente, sendo facilitada pelas condições biológicas e ecofisiológicas deste grupo, como fertilização externa, competição por espaço e desova, convivência no mesmo ambiente e grande diversidade de espécies.

Por outro lado, a hibridação também pode ocorrer de forma artificial, por influência humana direta, principalmente em programas de aquicultura para a produção de peixes com desempenho superior, como maior crescimento, resistência a condições ambientais, doenças e maior qualidade da carne (RAHMAN et al., 2018). Estas características vantajosas de híbridos são conhecidas como heterose ou vigor híbrido. No Brasil, a hibridação ocorre a vários anos, mas foi potencializada a partir da década de 1980, quando as técnicas de reprodução artificial se popularizaram. Em 1985, por exemplo, no Centro de Pesquisa de Peixes Continentais (CEPTA, Pirassununga, SP), foi produzido o famoso híbrido “tambacu” através do cruzamento entre a fêmea de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o macho de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (BERNARDINO et al., 1986). Deste momento em diante, a técnica de hibridação se popularizou no Brasil, principalmente nos chamados “peixes redondos” (família Serrasalminidae) e grandes bagres da Ordem Siluriformes.

No entanto, a hibridação em peixes apresenta alguns riscos, principalmente ao meio ambiente quando os híbridos são introduzidos ou através de escapes nas pisciculturas. O principal impacto é o cruzamento com espécies puras, ameaçando a diversidade genética das populações naturais. Mesmo que sejam inférteis, os híbridos podem causar problemas ambientais, principalmente pela competição por alimento e espaço (RAHMAN et al., 2018).

Recentemente, a hibridação tem sido utilizada como um método alternativo para produção de peixes estéreis, sendo considerado como potenciais receptores de células germinativas em trabalhos de transplante de células. Como muitas vezes podem ser férteis, a combinação desta técnica com manipulação cromossômica

(produção de híbridos triploides), já foi descrita como mais eficaz para garantir peixes 100% estéreis (PIVA et al., 2018)

Já para a identificação de peixes híbridos, várias metodologias foram descritas na literatura. A maioria dos trabalhos utilizam métodos morfológicos, seguidos por técnicas genéticas e moleculares. Embora seja a mais empregada, a análise morfológica é considerada confusa e muitas vezes de aplicação duvidosa. Portanto, novas técnicas para identificação destes animais são necessárias.

2.4. Espécies utilizadas (*Astyanax lacustris* e *Psalidodon fasciatus*)

As espécies escolhidas para o presente trabalho, *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) e *Psalidodon fasciatus* (CUVIER, 1819), pertencem a família Characidae, que abarca várias espécies de peixes de água doce, muito comuns em córregos e lagos das bacias hidrográficas do Brasil.

O lambari-do-rabo-amarelo, antes descrita como *Astyanax altiparanae* (GARUTTI; BRITSKI, 2000) e recentemente classificada como *A. lacustris* (LUCENA; SOARES, 2016), apresenta pequeno porte (8 – 12 cm) e é considerado um organismo modelo em estudos de biologia básica e aplicada (Figura 4). O primeiro passo para a consolidação do lambari como organismo modelo foi o estudo da sua reprodução artificial, como coleta e estocagem de gametas desenvolvido por (YASUI et al., 2015). Tal estudo foi base para a descrição detalhada dos eventos biológicos do desenvolvimento inicial, como o momento da extrusão do segundo corpúsculo polar (PEREIRA-SANTOS et al., 2016), o que permitiu a indução (ADAMOV et al., 2017), Larvicultura (BERTOLINI et al., 2018) e produção de lambaris triploides (DO NASCIMENTO et al., 2017), tetraploides (DO NASCIMENTO et al., 2020a) e ginogenéticos (DO NASCIMENTO et al., 2020b).

Figura 4. Exemplar de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*).



Já o *Astyanax fasciatus* (CUVIER, 1819), também da família Characidae, se diferencia por apresentar coloração avermelhada na nadadeira caudal, sendo conhecido com lambari-do-rabo-vermelho (Figura 5). Recentemente, uma revisão taxonômica reintroduziu o gênero *Psalidodon*, e esta espécie passou a se chamar *Psalidodon fasciatus* (TERÁN; BENITEZ; MIRANDE, 2020). Também apresenta pequeno tamanho (até 15 cm), sendo abundante em rios e outros ambientes aquáticos no Brasil. Embora não tenha a importância do *A. lacustris*, é considerado um bioindicador em ambientes aquáticos, por apresentar tolerância a variações bióticas, como temperatura, pH e condutividade da água (SCHULZ; MARTINS-JUNIOR, 2001).

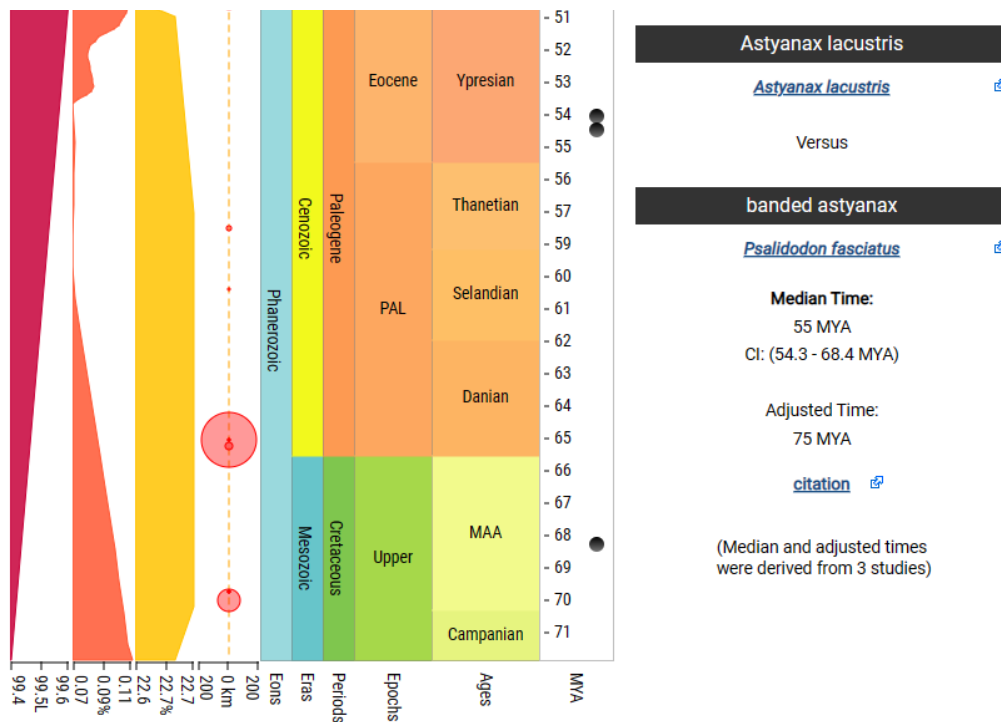
Figura 5. Exemplar de lambari-do-rabo-vermelho (*Astyanax fasciatus*).



Fonte: Arakawa H (2016).

Portanto, devido às similaridades das duas espécies (*A. lacustris* e *A. fasciatus*), além de ambas já responderem aos protocolos tradicionais de reprodução induzida (PIVA et al., 2018), estas são candidatas interessantes em estudos de hibridização, pois a cada dia aumenta a demanda por lambari, tanto para alimentação humana, mais também para ser espécies forrageiras para outras espécies carnívoras, sendo assim no último ano foi produzido cerca de uma tonelada de lambari. O tempo médio de divergência filogenética entre as espécies é estimado entre 54,3 e 68,4 milhões de anos (Figura 6).

Figura 6. Tempo médio estimado de divergência entre as duas espécies.



Fonte: <http://www.timetree.org/> (2023).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir híbridos diploides e triploides de *Astyanax lacustris* e *Astyanax fasciatus*

3.2. Objetivos específicos

- Realizar o cruzamento interespecíficos de *A. lacustris* e *A. fasciatus*
- Utilizar choque de temperatura para indução de peixes triploides e híbridos triploides
- Analisar a ploidia das larvas obtidas utilizando citometria de fluxo
- Separar, por citometria de fluxo, peixes híbridos dos puros.
- Verificar o número de cromossomos das larvas obtidas utilizando citogenética

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Ética e Local

O experimento foi executado no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, situado no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA), na cidade de Pirassununga, São Paulo (21°55'58" S, 47°22'31" O), com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/CEPTA, #10/2015).

4.2. Origem dos parentais

Para realizar os cruzamentos, foram utilizados fêmeas e machos de *Astyanax lacustris* e *Astyanax fasciatus*. O critério utilizado para identificação do sexo foi a presença de espículas na nadadeira anal, que ocorre somente nos machos (GARUTTI, 2003), tendo confirmação através das gônadas. Foram utilizados peixes do plantel de reprodutores do CEPTA/ICMBio, os quais são mantidos em tanques escavados de 1000 m².

4.3. Reprodução e obtenção dos gametas

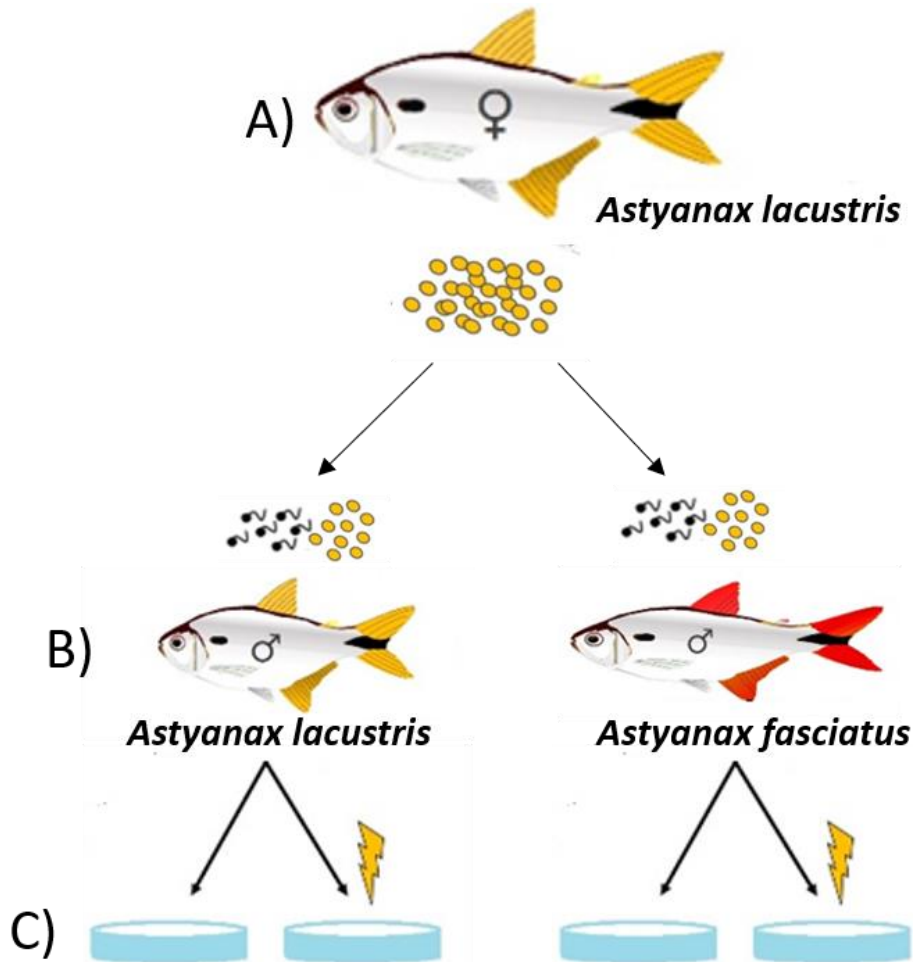
O experimento foi realizado em triplicata (três repetições), com gametas oriundos de peixes distintos. Em cada repetição foi utilizado, uma fêmea e um macho de *A. lacustris*, e um macho de *A. fasciatus* foram induzidos a reprodução como relatado por Yasui et al., (2015) e Do Nascimento et al., (2017). Os peixes foram injetados com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) dividido em duas aplicações, com intervalo de 6 horas. Para indução hormonal, uma hipófise de carpa de 2 mg foi macerada e diluída em 5 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) (solução estoque). Desta solução, 100 µL foi novamente diluído em 900 µL de NaCl (0,9%) e 0,1 mL injetado em cada fêmea na primeira dose. Para a segunda dose nas fêmeas e a dose única nos machos foi utilizada a solução estoque indicial, sendo também injetado 0,1 mL por peixe. Logo após a primeira indução, os peixes foram transferidos para aquários de 50L com oxigenação constante e temperatura controlada (28°C). Aproximadamente 8 horas após a segunda aplicação, e sendo observado comportamento reprodutivo (natação acelerada da fêmea juntamente com o macho na coluna d'água), os peixes foram imediatamente transferidos para solução anestésica de Eugenol.

Inicialmente, amostras de sêmen de cada macho foram coletadas com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL (Eppendorff, Hamburg, Alemanha), e transferido diretamente para tubos de 1,5 ml contendo 400 µL de solução de Ringer modificada (128,3 mM de NaCl, 23,6 mM de KCl, 3,6 mM de CaCl₂). Em seguida, os ovócitos de *A. lacustris* foram extrusados em uma placa de petri coberta por filme plástico de PVC (para evitar que os ovócitos fiquem grudados), sendo então divididos em duas alíquotas que foram fertilizadas com 50µL de sêmen de cada macho diferente (*A. lacustris* e *A. fasciatus*). Para ativação dos gametas, foi adicionado 5 mL de água destilada e os gametas homogeneizados por um minuto.

4.4. Indução de peixes triploides

Os peixes triploides foram induzidos baseado em estudos prévios (ADAMOV et al., 2017; BERTOLINI et al., 2020, 2018; DO NASCIMENTO et al., 2017). Os ovos recém-fertilizados foram distribuídos em incubadoras plásticas flutuantes de malha de 100 µm em recipiente com água a temperatura de 26°C. Posteriormente, foram submetidos a choque quente (40°C; 2min) com 2 minutos pós-fertilização. Antes do choque, parte dos ovos (de cada cruzamento) foi separado e mantido intacto, sendo então considerado controle diploide (puro e híbrido). Após realização dos choques, as peneiras contendo os ovos voltaram à água a 26°C até a eclosão (Figura 7).

Figura 7. Procedimentos para hibridação e indução de triploides. A. extrusão de ovócitos de *Astyanax lacustris*. B. Separação dos ovócitos em duas alíquotas que são fertilizadas com sêmen de *Astyanax lacustris* e *Astyanax fasciatus*. Divisão das alíquotas em dois grupos, sendo um deles submetido a choque de temperatura (40°C; duração de 2 min) com dois minutos pós-fertilização. Esse procedimento foi realizado em triplicata com diferentes fontes de gametas.



Fonte: Autoria Própria.

4.5. Confirmação da ploidia por citometria de fluxo

Para identificação dos peixes diploides e triploides, foram coletadas uma parte das larvas recém-eclodidas de todos os tratamentos e foram analisadas baseado no protocolo desenvolvido por Xavier et al., (2017). As amostras foram primeiramente transferidas para uma solução detergente de lise celular (9,53 mM MgSO₄.7H₂O, 47,67mM KCl, 15 mM Tris, 74 mM de Sacarose e 0,8% de Triton X-100) para extração dos núcleos. Posteriormente, os núcleos foram corados com 800µL de solução de

Bulbecco's PBS com corante fluorescente 4',6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, as amostras foram filtradas em malha de 30 μm (Celltrics, Partec, Alemanha) e analisadas em citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy, Analyzer, Partec, GMBh, Alemanha). Em todas as análises, sêmen de machos diploides de *A. lacustris* foram utilizados como controle haplóide.

4.6. Confirmação da ploidia por citogenética

Larvas recém-eclodidas (n=15 por tratamento e repetição) foram separadas e mantidas em placa de petri durante quatro horas em colchinha diluída em água destilada (0,02g/mL). Após quatro horas, as larvas foram dissociadas individualmente (por inteiro) em placa de Petri e depois transferidas para becker (50 mL) contendo 7 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M). O material foi transferido para uma estufa a 37°C por 50 minutos. Posteriormente, as amostras foram retiradas da estufa e separadas em tubo de falcon (15 ml), sendo adicionado fixador metanol e ácido acético (3:1), até atingir 8 mL. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (1200 rpm) por dez minutos. Ao final o sobrenadante é descartado e adicionado novamente o fixador até atingir 8mL. Este procedimento é repetido ainda três vezes. Finalizada a centrifugação a amostra é separada microtubo de 1,5mL e é adicionado 1 mL de fixador.

Para confecção das lâminas, parte da suspensão celular (10 – 15 μL) foi pingada com auxílio de uma micropipeta (Eppendorf, Hamburg, Germany) diretamente em uma lâmina de vidro limpa. As lâminas foram coradas em solução de Giemsa a 5%, durante 10 minutos. As lâminas foram visualizadas em microscópio (Nikon Ni, Tokyo, Japan) por meio do software Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão), sendo as metáfases de melhor qualidade identificadas e fotografadas.

5. RESULTADOS

5.1. Citometria de fluxo

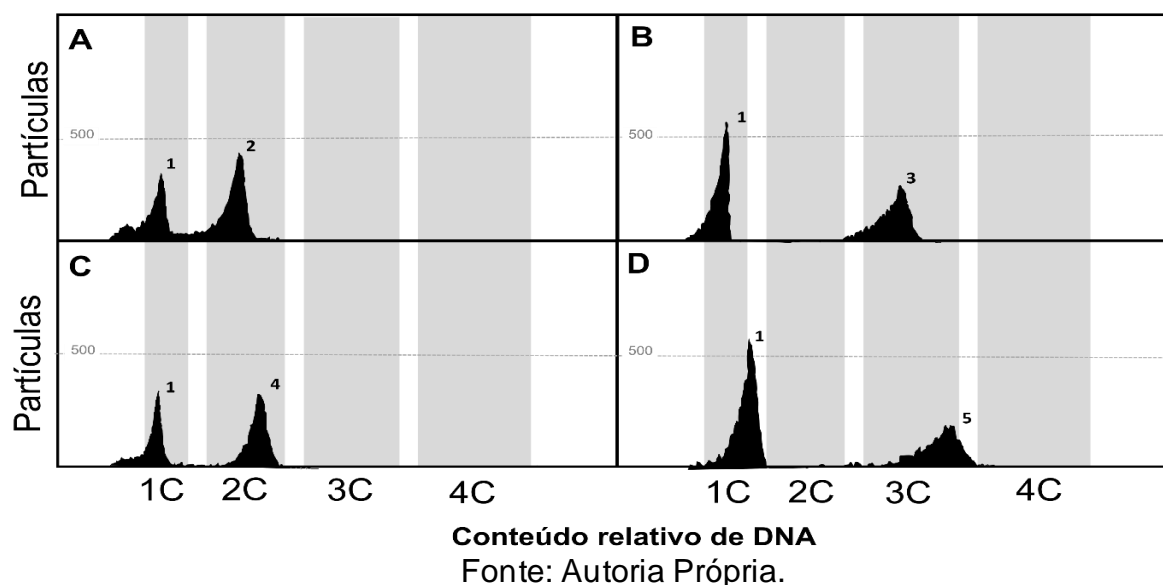
Os dados de citometria de fluxo mostraram que todos os peixes (grupo controle e o híbrido) que não foram submetidos ao choque de temperatura eram diploides. Por outro lado, aqueles submetidos ao choque, 98% do grupo controle e 97% dos

resultantes da hibridização eram triploides (Tabela 1; Figura 8). Os dados também mostraram que é possível identificar peixes híbridos diploides e triploides apenas pela disposição dos gráficos de citometria de fluxo, pois o pico dos híbridos está sempre mais deslocado para a direita (Figura 8). Nesse estudo foram analisadas 240 amostras, utilizando as larvas feita na reprodução, onde três análises não constou contrudo relativo de DNA, sendo duas análises do triploide e uma análise de híbrido triploide que não rodou.

Tabela 1. Ploidia de peixes diploides e triploides provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax lacustris* e machos de *A. lacustris* e *P. fasciatus*.

Tratamentos	Ploidia		Triploides (%)
	2n	3n	
Controle Diploide	60	0	0%
Controle/ Triploide	1	57	98%
Híbrido Diploide	60	0	0%
Híbrido Triploide	2	57	97%

Figura 8. Histogramas de citometria de fluxo de larvas diploides (A) e triploides (B) de *Astyanax lacustris* e de híbridos diploides (C) e triploides (D) de *A. lacustris* x *A. fasciatus*. 1: controle haplóide. 2: Diploide. 3: Triploide. 4: Híbrido diploide; 5: Híbrido triploide.

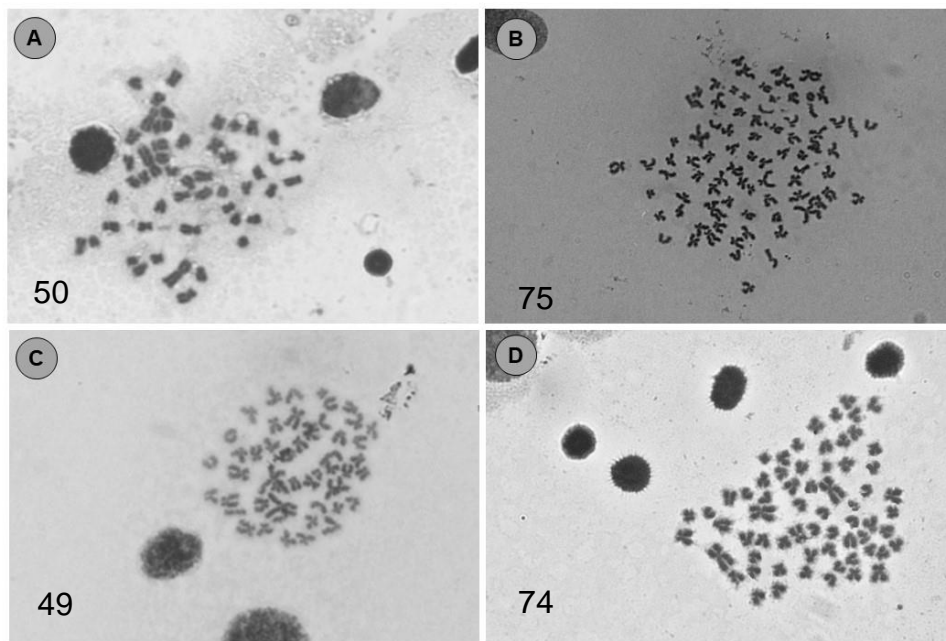


5.2. Citogenética

A ploidia também foi confirmada por citogenética. Pela contagem dos cromossomos metafásicos, peixes diploides e triploides de *Astyanax lacustris*

apresentaram 50 e 75 cromossomos, respectivamente. Por outro lado, híbridos diploides e triploides de *A. lacustris* e *A. fasciatus* apresentaram 49 e 74 cromossomos, respectivamente.

Figura 9. Cromossomos metafásicos de larvas diploides (A) e triploides (B) de *Astyanax lacustris* e de híbridos diploides (C) e triploides (D) de *A. lacustris* x *A. fasciatus*.



Fonte: Autoria Própria

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi obtido sucesso na hibridização juntamente com a triploidização utilizando fêmeas de *Astyanax lacustris* e machos de *Astyanax fasciatus*. A porcentagem de triploidização obtida, seja no grupo controle ou no híbrido triploide foram altas, o que vai de acordo com o protocolo de triploidização estabelecido para *A. lacustris* por Adamov et al., (2017), que obteve 92% de triploides. Diversos outros protocolos de indução de triploides em espécies nativas, utilizando o mesmo procedimento (ADAMOV et al., 2017), também obtiveram resultados de triploidização semelhantes, como 96,7 % em curimatã (*Prochilodus lineatus*)(YASUI et al., 2020) e 95% em matrinxã (*Brycon amazonicus*)(DO NASCIMENTO et al., 2021). Estes dados

indicam que, para espécies nativas, a mesma resposta é obtida aplicando o mesmo protocolo. Portanto, é possível inferir que resultados similares ou próximos podem ser conseguidos em outras espécies nativas de interesse comercial.

Como não foi possível obter proles 100% triploides, este protocolo ainda precisará ser aperfeiçoado em futuros experimentos. Como alternativa, vale citar o uso de peixes tetraploides como fonte de gametas diploides (DO NASCIMENTO et al., 2020a), o que, além de garantir proles com três conjuntos de cromossomos, os impactos negativos do choque de temperatura, como redução na sobrevivência e baixa normalidade larval, são evitados.

Peixes triploides são interessantes para aquicultura, principalmente por apresentar esterilidade, o que leva ao maior rendimento somático (DO NASCIMENTO et al., 2017). Portanto, híbridos triploides de *A. lacustris* e *A. fasciatus* podem ser utilizados para aumentar a produção de lambari, garantindo plena esterilidade e diminuindo impactos no meio ambiente em caso de escapes acidentais. Adicionalmente, podem ser utilizados como receptores de células germinativas em experimentos de transplante de células (OKUTSU et al., 2007).

O número de cromossomos obtido neste estudo vai de encontro ao descrito na literatura para *A. lacustris* e *A. fasciatus*, que é de 50 e 48, respectivamente (GOES et al., 2020). Deste modo, as duas espécies utilizadas neste trabalho apresentam número de cromossomos distintos e os híbridos diploides e triploides resultantes exibem 49 e 74 cromossomos, respectivamente. Como estes híbridos apresentam um cromossomo extra (sem par de homólogo), esta condição, provavelmente, irá alterar a gametogênese, não permitindo a formação de gônadas e gerando peixes estéreis ou com baixa capacidade reprodutiva (BARTLEY; RANA; IMMINK, 2000).

Em relação à identificação de ploidia, as técnicas utilizadas foram a citogenética e a citometria de fluxo, métodos já consolidados para confirmar a poliploidia em peixes (DO NASCIMENTO et al., 2019, 2020a; MARTINS et al., 2020). Por outro lado, também foi possível identificar os híbridos (diploide e triploide) com citometria de fluxo. Esta possibilidade, nunca antes descrita na literatura, evidencia uma outra forma, rápida e eficiente, de identificar estes animais, facilitando o manejo em ambientes de cultivo ou laboratórios.

A vantagem para reversão sexual é que vai garantir 100 % de indivíduos estéreis, sendo assim não iriam se reproduzir, como por exemplo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), quando se masculiniza o lote não sai 100 %, algumas ainda consegue se reproduzir, aumentando a densidade de peixes e diminuindo o crescimento.

Existe poucos trabalhos falando em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), mas neles mostra que o a tilápia triploide pode ser estéril (*Uwe Brämick et al, 1999*), tem um peso maior que o diploide utilizando o mesmo tempo e a mesma alimentação, então existe uma grande vantagem na produção de tilápias triploides, onde caso houver escape não vai ter reprodução no ambiente natural e também a vantagem do ganho de peso para piscicultura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hibridização em *A. lacustris* e *A. fasciatus*, bem como a indução à triploidia é viável e pode ser utilizada em futuros estudos de manipulação cromossômica e transplante de células germinativas. Neste trabalho, pela primeira vez na literatura, também foi possível identificar híbridos de peixes através da citometria de fluxo, o que abre uma gama de oportunidades em futuros estudos na área básica e aplicada. E para a aquicultura se tem uma grande vantagem que é a identificação de híbridos através da citometria de fluxo, onde se pode separar os peixes puros dos híbridos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOV, N. S. DE M. et al. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, nov. 2017.
- ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture**, v. 197, n. 1–4, p. 205–228, 1 jun. 2001.
- BARTLEY, D. M.; RANA, K.; IMMINK, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 325–337, 2000.
- BERNARDINO, G. et al. **Primeira reprodução do tambacu; um híbrido do gênero Colossoma**. Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero Colossoma. **Anais...Pirassununga**: 1986.
- BERTOLINI, R. M. et al. Strategies for aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*. **Aquaculture International**, v. 28, n. 1, p. 127–137, 1 fev. 2020.
- BERTOLINI, R. M. R. M. et al. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, p. 68–74, 2018.
- CLEVELAND, B. M.; WEBER, G. M. Effects of triploidy on growth and protein degradation in skeletal muscle during recovery from feed deprivation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 166, n. 1, p. 128–137, 1 set. 2013.
- DO NASCIMENTO, N. F. et al. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471, p. 163–171, mar. 2017.
- DO NASCIMENTO, N. F. et al. **In vivo storage of oocytes leads to lower survival, increased abnormalities and may affect the ploidy status in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Zygote (2019) 27 (190) DOI: 10.1017/S0967199418000643)**Zygote, 2019.
- DO NASCIMENTO, N. F. et al. High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock: The first case in Neotropical characins. **Aquaculture**, v. 520, 2020a.
- DO NASCIMENTO, N. F. et al. The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism. **Aquaculture**, v. 514, p. 734432, 2020b.
- DO NASCIMENTO, N. F. et al. Heat-induced triploids in *Brycon amazonicus*: a strategic fish species for aquaculture and conservation. **Zygote**, v. 29, n. 5, p. 372–376, 2021.
- DUNHAM, R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology. Genetic Approaches**. [s.l.: s.n.]. v. 53

FELIP, A.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. Older triploid fish retain impaired reproductive endocrinology in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 10, p. 2657–2669, 1 dez. 2009.

FRASER, T. W. K. et al. Welfare Considerations of Triploid Fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 20, n. 4, p. 192–211, 2012.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. 1. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2003.

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

GOES, C. A. G. et al. Cytogenetic markers as a tool for characterization of hybrids of *Astyanax* Baird & Girard, 1854 and *Hyphessobrycon* Eigenmann, 1907. **Comparative Cytogenetics**, v. 14, n. 2, p. 231–242, 2020.

GOLPOUR, A. et al. Induced sterility in fish and its potential and challenges for aquaculture and germ cell transplantation technology: A review. **Biologia (Poland)**, v. 71, n. 8, p. 853–864, 1 ago. 2016.

KOMEN, H.; THORGAARD, G. H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 150–173, 2007.

LU, W. T. et al. Comparative study of erythrocytes of polyploid hybrids from various fish subfamily crossings. **Cell and Tissue Research**, v. 336, n. 1, p. 159–163, 2009.

LUCENA, C. A. S. DE; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101–125, 2016.

LUTZ, C. G. **Practical Genetics for Aquaculture**. [s.l.] Fishing News Books, 2003. v. 4

MARTINS, L. F. L. F. et al. Return temperature after heat shock affects the production of tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Zygote**, v. 29, n. 1, p. 82–86, 2020.

MORISHIMA, K.; YOSHIKAWA, H.; ARAI, K. Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus loach* derived from a clonal lineage. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 581–586, 2008.

OKUTSU, T. et al. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517, 2007.

OPSTAD, I. et al. The effect of triploidization of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on survival, growth and deformities during early life stages. **Aquaculture**, v. 388–391, p. 54–59, 15 abr. 2013.

PAZZA, R.; NUCLEUS-CALCUTTA-, K. K.-; 2007, UNDEFINED. Chromosomal evolution in the neotropical characin *Astyanax* (Teleostei, Characidae). **researchgate.net**, 2007.

PEIXE BR, P. **Anuário Peixe BR de Piscicultura**, 2023. Disponível em:

<<https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>>. Acesso em: 24 abr. 2022

PEREIRA-SANTOS, M. et al. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 795–807, 2016.

PIFERRER, F. et al. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v. 293, n. 3–4, p. 125–156, 2009.

PIVA, L. H. et al. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? **Theriogenology**, v. 108, p. 239–244, 1 mar. 2018.

RAHMAN, M. A. et al. Hybridization and Its Application in Aquaculture. In: **Sex Control in Aquaculture**. [s.l.] wiley, 2018. p. 163–178.

SCHULZ, U. H.; MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 615–622, 2001.

TERÁN, G. E.; BENITEZ, M. F.; MIRANDE, J. M. Opening the Trojan horse: Phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 190, n. 4, p. 1217–1234, 2020.

XAVIER, P. L. P. et al. A flow cytometry protocol to estimate DNA content in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. SEP, 2017.

YASUI, G. S. et al. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **animal**, v. 9, n. 3, p. 464–470, 2015.

YASUI, G. S. et al. Triploidization in the streaked prochilod *Prochilodus lineatus* inferred by flow cytometry, blood smears and karyological approaches. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 36, n. 3, p. 339–344, 1 jun. 2020.

ZHANG, X.; ONOZATO, H. Hydrostatic pressure treatment during first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one. **Aquaculture**, v. 240, p. 101–103, 2004.

Institute of Animal Husbandry and Genetics, University of Göttingen, A.-Thaer-Weg 3, Göttingen, D-37075, Germany.