

KAROLAYNE RIBEIRO DA SILVA OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE POPULAÇÕES TRIPLOIDES DE LAMBARI DO RABO AMARELO
(*ASTYANAX LACUSTRIS*, LÜTKEN, 1875).**

Recife,

03/2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA

**PRODUÇÃO DE POPULAÇÕES TRIPLOIDES DE LAMBARI DO RABO
AMARELO (*ASTYANAX LACUSTRIS*, LÜTKEN, 1875).**

KAROLAYNE RIBEIRO DA SILVA OLIVEVIRA

Equiparação de ESO em Iniciação Científica apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do Bacharel em Engenharia de Pesca.

Prof. Dr. Raquel Coimbra
Orientadora

Msc. Renata da Silva Farias
Coorientadora

Recife,

03/2023

Oliveira, Karolayne Ribeiro da Silva

Produção de populações triploides de lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*, Lütken, 1875) / Karolayne Ribeiro da Silva Oliveira.

-- Recife, 2023

Orientador: Raquel Coimbra

Trabalho de conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2023.

Referência

1. Piaba 2. Triploidia 3. Genética 4. Aquicultura. I. Coimbra, Raquel. II. Farias, Renata da Silva.

Ficha catalográfica

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA

PRODUÇÃO DE POPULAÇÕES TRIPLOIDES DE LAMBARI DO RABO
AMARELO (*ASTYANAX LACUSTRIS*, LÜTKEN, 1875)

Karolayne Ribeiro da Silva Oliveira

ESO/TCC julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca. Defendida e aprovada em 27/03/2023 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Maria Raquel Moura Coimbra

(Orientador) [Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Dr. Luciano Clemente da Silva

(Membro titular)

[Universidade Federal de Pernambuco]

Prof. Dr. Mateus Vitória Medeiros

(Membro titular) [Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. Juliana Ferreira dos Santos

(Membro suplente) [Departamento de Bioquímica]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Agradecimentos

Meu primeiro e maior agradecimento é a Deus por me permitir estar viva e me proporcionar tantas conquistas, apesar das adversidades, por me alinhar e me mostrar o caminho.

Aos meus pais, irmão e tia, Luiz Carlos, Elizabete Ribeiro, Guskarllos Francisco e Débora Monteiro, por toda força, incentivo, por serem minha rocha e exemplos de vida. Não há palavras pra descrever toda gratidão e amor que eu sinto nesse momento, vocês são tudo pra mim.

Meu companheiro de curso e amor, Douglas Lemos, pela paciência, companheirismo, incentivo e por acreditar sempre no meu potencial, ele que nunca me deixou desistir, me fortaleceu e sempre apoiou as minhas decisões.

Agradeço muito pelos amigos que conquistei aqui na “Rural”, por todo apoio que tive e por tudo que enfrentamos ao longo do curso, cada um teve papel importante na minha caminhada até aqui. Amigos esses que eu levo pra vida, obrigada Rural!

A seu Felipe, por ser guia em momentos de desespero, por me colocar em ordem e estar sempre alegre mesmo eu sendo “braba”, como ele diria, por me mostrar Deus nos momentos que eu não enxergava.

Ao meu dog, Bentinho, que me alivia do estresse diário desde que chegou, alegrando meu coração, sendo meu fiel companheiro de brincadeira e palhaçada em casa.

Quero agradecer também a minha querida orientadora Raquel Coimbra, pela confiança que em mim foi colocada, por estar sempre disposta a ouvir e aconselhar, por me disciplinar, porque sem ela o relatório não sairia.

À Renata Farias, amiga e parceira de trabalho, que tanto me ajudou a finalizar os projetos, que sempre esteve comigo no laboratório e foi braço e perna pra mim em vários momentos. Obrigada pela orientação, pelo conhecimento que me passou e pela nossa amizade!

Resumo

A lambaricultura é uma atividade recente cuja tecnologia de produção está em desenvolvimento, mas que representa uma fonte alternativa de renda para pequenos produtores rurais. O lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*) possui seu próprio nicho de mercado e é apreciado como aperitivo em restaurantes, como isca viva para a pesca esportiva e é usado na pesca de atuns. Algumas atividades de manipulação cromossômica viabilizam a produção de animais que atingem resultados de maior crescimento e maior ganho de biomassa. Através da triploidia ($3n$), espera-se que os animais sejam maiores por terem 50% mais material genético que os diploides ou que tenham o desenvolvimento gonadal comprometido podendo canalizar a energia para o crescimento. Neste sentido, o objetivo central deste trabalho foi desenvolver um protocolo de manipulação cromossômica para obtenção de triploides do lambari do rabo amarelo. Os animais adultos foram coletados nos viveiros da Estação Johei Koike (UFRPE), após a seleção, os reprodutores foram aclimatados em dois tanques, uma para cada sexo, com volume útil de 200L cada. Os ovócitos foram extrusados e armazenados em placas de Petri. Em seguida foram retirados os testículos para preparação de uma solução espermática. Foram realizados três ensaios com choques térmicos a frio (5°) e quente (35° e 40°), além de avaliar o momento ideal de aplicação do choque (1, 2 e 4 mpf), bem como a duração (5, 10 e 15 min). Durante os 10 primeiros dias pós-eclosão foi ofertado microalga e náuplios de artêmia divididos em três refeições. Aos 30 dias pós-eclosão, n indivíduos de cada tratamento foram levados para análise de ploidia por citometria de fluxo. Os tratamentos com choque de 5°C e 35°C tiveram os melhores resultados de taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência, em relação ao choque de 40°C . Dos tratamentos realizados, três foram capazes de gerar indivíduos triploides porém apenas o de 5°C teve a maior eficiência - 77,8% - cujo choque foi aplicado um minuto pós fertilização durante 10 minutos). É necessário que sejam realizados testes de desempenho para o crescimento a fim de avaliar a eficiência de triploides sobre o diploide.

Palavras-chave: Aquicultura, ploidia, extrusão, manipulação cromossômica, Ovopel.

Lista de figuras

Página

Figura 1: Aplicação do hormônio Ovopel abaixo da nadadeira do animal.....	13
Figura 2: Calhas que mantinham os reprodutores.....	13
Figura 3: Ovócitos recém extrusados separados em placas de Petri.....	13
Figura 4: Tratamentos com o choque frio ($5^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$)	15
Figura 5: Unidades experimentais utilizadas na manutenção das larvas	16
Figura 6: Perfil de citometria de fluxo do conteúdo de DNA celular de lambari do rabo amarelo (<i>Astyanax lacustris</i>) diploide (a) e triploide (b)	19
Figura 7: Larvas normais (mais à esquerda) e larvas com malformações (lordoses e cifoses)	20
Figura 8: Larva normal (A) e larva anormal T525 com um grau acentuado de lordose.....	20

Lista de tabelas

Página

Tabela 1: Temperaturas, momentos de aplicação e durações dos choques testados para indução à triploidia em lambari do rabo amarelo (<i>Astyanax lacustris</i>).....	14
Tabela 2: Efeito do choque de temperatura nas taxas de fertilização, eclosão e triploidização em lambari do rabo amarelo (<i>Astyanax lacustris</i>).	18

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS	11
OBJETIVO GERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. METODOLOGIA.....	11
Seleção de reprodutores.....	12
Indução hormonal	12
Indução à triploidia - choques térmicos	14
Larvicultura.....	15
<i>Taxa de fertilização, eclosão e sobrevivência</i>	<i>16</i>
Taxa de malformados (%).....	17
<i>Poliploidia</i>	<i>17</i>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de lambari ou lambaricultura é uma atividade cuja tecnologia de produção ainda está em desenvolvimento, mas que representa uma fonte alternativa de renda para pequenos produtores rurais (FONSECA et al., 2017), com uma produção atual de aproximadamente 600 mil Quilogramas (IBGE, 2021). O lambari, *Astyanax lacustris*, popularmente conhecido como sardinha de água doce ou piaba pertence a ordem Characiforme, família Characidae e subfamília Tetragonopterinae (BARBIERI et al., 1982). São peixes pequenos, bentopelágicos, onívoros com tendência insetívora e ciclo de vida curto (AGOSTINHO et al., 2004; SILVA et al., 2012).

A aquicultura de peixes de pequeno porte vem recebendo a atenção mundial sob o slogan “small fish can solve big problems” (RIZALDO, 2018), por ser capaz de combater a insegurança alimentar ao tempo em que oferece um sistema mais eco-friendly de produção pelo fato de se tratar de espécies de nível trófico básico, notadamente herbívoras ou onívoras, diminuindo sensivelmente o custo das rações, e aumentando a produtividade por unidade de biomassa.

O lambari do rabo amarelo possui seu próprio nicho de mercado e é apreciado como aperitivo em restaurantes, mas também como isca viva para a pesca esportiva e amplamente usado na pesca de atuns (VALLADÃO et al., 2018; VALENTI et al., 2021), suportando um bom tempo em água salgada, tendo resultados ecológica e economicamente viáveis. Alcança a maturidade sexual aos quatro meses e desova ao longo de todo o ano (GARUTTI, 2003; PORTO-FORESTI et al., 2005; ABIMORAD AND CASTELLANI, 2011). Estes animais mostram um dimorfismo sexual evidente durante o período reprodutivo em que as fêmeas atingem um tamanho maior, entre 9 e 12 cm, com corpo arredondado e papila urogenital bastante irrigada. Os machos, por outro lado, variam entre 7 e 9cm, com corpo alongado e presença de espículas na nadadeira anal quando maduros (PORTO-FORESTI et al., 2001; GARUTTI, 2003; SÚAREZ et al., 2017).

A manipulação cromossômica viabiliza a produção de animais que atingem resultados de maior crescimento e maior ganho de biomassa, resultando em altos ganhos econômicos, já que produz mais carne de peixe por hectare de lâmina d'água (LAKRA E AYYAPPAN, 2003). Além da ginogênese, que produz populações monossexo femininas, a triploidia é uma forma comum de manipulação na aquicultura que pode ser obtida pela retenção do segundo corpúsculo polar logo após a fertilização dos ovos, o que gera indivíduos com três conjuntos cromossômicos (3n). Do ponto de vista técnico, a triploidia é mais simples de ser obtida do que a ginogênese, que possui uma etapa de eliminação do conteúdo genético do espermatozoide sem matar a célula. Triploides não são transgênicos, eles possuem um conjunto cromossômico a mais enquanto os transgênicos (OGM) são animais que possuem uma alteração genética ao nível do gene, que não ocorrem na natureza. Existem animais em que o processo de triploidia são aplicados de forma eficiente, como com o Salmão e no repovoamento

da carpa Capim. Algumas hipóteses explicam o melhor crescimento do triploide: 1) a esterilidade do triploide faz com que a energia dos alimentos seja dirigida ao crescimento e não a maturar as gônadas (ALLEN et al. 1986; HAND & NELL 1999); 2) os animais triploides têm 50% mais material genético que os diploides (Guo & Allen 1994); 3) o terceiro conjunto cromossômico oferece maior diversidade genética (ALLENDORF & LEARY 1984; GUO et al. 1992) e 4) o terceiro conjunto cromossômico também faz com que o triploide faça transcrições gênicas mais rapidamente (MAGOULAS et al. 2000). Na prática, essas hipóteses se traduzem em animais de melhor crescimento e é uma das formas mais comuns de se aumentar a produtividade de cultivo de espécies aquáticas. A retenção do segundo corpo polar que resulta em triploides pode ser obtida por choques térmicos, a frio ou a quente, dependendo da espécie, empregado logo após a fertilização dos gametas em várias tentativas que gerem um número consistente de triploides sem comprometer a sobrevivência dos embriões (TIWARY et al., 2004). O sucesso da técnica depende de três variáveis principais de acordo com Dunham (2011): temperatura do choque, tempo de aplicação desse choque e duração dele. Assim, empregar a técnica e avaliá-la quanto à viabilidade, dependendo se encontrar um protocolo que garanta um alto número de triploides e uma alta taxa de sobrevivência, uma vez que os choques térmicos podem causar danos aos embriões.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo para a obtenção de triploides em *Astyanax lacustris*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a melhor temperatura, momento pós-fertilização e duração do choque térmico para a retenção do segundo corpúsculo polar;
- Avaliar as taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência;
- Avaliar deformações larvais.

3. METODOLOGIA

Os exemplares da espécie *Astyanax lacustris* que formam a população basal foram provenientes da Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA) – Chesf, localizada no município de Paulo Afonso, Bahia. Esses animais foram mantidos na Estação de piscicultura Prof. Johei Koike, do Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Campus Dois Irmãos (UFRPE/SEDE). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Maricultura Sustentável (LAMARSU) da UFRPE.

Seleção de reprodutores

Os animais adultos foram coletados nos viveiros da Estação Johei Koike e 60 animais (40 fêmeas e 20 machos) foram selecionados após sexagem e avaliação quanto ao estágio de maturação, fêmeas abaloadas e com abdômen macio ao toque, já e os machos apresentam espículas na região da nadadeira anal. Após a seleção, os reprodutores foram aclimatados em dois tanques, um para cada sexo, com volume útil de 200L cada.

Os animais foram anestesiados com eugenol (80 mg/L) e foi realizado uma biometria (comprimento total e peso) com os 60 reprodutores previamente selecionados, destes, 25 exemplares foram selecionados para indução hormonal de acordo com o estágio maturacional, os mais desenvolvidos, sendo 10 fêmeas com peso médio de $12,6g \pm 5,3$ e comprimento total médio de $9,7cm \pm 1,2$, e 15 machos com peso médio de $4,3g \pm 1,2$ e comprimento total médio de $6,8cm \pm 0,7$.

Indução hormonal

As desovas foram induzidas utilizando hormônio sintético Ovopel® [(D-Ala6, Pro9-Net) – mGnRH + metoclopramide] (5 mg kg⁻¹ para machos e fêmeas), com duas doses para as fêmeas, sendo uma dose preparatória de 10%, e entre 180 e 220 horas-grau (SATO et al., 2006; LOPES, 2011) foi aplicada a segunda dose (Figura 1). No mesmo momento da segunda dose das fêmeas, foi aplicada a dose única nos machos. Após a aplicação do hormônio, as fêmeas foram estocadas individualmente, para que se pudesse avaliar a evolução e identificar momento de desova cada fêmea, em unidades experimentais de polietileno de 15L de volume útil, as quais foram dispostas dentro da uma calha de 200L de volume útil (Figura 2). Já os machos foram mantidos juntos em uma calha com volume útil de 200L.

Os ovócitos foram extrusados à seco por massagem abdominal seguindo o protocolo de ROTTMANN *et al.* (1991), quando a fêmea estava liberando espontaneamente os ovócitos, e armazenados em placas de Petri (Figura 3) até o momento de uso. Devido ao pequeno tamanho dos machos e à dificuldade de extrusão do esperma, os animais selecionados foram sacrificados em dose letal de eugenol e em seguida foram retirados os testículos para preparação de uma solução espermática, diluída em soro fisiológico, transferida para tubos de 1,5 mL e armazenada a 4°C. Foi observada a motilidade espermática através de um microscópio óptico, comparando a velocidade entre os animais selecionados e foram escolhidos os animais que tinham maior velocidade espermática.



Figura 1: Aplicação do hormônio Ovopel abaixo da nadadeira do animal



Figura 2: Calhas que mantinham os reprodutores



Figura 3: Ovócitos recém extrusados separados em placas de Petri

Indução à triploidia - choques térmicos

Foram realizados três ensaios com choques térmicos a frio (5°C) e quente (35°C e 40°C), abaixo e acima do limite de temperaturas da espécie (8°C e 32°C) (GARUTTI, 2003). Além de avaliar o momento ideal de aplicação do choque (1, 2 e 4 minutos pós-fecundação – mpf) e a duração do choque (5, 10 e 15 minutos) (Tabela 1), a fim de descobrir o melhor momento para retenção da saída do 2º corpúsculo polar, o qual ocorre aproximadamente aos 6 mpf para esta espécie (PEREIRA-SANTOS et al., 2016).

Tabela 1: Temperaturas, momentos de aplicação e durações dos choques testados para indução à triploidia em lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*).

Tratamentos	Temperatura do choque (°C)	Momento do choque (mpf)	Duração do Choque (min)
T515	5	1	5
T5110	5	1	10
T5115	5	1	15
T525	5	2	5
T5210	5	2	10
T5215	5	2	15
T545	5	4	5
T5410	5	4	10
T5415	5	4	15
Controle 5°C	-	-	-
T3505	35	1	5
T35010	35	1	10
T35015	35	1	15
T3525	35	2	5
T35210	35	2	10
T35215	35	2	15
T3545	35	4	5
T35410	35	4	10
T35415	35	4	15
Controle 35°C	-	-	-
T4005	40	1	5
T40010	40	1	10
T40015	40	1	15
T4025	40	2	5
T40210	40	2	10
T40215	40	2	15
T4045	40	4	5
T40410	40	4	10
T40415	40	4	15
Controle 40°C	-	-	-

Para os testes em cada uma das três temperaturas de choque (5, 35 e 40°C), foi utilizada uma mistura dos ovócitos de três fêmeas e uma mistura de esperma de três machos, que foram divididos igualmente em dez partes, sendo nove tratamentos e três controles. Após a divisão dos ovócitos, foi feito a adição de 200µl da mistura de soluções de esperma, em um tratamento por vez, seguido da hidratação com água, na mesma temperatura da calha dos parentais (26°C±0,5°C), para ativação do processo de fertilização. O momento da adição de água aos gametas foi considerado como o tempo 0 e a partir daí se iniciou a contagem dos minutos pós-fertilização (MPF) para a aplicação do choque térmico.

No momento de aplicação do choque, os ovos foram transferidos para outro recipiente acondicionado em banho-maria (choques quentes) ou em bandeja com gelo (choque frio) (Figura 4). Após a aplicação do choque, os ovos foram retirados e armazenados na mesma temperatura inicial (26°C±0,5°C). No controle, não foi aplicado nenhum tipo de choque de temperatura, contudo esses ovos receberam o mesmo manejo que os tratamentos (ex.: transferência de recipientes etc.).



Figura 4: Tratamentos com o choque frio (5°C±0,5°C)

Larvicultura

Foram utilizadas unidades experimentais de polietileno com volume útil de 5L (Figura 5) para cada tratamento realizado. As unidades foram devidamente etiquetadas e os tratamentos submetidos às mesmas condições físicas.

Aos três dias pós-eclosão (dpe), iniciou-se a alimentação das larvas. Durante os 10 primeiros dias (3° aos 12° dpe) foi ofertado microalga (*Chlorella vulgares*) e náuplios de artêmia (*Artemia franciscana*) recém eclodidos, na densidade de 500 náuplios/larva/dia, divididos em três refeições. No 13° dpe, iniciou-se a substituição gradativa da dieta pelo alimento inerte, sendo ofertada ração em pó contendo 55% de proteína bruta (PB) “ad libitum”. Durante o período experimental, foram aferidos diariamente os valores de oxigênio dissolvido, temperatura e pH, e a cada três dias, amônia e nitrito. Trocas parciais de água foram feitas diariamente de 1/3 do volume útil.



Figura 5: Unidades experimentais utilizadas na manutenção das larvas

Taxa de fertilização, eclosão e sobrevivência

Taxa de fertilização (TF%)

Após 8 horas da fertilização (fechamento do blastóporo) (SATO et al., 2006; WEBER et al., 2012), foi feita a análise de 100 ovos de cada fêmea em triplicata, e verificados os ovos férteis (ovos translúcidos) e os inférteis (opacos) com auxílio de uma lupa simples de 5x de ampliação. Os valores obtidos foram transformados em porcentagem (ROMAGOSA et al., 1990).

$$TF = (\text{Número de ovos viáveis} / \text{Total de ovos}) * 100$$

Taxa de eclosão (TE %)

Foram coletadas três amostras contendo 100 ovos férteis de cada fêmea, e 13 horas após a desova procedeu-se a contagem das larvas eclodidas e dos ovos não eclodidos com auxílio de uma lupa simples de 5X de ampliação. Os valores obtidos foram transformados em porcentagem (AFZAL KHAN, 2005).

$$TE = (\text{Número de ovos eclodidos} / \text{ovos férteis}) * 100$$

Taxa de sobrevivência (TS %)

A taxa de sobrevivência foi avaliada 30 dias após a eclosão, dada pela quantidade de animais no final do período dividido pelo número inicial de indivíduos, o cálculo foi dado da seguinte fórmula:

$$TS = (\text{Número final de indivíduos} / \text{Número inicial de indivíduos}) * 100$$

Taxa de malformados (%)

Foi realizada uma avaliação do desenvolvimento larval da prole para verificar a presença de larvas com deformidades logo após a eclosão. Foram excluídos os animais mortos para não influenciar na sobrevivência. Foram coletadas três amostras contendo 100 larvas e colocados em uma lâmina e observados com o auxílio de um microscópio ótico:

$$TM = (\text{Número de larvas malformadas} / \text{Número inicial de indivíduos}) * 100$$

Poliploidia

Aos 30 dias pós-eclosão, *n* indivíduos de cada tratamento foram levados para análise de ploidia por citometria de fluxo. Para isso, cada amostra foi digerida em tampão WPB (2000 µl), a suspensão nuclear foi filtrada em malha de 25 µm, corada com iodeto de propídeo (20 µl) e em seguida lida no citômetro Accuri C6 (BD Biosciences, USA), com auxílio do software FlowJo. As amostras referentes aos respectivos grupos controles, foram utilizadas como padrão interno diploide (2n) para comparação com as amostras dos tratamentos e calibração do citômetro. As análises foram realizadas no Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o período experimental, as médias de temperatura ($25,03 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,01$), pH ($7,58 \pm 0,32$), oxigênio dissolvido ($6,68 \text{ mg/l} \pm 0,04$), amônia total ($1,62 \text{ ppm} \pm 1,20$) e nitrito ($0,88 \text{ ppm} \pm 0,87$) se mantiveram entre os valores aceitáveis para a espécie em todos os tratamentos. As maiores variações nas concentrações de amônia e nitrito foram observadas após início da oferta de alimento inerte, possivelmente devido à rápida lixiviação da ração em pó de alto índice proteico na água.

Os tratamentos com choque de 5°C e 35°C tiveram os melhores resultados de taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência, em relação ao choque de 40°C (Tabela 2). Num estudo feito por Adamov (2017) altas porcentagens de animais triploide foram obtidos no tratamento de choque a 40°C , porém com duração de 2 minutos para fertilização e tempo de choque. Isso indica que o para essa temperatura choques com durações maiores inviabiliza o processo de desenvolvimento larval, como também foi percebido nos nossos resultados.

Para o choque frio, os tratamentos T515 e T545 tiveram taxa de sobrevivência equivalentes ao controle (~88%), e a taxa de triploidização foi a mesma entre eles, sendo 0%, esse resultado indicando indivíduos diploides. Dentre os tratamentos de 35°C o T35010 foi o que obteve melhor taxa de eclosão e sobrevivência quando comprado ao respectivo controle, mas não obteve o resultado esperado (triploides). Já nos tratamentos de 40°C , o T4045 e o T4025 obtiveram resultados de

sobrevivência maiores que o controle, ao passo que os outros não obtiveram resultados próximos devido à eclosão e sobrevivência negativa dos outros tratamentos. Para os choques quentes é possível verificar que quanto maior a temperatura e a duração do choque, menor será a taxa de eclosão, enquanto o choque frio obteve resultados mais próximos do esperado (semelhante ao controle frio). O *n* é o número de indivíduos que foi analisado.

Tabela 2: Efeito do choque de temperatura nas taxas de fertilização, eclosão e triploidização em lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*).

Tratamentos	Tx de fertilização (%)	Tx de eclosão (%)	Tx de malformações (%)	Sobrevivência (%) *	<i>n</i>	Taxa de triploidização (%)
T515	37,7	82,3	2,5	88,0	13	0
T5110	39,3	46,0	19,6	84,6	9	77,8
T5115	55,7	44,1	30,0	85,3	6	66,7
T525	45,0	43,4	7,1	75,0	13	0
T5210	42,3	34,9	8,6	85,4	13	0
T5215	42,7	23,8	3,4	75,2	1	0
T545	38,3	72,5	0,0	88,8	2	0
T5410	33,3	50,9	4,8	78,1	5	14,3
T5415	37,3	22,4	7,1	78,0	7	0
Controle 5°C	53,3	64,8	0,5	88,3	20	0
T3505	38,3	58,1	2,1	92,4	15	0
T35010	55,3	87,4	2,4	88,5	5	0
T35015	33,3	31,5	7,2	87,0	15	0
T3525	17,3	35,5	1,0	83,4	15	0
T35210	22,3	29,9	0,0	74,5	15	0
T35215	46,0	10,2	21,3	85,3	12	0
T3545	13,3	14,1	1,9	88,5	15	0
T35410	18,0	21,8	1,1	86,2	15	0
T35415	16,0	0,7	0,0	0,0	-	-
Controle 35°C	56,7	74,4	0,0	83,4	30	0
T4005	8,5	0,4	60,0	40,0	1	0
T40010	11,0	0,0	-	-	-	-
T40015	0,0	0,0	-	-	-	-
T4025	16,5	3,1	59,1	56,1	2	0
T40210	7,0	0,0	-	-	-	-
T40215	0,0	0,0	-	-	-	-
T4045	39,5	21,4	41,4	71,4	13	0
T40410	9,0	0,0	-	-	-	-
T40415	0,0	0,0	-	-	-	-
Controle 40°C	51,3	21,9	0,7	43,6	20	0

* Sobrevivência aos 30 dias pós-eclosão

A citometria de fluxo auxilia na determinação de ploidia analisando o DNA celular (Thorgaad et al., 1982). De todos os tratamentos realizados, apenas três foram capazes de gerar indivíduos triploides (Figura 6), todos os três foram com o choque frio (5°C). Dentre eles, o que obteve a maior taxa de triploidização (77,8%, valor encontrado a partir da análise de citometria de 100% dos animais do respectivo tratamento) foi o tratamento frio cujo choque foi aplicado um minuto pós fertilização durante 10 minutos. Esse é um fator que difere entre espécies (momento e duração do choque).

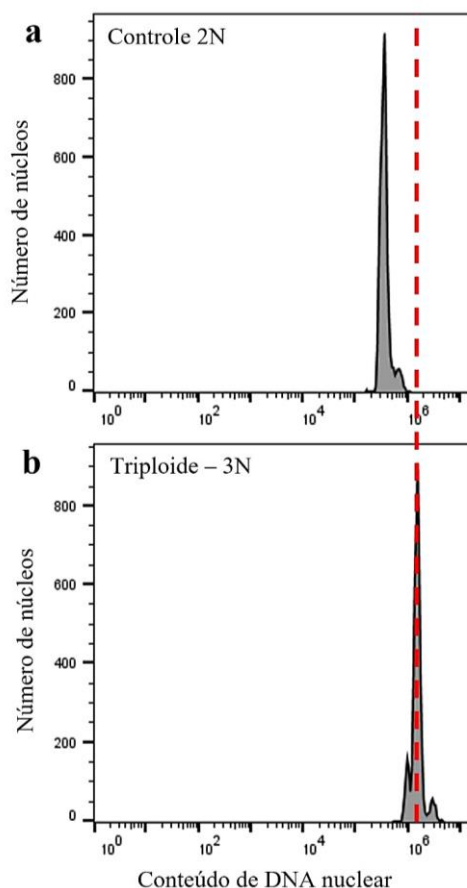


Figura 6: Perfil de citometria de fluxo do conteúdo de DNA celular de lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*) diploide (a) e triploide (b)

As taxas malformações encontradas foram diferentes entre os tratamentos, sendo vistas na coluna do animal (lordoses e cifoses) (Figura 7). De acordo com os dados, observa-se que a duração do choque pode influenciar no desenvolvimento dessas malformações, sendo que os tratamentos com maior duração tiveram taxas mais altas e os de menor duração as taxas foram menores. Os tratamentos com choques a 40°C tiveram as taxas mais altas, podendo estar associado à interação dos ovos com a alta temperatura dos choques que está muito acima do limite estabelecido para a espécie (32°C).

Malison (1993) descreve que os choques podem afetar a sobrevivência e o desenvolvimento dos organismos triploides negativamente, então talvez a solução seria desenvolver protocolos para a

obtenção de tetraploides (4n). Assim, como este produziria gametas 2n, seriam simplesmente cruzados com fêmeas diploides, evitando a aplicação de choques, gerando indivíduos triploides (3n) interploides (reprodutor 4n x reprodutor 2n).

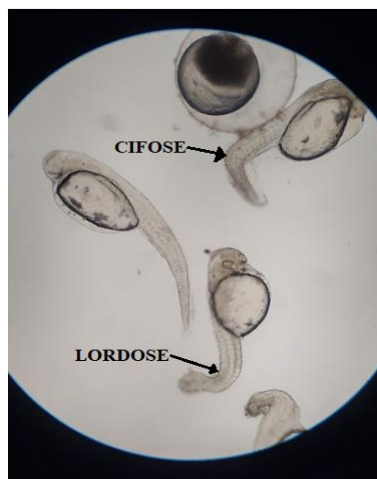


Figura 7: Larvas normais (mais à esquerda) e larvas com malformações (lordoses e cifoses)

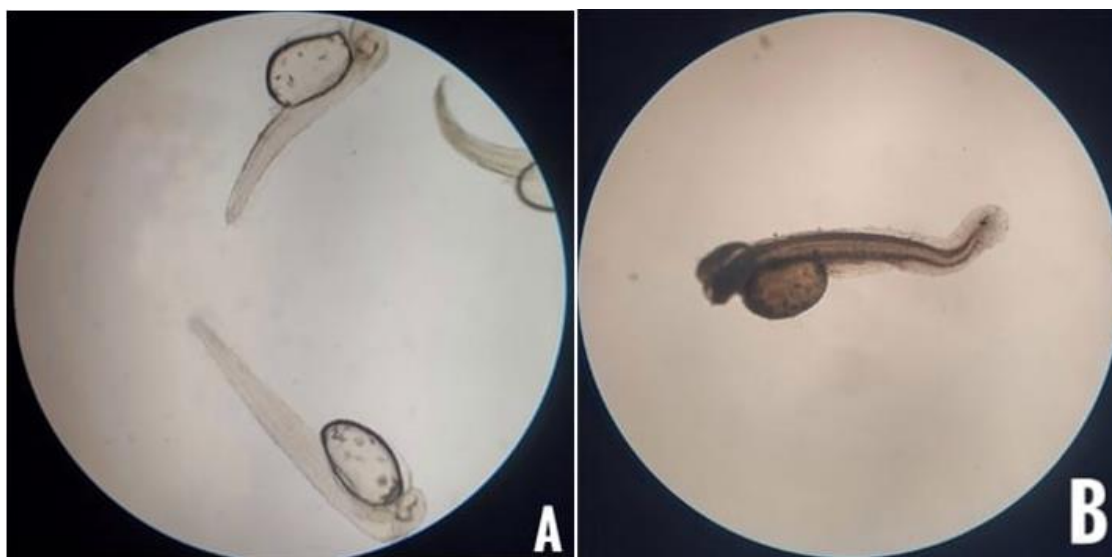


Figura 8: Larva normal (A) e larva anormal T525 com um grau acentuado de lordose

De acordo com Adamov et al (2017), para o *A. altiparanae* no choque a 40°C a taxa de não fertilizados foi de 5%, ao passo que para *A. lacustris* essa taxa aumenta para quase 50%, Piferrer et al. (2000) diz os choques são para cada espécie são bem específicos e devem ser analisados. Considerando os testes e as análises realizadas, o choque frio é o método melhor aplicado para o lambari do rabo amarelo, com a duração de 10 minutos após 1 minuto de fertilização, visto que foi o tratamento com o melhor resultado (77%). Contudo, o primeiro passo é levar os triploides do melhor tratamento aos 120 dias de crescimento para uma avaliação não só da esterilidade como do crescimento em si. Caso os triploides cresçam o suficiente para suplantarem o decréscimo nas taxas de

fertilização e eclosão, o protocolo voltará a ser otimizado com novas possibilidades de aplicação e duração do choque a fim de gerar um protocolo eficiente que gere 100% de triploides. Pretende-se ainda aumentar o quantitativo de reprodutores e, conseqüentemente, de gametas para que os novos testes sejam confirmados em números mais consistentes. Por hora, é possível descartar para essa espécie a possibilidade de choques térmicos quentes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia aplicada no trabalho obteve o controle da desova por extrusão, conseguindo aplicar os choques de temperatura para realizar a manipulação cromossômica e avaliar a fertilização, eclosão e sobrevivência da prole. É necessário que sejam realizados testes de desempenho para o crescimento a fim de avaliar a eficiência de triploides sobre o diploide. Caso isto seja comprovado, novos testes serão conduzidos dentro da melhor temperatura aqui detectada, mas em tempos de aplicação e duração diversos a fim de não só aumentar o número de triploides obtidos (>77%) como melhorar as taxas de fertilização e eclosão e diminuir as deformidades.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, S. K. Jr., DOWNING, S. L., Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 102, 197–208, 1986.

ALLENDORF, F. W., Leary R. F., Heterozygosity in gynogenetic diploids and triploids estimated by gene-centromere recombination rates. *Aquaculture*, 43, 413–420, 1984.

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

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. ISSN 0893-8849. 2017.

- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; VERÍSSIMO, S.; OKADA, E.K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.14, p.11–19, 2004.
- BARBIERI, G.; et al. Época de reprodução e peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Pesq. Agropec. Bras.* v.17, p.1057-65, 1982.
- FONSECA, T., COSTA-PIERCE, B. A., & VALENTI, W. C. Lambari aquaculture as a means for the sustainable development of rural communities in Brazil. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 25(4), 316-330. 2017
- GARUTTI, V. *Piscicultura ecológica*. São Paulo: UNESP, 2003.
- GUO, X., COOPER, K., HERSHBERGER, W. K., CHEW, K. K. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of resultant embryos. *Biology Bulletin*, 183, 381–386, 1992.
- GUO, X., ALLEN, S. K. Jr., Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surf clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 138, 1199–1206. 1994.
- HAND R. E., NELL J. A., Studies on triploid oysters in Australia. XII. Gonad discolouration and meat condition of diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) in five estuaries in New-South-Wales, Australia. *Aquaculture*, 171, 181– 194, 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Produção da pecuária municipal 2021*. *Produção Pecuária Municipal*, v.45, 2021.
- LAKRA, W. S.; AYYAPPAN, S. Recent advances in biotechnology applications to aquaculture. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, v.16, p.455-462, 2003.
- LOPES, M. C. *Desova induzida e viabilidade econômica da produção de pós-larvas e alevinos do lambari-da-mata-atlântica (Deuterodon iguape Eigenmann, 1907)*, Instituto de Pesca. 2011.
- MAGOULAS, A., KOTOULAS, G., GÉRARD, A., NACIRI-GRAVEN, Y., DERMITZAKIS, E., HAWKINS, A. J. S., Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Genetical Research*, 76, 261–272. 2000.

MALISON, JEFFREY A., LYNNE S. PROCARIONE, JAMES A. HELD, TERRENCE B. KAYES, AND CLYDE H. AMUNDSON. "The Influence of Triploidy and Heat and Hydrostatic Pressure Shocks on the Growth and Reproductive Development of Juvenile Yellow Perch (*Perca flavescens*)."
Aquaculture 116.2: 121-33. Web. 1993.

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

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

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

RIZALDO, QUENNIE. How small fish can solve big problems. *World Fish*. January 2018.

ROTTMANN, R.W.; SHIREMAN, J.V.; CHAPMAN, F.A. Techniques for Taking and Fertilizing the Spawn of Fish. Southern Regional Aquaculture Center. Publicação nº 426, novembro, 1991.

VALLADÃO, G. M., GALLANI, S. U., PILARSKI, F.. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*;10, 351-69. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>. 2018.

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

SATO, Y. E. V.; SAMPAIO, N.; FENERICH-VERANI AND J. R. VERANI. "Biologia e Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil." *Revista Brasileira de Zoologia* 23(1): 267-273. 2006.

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

SÚAREZ, Y.R., SILVA, E.A., VIANA, L.F.,. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. *Environ. Biol. Fish.* 100, 775–783. <https://doi.org/10.1007/s10641-017-0604-3>. 2017.