

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Temperatura pós choque e a produção de tetraploides em
Astyanax altiparanae.**

LEANDRO FREITAS MARTINS

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2019

Temperatura pós choque e a produção de tetraploides em
Astyanax altiparanae.

LEANDRO FREITAS MARTINS

Orientador: PROF. Dr^a. CLEONICE CRISTINA HILBIG

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados, como
parte das exigências para conclusão do curso de
Engenharia de Aquicultura.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M386t Martins, Leandro Freitas

Temperatura pós choque e a produção de tetraploides em *Astyanax altiparanae*. [recurso eletrônico] / Leandro Freitas Martins. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Cleonice Cristina Hilbig.

TCC (Graduação em Engenharia de Aquicultura)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. citometria de fluxo. 2. manipulação cromossômica. 3. poliploidia. I. Hilbig, Cleonice Cristina.
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

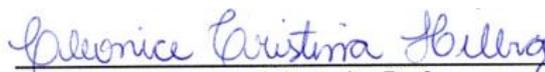
**Temperatura pós choque e a produção de tetraploides em
Astyanax altiparanae.**

Por

Leandro Freitas Martins

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de ENGENHEIRO DE AQUICULTURA

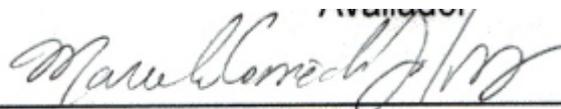
Aprovado em: 14 de novembro de 2019.



Prof. Dr^a. Cleonice Cristina Hilbig
Orientador – UFGD/FCA



Prof. Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento
Membro da Banca – UFGD/FCA



Prof. Dr. Marcelo Correa da Silva
Membro da Banca – UFGD/NUPACE



Prof. Dr. George Shigueki Yasui
Membro da Banca – CEPTA/ICMBio

A meu filho, Carlos Eduardo de Freitas Silva (*in memoriam*) pois foi através dele que obtive força e fé pra sempre prosseguir nessa difícil caminhada.
A minha mãe, por todo amor, compreensão e exemplo de vida.
A Deus, pela saúde e fé.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus...

À minha mãe, Dr^a. Silvane Aparecida de Freitas por me sustentar durante toda a graduação, tempo cheio de dificuldades, mulher guerreira, que apesar de todas as dificuldades não deixou me faltar nada durante toda a graduação e realizar o sonho de me tornar Engenheiro de Aquicultura.

Ao meu pai, Alfredo Luiz Martins, que em toda a minha existência foi um grande parceiro. Meus irmãos, Cecília Freitas Martins e Rogério Freitas Martins, por sempre me apoiarem. Minhas sobrinhas lindas, Mariana e Victória por me encherem de esperança.

Ao meu avô materno, Cecílio Alvez de Freitas (*In memoriam*) que para mim foi um exemplo de vida. E certamente ficaria muito feliz por mais essa vitória em minha vida.

A professora Dr^a Cleonice Cristina Hilbig, por ter me acolhido tão bem e por todo o aprendizado transmitido durante meus anos de academia. Uma professora que foi orientadora, mãe e amiga.

Aos demais professores da Faculdade de Ciências Agrárias, pois com cada um aprendi algo importante para a minha formação acadêmica, não só assuntos referentes ao curso, mas também que me fizeram amadurecer e ser um profissional de qualidade.

Aos amigos que tive o prazer de fazer na primeira turma de Engenharia de Aquicultura, apelidado carinhosamente de “Veterano de todos, calouros de ninguém” foram eles: Ana Carolina Campos, Agnes Marques, Amanda Held, Igor Ferreira, Lucas Pinheiro, Yasmim Casa Dias, Natiele Inacio, Gabriela Bom Ribeiro, Gustavo Ferri, Paulo Vitor, Tiago Pael, Wesley Barbieri, Fabricio Carneiro.

Ao professor Dr^o Nivaldo Ferreira do Nascimento, que muito me ajudou na orientação do TCC e estágio obrigatório.

Ao professor Dr^o Marcelo Corrêa da Silva, amigo e parceiro sempre me auxiliando na vida acadêmica e pessoal.

Ao professor Dr^o George Shigueki Yasui, por ter aberto as portas do laboratório de biotecnologia de peixes do CEPTA, para que essa pesquisa fosse realizada.

Aos amigos que fiz em outras turmas do curso de Engenharia de Aquicultura.

E não menos importantes, agradeço aos amigos que fiz no Campus UFGD, durante toda a graduação, sou eternamente grato.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Aquicultura no Brasil e produção de lambari	11
2.2. Poliploidia e produção de peixes triploides	12
2.3. Produção de Tetraploides e otimização dos protocolos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Comitê de ética	14
3.2. Reprodução induzida	14
3.3. Produção de peixes tetraploides.....	14
3.4. Desenvolvimento Embrionário	15
3.5. Citometria de fluxo	Erro! Indicador não definido.
3.6. Análise Estatística.....	16
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO.....	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Conteúdo relativo de DNA de um peixe diploide (A) e tetraploide (C) de *Astyanax altiparanae*. Larva normal diploide (B) e anormal tetraploide (D). 1 – Espermatozoide (haploide); 2: controle (diploide); 3: tetraploide.20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sobrevivência no desenvolvimento de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes temperaturas (22 °C; 26 °C e 28 °C) pós-choque (40°C; 2min) para indução de peixes tetraploides.	18
Tabela 2. Ploidia de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes temperaturas pós-choque (40°C; 2 mpf por 2 min) para indução de peixes tetraploides.....	19

MARTINS, Leandro Freitas. **Temperatura pós choque e a produção de tetraploides em *Astyanax altiparanae***. 2019. 28p. Monografia (Graduação em Engenharia de Aquicultura) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes temperaturas pós-choque para obtenção de peixes tetraploides em lambari (*Astyanax altiparanae*). Os ovos recém-fertilizados foram divididos em quatro grupos, sendo três submetidos a choque de temperatura (40°C por 2 minutos) com 24 minutos pós-fertilização (mpf) e outro grupo controle que permaneceu intacto. Os grupos submetidos ao choque de temperatura foram posteriormente separados nas seguintes temperaturas: 22°C, 26°C e 28°C. Foi contabilizada a sobrevivência ao longo do desenvolvimento embrionário e na eclosão, momento em que foi verificado o percentual de larvas normais e anormais, bem como a ploidia, analisada por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a temperatura pós-choque afetou as variáveis analisadas e, portanto, tal variável deve ser considerada para otimizar a produção de peixes tetraploides em *A. altiparanae*. Estes dados são inovadores e poderão ser utilizados em futuros estudos de biologia básica e aplicada nesta espécie.

Palavras-chave: citometria de fluxo; manipulação cromossômica; poliploidia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate different post-shock temperature for tetraploid induction in the lambari (*Astyanax altiparanae*). Newly fertilized eggs were divided into four groups, three were submitted to heat shock (40°C for 2 minutes) at 24 minutes post-fertilization (mpf) and another group remained without shock (control). Groups submitted to temperature shock were further separated at the following temperatures: 22 ° C, 26 ° C and 28 ° C. Survival among embryonic development was counted and at hatching the ploidy was analyzed by flow cytometry. The results showed that the post-shock temperature affects the analyzed variables and, therefore, must be considered for optimization the production of tetraploid in *A. altiparanae*. Those data are innovative and could be used in future studies of basic and biology in this species.

Keywords: chromosome manipulation; flow cytometry; polyploid.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento populacional a demanda por proteína animal oriunda da aquicultura só cresce, em especial pela estagnação da pesca extrativa desde a década de 1980 (FAO, 2018). Neste cenário, é imperativo que a produção deva estar atrelada a tecnologias inovadoras, de forma a aumentar a produtividade e otimizando os recursos, reduzindo assim os impactos ambientais. A exemplo do que ocorre em vegetais, como trigo, banana, cítricos, a biotecnologia aplicada a aquicultura é uma das ferramentas que pode auxiliar nesse processo, sendo a manipulação cromossômica através da produção de organismos poliploides uma interessante alternativa.

Dentre os poliploides, destaca-se a produção de organismos triploides, os quais apresentam várias vantagens em relação aos diploides, como esterilidade, maior crescimento, maior rendimento de carcaça e qualidade da carne (TIWARY; KIRUBAGARAN e RAY, 2004; ARAI e FUJIMOTO, 2018). No entanto, para a indução de tais organismos são geralmente utilizados choques de temperatura ou de pressão, os quais podem não ser 100% efetivos e ainda levar a redução na sobrevivência na fase larval (PIFERRER et al., 2009).

Como forma de contornar estes problemas pode-se utilizar gametas diploides provenientes de peixes tetraploides, para que, com um simples cruzamento, proles 100% triploides sejam produzidas, aumentando assim a sobrevivência larval e facilitando o manejo (SAKAO et al., 2006). No entanto, protocolos de tetraploidização são difíceis de obter, em especial pela baixíssima sobrevivência e alta taxa de larvas anormais (YOSHIKAWA et al., 2008).

Em qualquer protocolo de poliploidização, vários aspectos devem ser considerados, como o momento, duração e intensidade do choque, os quais podem significativamente influenciar o sucesso do protocolo (ARAI, 2001; PIFERRER et al., 2009). Portanto, devido à dificuldade na produção de peixes tetraploides, estudos que possibilitem otimizar os protocolos existentes são necessários, sendo que esses parâmetros são espécie-específicos. A produção de tetraplóides emprega três etapas importantes: 1) Fertilização, realizado pelo método “seco”; 2) tetraploidização, utilizando-se choques de temperatura ou pressão e 3) incubação dos embriões em temperatura fisiológica. Quando a tetraploidização é realizada por choques de temperatura, os embriões recém fertilizados são submetidos a temperaturas altas (i.e. 40°C, 41°C, etc) por poucos minutos (NASCIMENTO et al., in press) . Posteriormente, os embriões são levados à incubação, onde são mantidos em temperatura fisiológica. Entre as variáveis importantes para otimizar a produção de tetraploides, estão: temperatura de

incubação, momento do choque para tetraploidização, temperatura ou intensidade da pressão hidrostática para tetraploidização (PIFERRER et al., 2009).

Neste aspecto, ainda não existe na literatura trabalhos que avaliassem o efeito da temperatura pós-choque na obtenção de peixes tetraploides e, portanto, o objetivo deste estudo é analisar seu efeito na produção de lambaris (*Astyanax altiparanae*) tetraploides.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aquicultura no Brasil e produção de lambari

Nas últimas décadas, a aquicultura mundial vem apresentando um crescimento constante, principalmente pelo aumento da demanda por pescado e estagnação da pesca (FAO, 2016). Neste cenário, o Brasil é um país com alto potencial para produção, pois além de possuir um clima favorável, possui uma grande reserva hídrica, com aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta (DIEGUES, 2006). Assim, mesmo com a crise econômica, a produção de peixes no Brasil cresceu 4,5% em 2018, totalizando 722 mil toneladas e uma movimentação financeira de R\$ 5,6 bilhões, como observado pelo recente relatório da Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR, 2018). Ainda, de acordo com o mesmo relatório, a atividade gera cerca de um milhão de empregos diretos e indiretos no país. Embora grande parte dessa produção seja de tilápias (51,7 %)(PEIXE BR, 2018), a produção de uma espécie nativa é estratégica, pois gera um produto diferenciado e livre de concorrentes no mercado internacional.

Em relação as espécies nativas, o lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), que anteriormente era uma espécie ignorada para cultivo, atualmente tem despertado interesse dos aquicultores, devido à utilização como isca viva ou para o consumo direto como petisco (PORTO-FORESTI et al., 2010). Assim, no ano de 2015, foi registrado a produção de 244.730 kg (IBGE, 2016) e mesmo que este valor represente pouca participação em relação as outras espécies, o cenário de crescimento da atividade é animador.

Devido ao pequeno porte, rusticidade, ciclo reprodutivo curto (quatro meses) e facilidade na reprodução, o lambari também vem sendo utilizado como um organismo modelo em estudos de biologia básica e aplicada. Assim, vale citar os estudos iniciais de reprodução artificial desenvolvidos por YASUI et al. (2015) e embriogênese por (PEREIRA-SANTOS et al., 2016), que propiciaram a aplicação de diversas técnicas biotecnológicas, como a indução (ADAMOV et al., 2017) e criação de peixes triploides (DO NASCIMENTO et al., 2017;

NASCIMENTO et al., 2017), tetraploides (NASCIMENTO et al., in press) e ginogenéticos (NASCIMENTO et al., 2020). Esse conjunto de ferramentas recentemente desenvolvido pode alavancar a produção, embora ainda existam gargalos para a produção em larga escala, como a otimização de peixes poliploides.

2.2. Poliploidia e produção de peixes triploides

Os peixes, de forma geral são diploides, ou seja, apresentam dois conjuntos de cromossomos homólogos em cada célula, um de origem materna (n) e outro de origem paterna (n) (LUTZ, 2003). Poliploides são organismos com três ou mais conjuntos de cromossomos. Assim, um organismo triploide, tetraploide e hexaploide são poliploides com três, quatro e seis conjuntos de cromossomos homólogos, respectivamente (DUNHAM, 2004).

Poliploides podem ser encontrados na natureza e sua maior incidência é encontrada em plantas do que em peixes (ZHOU e GUI, 2017). Em peixes a indução artificial a triploidia é a forma mais popular de manipulação cromossômica (TIWARY; KIRUBAGARAN e RAY, 2004; PIFERRER et al., 2009). Dentre as vantagens da produção de peixes triploides está a possível esterilidade, maior crescimento somático, maior sobrevivência devido à menor agressividade e melhor conversão alimentar (LUTZ, 2003; FELIP; CARRILLO e ZANUY, 2009). Adicionalmente, esta técnica contribui para uma aquicultura mais sustentável, pois se houver escapes durante o cultivo para bacias hidrográficas adjacentes, a contaminação genética será reduzida (LUTZ, 2003), sendo esta técnica desejável na produção de híbridos ou de espécies exóticas.

A esterilidade dos peixes triploides está relacionada a etapa reducional da meiose durante a gametogênese, pois afeta o pareamento de cromossomos (PIFERRER et al., 2009). Uma vez estéreis, a energia que seria utilizada para a reprodução, como comportamentos reprodutivos e maturação de gametas, é canalizada para o crescimento somático (FELIP; CARRILLO e ZANUY, 2009) e os triploides passam a ter um maior rendimento de carcaça (NASCIMENTO et al., 2017).

A técnica comumente empregada para induzir triploides consiste na inibição da liberação do segundo corpúsculo polar por meio de choques de temperatura, químico ou pressão (ARAI, 2001). No entanto, esse procedimento pode não ser 100% efetivo, como observado em *Astyanax altiparanae*, onde o choque de temperatura resultou na produção de 92% de peixes triploides e 8% diploides (ADAMOV et al., 2017). Além disso, os choques

aplicados podem afetar negativamente a sobrevivência e o crescimento dos organismos triploides (MALISON et al., 1993; OPSTAD et al., 2013). Assim, uma solução simples para este problema seria cruzar peixes diploides com tetraploides, evitando os malefícios causados pelos choques supramencionados.

2.3. Produção de Tetraploides e otimização dos protocolos

A tetraploidização é uma técnica de manipulação cromossômica onde os indivíduos possuem quatro conjuntos de cromossomos homólogos (WEBER et al., 2015). Para produção de peixes tetraploides utiliza-se técnicas similares à triploidização como choques de temperatura, químico ou de pressão (ARAI e FUJIMOTO, 2018). No entanto, os choques são aplicados em outro momento, com o objetivo de inibir a clivagem, através da destruição dos filamentos do fuso mitótico responsáveis pela divisão celular (ZHANG e ONOZATO, 2004).

No entanto, protocolos de tetraploidização são escassos (PIFERRER et al., 2009) e geralmente resultam em baixíssima sobrevivência larval (SAKAO et al., 2006). Outro ponto importante para aplicação desta técnica é a necessidade dos peixes serem viáveis, ou seja, produzirem gametas com viabilidade e capacidade fecundante (ZHAO et al., 2014). Peixes tetraploides viáveis também são difíceis de se obter e são limitados a poucas espécies (YOSHIKAWA et al., 2008) como *Misgurnus mizolepis* (NAM e KIM, 2004) e *Misgurnus anguillicaudatus* (YOSHIKAWA et al., 2008). Assim, uma das maneiras de aumentar a disponibilidade de peixes poliploides é através da otimização de protocolos já existentes, em especial os tetraploides.

Para otimização dos protocolos de poliploidização os estudos se concentram, geralmente, em testar variáveis como o momento, duração e intensidade do choque (LI et al., 2003). No bagre *Pangasius hypophthalmus*, por exemplo, diferença de apenas 1°C nos choques quentes afetou significativamente a produção de tetraploides (HARTONO; WITOKO e PURBOSARI, 2016) e vários estudos já vinham mostrando a grande influência da temperatura no desenvolvimento embrionário de peixes (PEREIRA-SANTOS et al., 2016). Neste sentido, como observado por Diaz et al., (1993), as temperaturas de manutenção pré e pós-choque também podem afetar a taxa de sobrevivência e triploidização em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). No entanto, o efeito desta variável nunca foi avaliado na produção de tetraploides.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

Este estudo foi realizado de acordo com o comitê de ética do uso de animais do centro nacional de pesquisa e conservação da biodiversidade aquática continental (CEUA/CEPTA#0231.000070/2018-63).

3.2. Reprodução induzida

Foram selecionados fêmeas e machos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) previamente mantidos em tanques de alvenaria, com área 10 m² do próprio centro de pesquisa. Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 45% proteína bruta e 4200 kcal kg⁻¹ de energia digestível. Para reprodução artificial foi seguido o protocolo desenvolvido por Yasui et al., (2015). Foram selecionadas dez fêmeas que apresentavam o abdômen abaulado e cinco machos pela presença de espiculas na nadadeira anal. Os peixes selecionados foram levados até o Laboratório de Biotecnologia de Peixes e mantidos em um aquário de 80 litros com temperatura da água de aproximadamente 28°C e aeração constante, para posterior indução hormonal. Os peixes foram induzidos com dose única de extrato de hipófise (3 mgkg⁻¹), aplicando-se na base da nadadeira pélvica. Seis horas após a indução, os gametas foram extrusados. Para tanto, primeiramente, fêmeas e machos foram anestesiados em solução de Eugenol (100 mg L⁻¹). O sêmen foi coletado com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL (Eppendorf, Alemanha), sendo o mesmo imediatamente transferido para um tubo de 1,5 ml contendo 400 µL de solução de Ringer modificado (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl₂, 2,1 mM MgCl₂). A coleta de oócitos foi realizada por extrusão usando uma placa de Petri revestida com filme plástico (Alpfilm, São Paulo, Brasil). Dos animais induzidos apenas dois casais foram utilizados.

3.3. Produção de peixes tetraploides

Com o sêmen e os oócitos obtidos realizou-se a fertilização pelo método seco, ou seja, oócitos de uma fêmea (casal 1) foi inseminada por um macho na placa de Petri, sendo então adicionado água para ativação dos gametas. Procedeu-se da mesma forma para o casal 2. Os ovos fertilizados de cada casal foram separados em quatro grupos e mantidos em quatro

peneiras contendo água em temperatura de 22°C por 24 minutos. Após os 24 minutos, três grupos foram submetidos a um choque de temperatura com água a 40°C por 2 minutos, com movimentação constante da água, utilizando-se uma incubadora com circulação de água. Após o choque, um grupo voltou para temperatura de 22°C, outro foi para temperatura de 26°C e a último para 28°C. O grupo controle não foi submetido ao choque de temperatura e permaneceu em água a 22°C. Essas temperaturas estão dentro da faixa fisiológica para a incubação, nesta espécie (PEREIRA-SANTOS et al., 2016). Os grupos permaneceram nas temperaturas testadas por aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, uma alíquota de cada grupo (aproximadamente 100 ovos) foi transferida para placas de Petri (90 mm) para acompanhar a sobrevivência ao longo do desenvolvimento embrionário.

3.4.Desenvolvimento Embrionário

A sobrevivência no decorrer do desenvolvimento embrionário foi acompanhada para as fases de clivagem, blástula, gástrula, somito e eclosão, bem como a presença de larvas normais e anormais, com auxílio do estereomicroscópio (Nikon SMZ 18, Tóquio, Japão) como descrito por Pereira-Santos et al (2016). Para garantir a qualidade, a água das placas foi renovada periodicamente e os embriões mortos foram removidos ao longo do experimento.

3.5.Confirmação da ploidia

Larvas recém eclodidas de todos os tratamentos foram avaliadas para confirmação da ploidia utilizando citometria de fluxo de acordo com o protocolo desenvolvido por Xavier et al (2017). As amostras foram previamente submetidas a uma solução de lise celular para a liberação dos núcleos (9,53 mM MgSO₄.7H₂O, 47,67mM KCl, 15 mM Tris, 74 mM Sacarose e 0,8% de Triton X-100) e posteriormente coradas com o corante fluorescente 4',6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). O conteúdo de DNA foi então analisado em citometro de fluxo (CyFlow Ploidy, Analyzer, Partec, GmbH, Alemanha). O sêmen de peixes diploides foi utilizado como grupo controle haploide (1C). Com os dados de citometria de fluxo foram calculadas a porcentagem geral e viável (= % de peixes tetraploides x % larvas normais) de peixes tetraploides.

3.6. Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparação múltipla de médias de Tukey a 5% de probabilidade por meio de programa STATISTICA 10 (StatSoft, USA).

4. RESULTADOS

A sobrevivência ao longo do desenvolvimento embrionário é detalhada na Tabela 1. De forma geral, não foi verificada diferença entre os tratamentos para os estágios de clivagem ($P = 0,9539$), blástula ($P = 0,9541$), gástrula ($P = 0,7943$), somito ($P = 0,4872$) e eclosão ($P = 0,6431$). No entanto, a morfologia, expressa pelos percentuais de larvas normais e anormais, foi afetada (Figura 1B, 1D) (Tabela 1), sendo o grupo controle aquele que apresentou menor porcentagem de larvas anormais ($2,46 \pm 0,07\%$; $P = 0,0421$) em relação aos demais tratamentos (Tabela 1).

Os resultados da citometria de fluxo (Figura 1A, 1C) mostraram que a maior porcentagem geral de peixes tetraploides foi verificada para o tratamento com 26°C (99,77%) e a menor para o tratamento com 22°C (55,88%). Levando em consideração a deformidade larval, o número de tetraploides viáveis foi de $20,49 \pm 17,60\%$, número muito inferior ($P = 0,0230$) aos 52% de larvas tetraploides viáveis obtidos para as demais temperaturas (Tabela 2).

Tabela 1. Sobrevivência no desenvolvimento de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas (22 °C; 26 °C e 28 °C) pós-choque (40°C; 2min) para indução de peixes tetraploides.

Tratamentos	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)
Controle	99,68 ± 0,01	99,05 ± 0,01	84,90 ± 0,15	83,96 ± 0,16	80,18 ± 0,20	97,53 ± 0,02 ^a	02,46 ± 0,02 ^a
22	99,60 ± 0,01	99,60 ± 0,01	94,04 ± 0,03	35,41 ± 0,23	29,27 ± 0,17	31,25 ± 0,19 ^b	68,75 ± 0,19 ^b
26	99,62 ± 0,01	99,25 ± 0,01	94,07 ± 0,02	46,48 ± 0,27	46,48 ± 0,27	51,41 ± 0,04 ^{ab}	48,57 ± 0,04 ^{ab}
28	99,35 ± 0,01	99,35 ± 0,01	94,23 ± 0,05	32,90 ± 0,27	32,90 ± 0,27	64,12 ± 0,07 ^{ab}	35,87 ± 0,07 ^{ab}
<i>P-value</i>	0,9539	0,9541	0,7943	0,4872	0,6431	0,0421	0,0421

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA; $P < 0,05$).

Tabela 2. Ploidia de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas pós-choque (40°C; 2 mpf por 2 min) para indução de peixes tetraploides.

Tratamentos	Ploidia		Tetraploides (%)	Tetraploides viáveis (%)*	
	2n	4n			
Controle	40	0	0	0,00 ± 0,00 ^a	
22°C	15	19	55,88	20,49 ± 17,60 ^{ab}	
26°C	1	44	97,77	52,27 ± 2,65 ^b	
28°C	5	21	80,76	52,49 ± 0,60 ^b	
<i>P-value</i>		-		0,0230	

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (ANOVA; $P < 0,05$). * Tetraploides viáveis = % de eclosão x % de larvas normais.

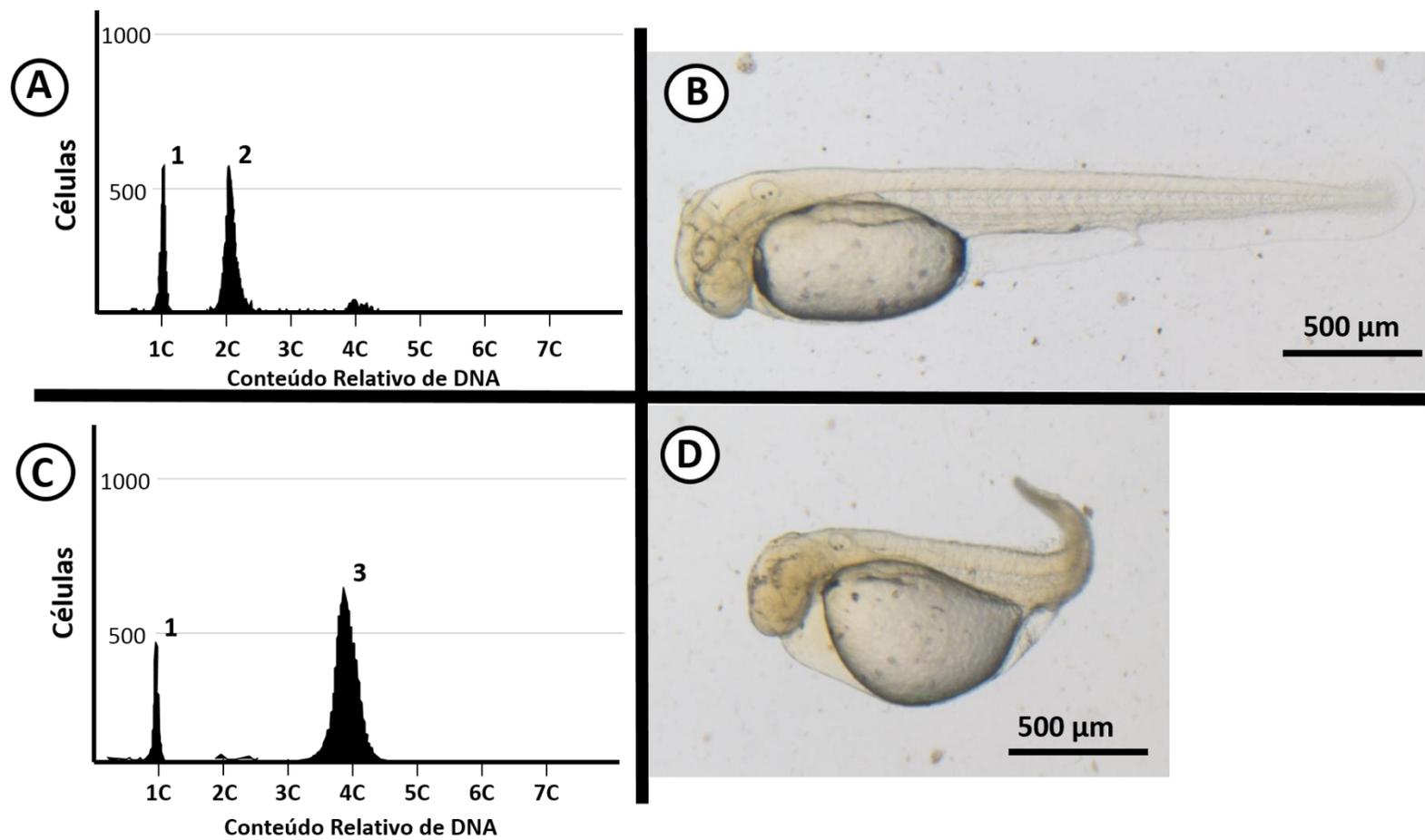


Figura 1 Conteúdo relativo de DNA de um peixe diploide (A) e tetraploide (C) de *Astyanax altiparanae*. Larva normal diploide (B) e anormal tetraploide (D). 1 – Espermatozoide (haploide); 2: controle (diploide); 3: tetraploide.

5. DISCUSSÃO

O protocolo empregado neste estudo foi baseado no trabalho de Nascimento et al., (in press) que utilizaram choque térmico (40°C) com duração de dois minutos para indução de peixes tetraploides em *Astyanax altiparanae*. Embora os autores tenham utilizado a temperatura pré-choque de 22°C e pós-choque de 26°C, não foram avaliadas outras temperaturas pós-choque. Adicionalmente, não existe na literatura estudos mostrando que esta variável pode afetar a produção de organismos tetraploides.

Dentre todos os tratamentos testados, resultados negativos (baixa sobrevivência e porcentagem de tetraploides) foram obtidos para a temperatura de 22°C. De forma geral, peixes tetraploides apresentam baixa sobrevivência, o que pode ser devido a vários fatores, como mosaicismos, aneuploidia, desenvolvimento assincrônico ou ainda pela alta homozigose (ZHANG e ONOZATO, 2004; FUJIMOTO et al., 2013). Em relação a alta taxa de peixes anormais, HARTAMI et al. (2018) mostraram que está diretamente ligada à aplicação de choques quentes para tetraploidização em *Pangasianodon hypophthalmus*, principalmente devido a danos na membrana embrionária.

Portanto, embora todos os tratamentos apresentassem maior percentual de peixes anormais em relação ao controle, os resultados negativos para a temperatura de 22°C deve-se, provavelmente, a maior amplitude térmica deste tratamento em relação aos demais, sendo 18°C de amplitude. Já para os outros tratamentos, as diferenças foram de 14 e 12°C. Na literatura diversos estudos já mostraram que a temperatura afeta significativamente o desenvolvimento embrionário em peixes. No caso de *A. altiparanae*, Pereira-Santos et al. (2016) observaram que o tempo de eclosão a 22°C e 30°C é de, aproximadamente, 25 e 11 horas, respectivamente. Portanto, quanto maior a temperatura mais rápido a velocidade de desenvolvimento, e vice-versa.

Por conseguinte, é esperado que a influência da temperatura também seja refletida nos choques de temperatura para indução de peixes poliploides. Ainda nesta espécie, Adamov et al. (2016) observaram que a temperatura ideal para produção de peixes triploides foi de 40°C e que a temperatura de 38°C resultou em baixíssima taxa de indução. Por outro lado, a temperatura de 42°C resultou em total mortalidade dos embriões. Assim, como evidenciado, uma diferença muito pequena, de apenas 2°C, pode afetar significativamente os resultados obtidos. Em relação a peixes tetraploides, Hartono et al. (2016), testaram choques de temperaturas de 39, 40 e 41°C para a indução a tetraploidia no bagre *Pangasius*

hypophthalmus, e o melhor tratamento (40°C por/150 segundos) resultou numa porcentagem de 28,33%, sendo que as demais temperaturas testadas obtiveram a produção de tetraploides abaixo de 10%. Portanto, em uma diferença de apenas 1°C, resultados muito distintos já puderam ser observados.

Assim, é de se esperar que além das temperaturas de choque, aquelas de manutenção pré e pós-choque também possam afetar a sobrevivência e taxa de poliploidização. De acordo com Diaz (1993) a temperatura de manutenção pré e pós-choque é fator determinante para obtenção de triploides de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os autores verificaram que quanto maior a amplitude da temperatura, maior a porcentagem de triploidização, portanto, resultados similares podem ter sido verificados no presente estudo.

Deste modo, os dados do presente estudo indicam que devem haver uma faixa de temperatura pós-choque ideal para a manutenção dos embriões e que garantem maior sobrevivência. Adicionalmente, como os protocolos de tetraploidização são escassos e difíceis de se obter, principalmente pela baixa sobrevivência (SAKAO et al., 2006), estudos que possibilitem otimizar os protocolos existentes são essenciais.

6. CONCLUSÃO

As temperatura pós-choques afetam a produção de peixes tetraploides em *A. altiparanae*. Estes dados são inovadores e poderão ser utilizados em futuros estudos de biologia básica e aplicada nesta espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOV, N. S. D. M.; NASCIMENTO, N. F. D.; MACIEL, E. C. S.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; CALADO, L. L.; EVANGELISTA, M. M.; NAKAGHI, L. S. O.; GUERRERO, A. H. M.; FUJIMOTO, T. 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, 2017. ISSN 0893-8849.
- ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 205-228, Jun 1 2001. ISSN 0044-8486. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168775000010 >.
- ARAI, K. e FUJIMOTO, T. Chromosome Manipulation Techniques and Applications to Aquaculture. **Sex Control in Aquaculture**, p. 137-162, 2018.
- DIAZ, N.; ITURRA, P.; VELOSO, A.; ESTAY, F.; COLIHUEQUE, N. Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 114, n. 1-2, p. 33-40, 1993. ISSN 0044-8486.
- DIEGUES, A. C. Para uma aquicultura sustentável do Brasil. **São Paulo: Banco Mundial/FAO**, 2006.
- DO NASCIMENTO, N. F.; DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. **Zygote**, p. 1-8, 2017. ISSN 0967-1994.
- DUNHAM, R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Oxford: GABI Publishing, 2004.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. **Contributing to food security and nutrition for all. Rome.** , p. 200, 2016.
- FELIP, A.; CARRILLO, M. e 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, Dec 2009. ISSN 0022-1112. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273899600015 >.
- FUJIMOTO, T.; SAKAO, S.; OSHIMA, K.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Heat-shock-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic in pond loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Aquaculture international**, v. 21, n. 4, p. 769-781, 2013. ISSN 0967-6120.
- HARTAMI, P.; CARMAN, O.; ZAIRIN, M.; ALIMUDDIN, A. Heat Shock and Its Consequences on Early Life Performance of Stripped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Omni-Akuatika**, v. 14, n. 2, 2018. ISSN 2476-9347.
- HARTONO, D. P.; WITOKO, P. e PURBOSARI, N. The effect of heat shock on the tetraploidy of catfish, *Pangasius hypophthalmus*. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation**, v. 9, n. 3, p. 597-603, 2016. ISSN 1844-8143.

IBGE. Produção da pecuária municipal. **Prod Pec Munic**, 2016.

LI, F.; XIANG, J.; ZHOU, L.; WU, C.; ZHANG, X. Optimization of triploid induction by heat shock in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 219, n. 1-4, p. 221-231, 2003. ISSN 0044-8486.

LUTZ, C. G. **Practical Genetics for Aquaculture**. London: Blackwell, 2003.

MALISON, J. A.; PROCARIONE, L. S.; HELD, J. A.; KAYES, T. B.; AMUNDSON, C. H. The influence of triploidy and heat and hydrostatic-pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). **Aquaculture**, v. 116, n. 2-3, p. 121-133, Oct 1 1993. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LZ59100003 >.

NAM, Y. K. e KIM, D. S. Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). **Aquaculture**, v. 236, n. 1-4, p. 575-582, 2004. ISSN 0044-8486.

NASCIMENTO, N. F.; MONZANI, P. S.; PEREIRA-SANTOS, M.; NIEDZIELSKI, D.; SENHORINI, J. A.; SILVA, L. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism. **Aquaculture**, v. 514, p. 734432, 2020. ISSN 0044-8486.

NASCIMENTO, N. F.; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L. H.; MANZINI, B.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471, p. 163-171, 2017. ISSN 0044-8486.

NASCIMENTO, N. F.; PEREIRA-SANTOS, M.; SANTOS, S. A.; NIEDZIELSKI, D.; LEVY-PEREIRA, N.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. Tetraploid induction in the yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae* using temperature shock. **Aquaculture Research**, in press.

OPSTAD, I.; FJELLDAL, P. G.; KARLSEN, Ø.; THORSEN, A.; HANSEN, T. J.; TARANGER, G. L. The effect of triploidization of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on survival, growth and deformities during early life stages. **Aquaculture**, v. 388–391, n. 0, p. 54-59, 4/15/ 2013. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848613000197> >.

PEIXE BR, B. **ANUÁRIO Peixe BR da Piscicultura 2018**. Peixe BR - Associação Brasileira da Piscicultura. São Paulo 2018.

PEREIRA-SANTOS, M.; YASUI, G. S.; XAVIER, P. L. P.; DE MACEDO ADAMOV, N. S.; DO NASCIMENTO, N. F.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O. 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. ISSN 0967-1994.

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIERE, J.-C.; FLAJSHANS, 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. 3-4, p. 125-156, Aug 16 2009. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268150000001 >.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria, Brazil.: Editora UFSM, v.1, 2010. p.101-115.

SAKAO, S.; FUJIMOTO, T.; KIMURA, S.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2-4, p. 147-160, 2006. ISSN 0044-8486.

TIWARY, B.; KIRUBAGARAN, R. e RAY, A. The biology of triploid fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, n. 4, p. 391-402, 2004/12/01 2004. ISSN 0960-3166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-004-8361-8> >.

WEBER, G. M.; HOSTUTTLER, M. A.; SEMMENS, K. J.; BEERS, B. A. Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Canadian journal of fisheries and aquatic sciences**, v. 72, n. 10, p. 1443-1449, 2015. ISSN 0706-652X.

XAVIER, P. L.; SENHORINI, J. A.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A.; DOS SANTOS, S. A.; YASUI, G. S. A flow cytometry protocol to estimate DNA content in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 131, 2017. ISSN 1664-8021.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 03, p. 464-470, 2015. ISSN 1751-732X.

YOSHIKAWA, H.; MORISHIMA, K.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* : a review. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 410-414, 2008/08 2008. ISSN 0175-8659. Disponível em: < <http://ci.nii.ac.jp/naid/120001442845/en/> >.

ZHANG, X. e 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.

ZHAO, Y.; SAITO, T.; PŠENIČKA, M.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Comparison of spermatozoa parameters, fine structures, and energy-related factors among tetraploid, hyper-tetraploid, and hyper-triploid loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 321, n. 4, p. 198-206, 2014. ISSN 1932-5231. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1851> >.

ZHOU, L. e GUI, J. Natural and artificial polyploids in aquaculture. **Aquaculture and Fisheries**, v. 2, n. 3, p. 103-111, 2017. ISSN 2468-550X.

