

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

TESE DE DOUTORADO

*Astyanax altiparanae (Pisces, Characiformes) como modelo
biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e
biomanipulação*

Rodrigo Braz de Castilho Almeida

BOTUCATU, 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Rodrigo Braz de Castilho Almeida

***Astyanax altiparanae (Pisces, Characiformes) como modelo
biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e
biomanipulação***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Fausto Foresti

BOTUCATU, 2007

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA
GENÉTICA DE PEIXES



“Por mais longe que vá o espírito, nunca irá tão longe quanto o coração.”

Sócrates

São diferentes identidades;

Diferentes personalidades;

Mas a razão desta minha existência:

*Alessandra
Igor, Raul e Théo*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pela confiança em mim depositada, pela orientação neste trabalho, pela compreensão, por sua amizade e pelo exemplo de vida que pretendo sempre seguir.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, por sua liderança natural que estimula as pessoas a atingirem seus ideais, por sua exigência em manter seus bons amigos por perto, e sem modéstia alguma, posso dizer que sou um deles.

Ao técnico de piscicultura e bioquímico, Roberto Braz de Castilho Almeida que sempre entendeu a importância deste trabalho aplicado à piscicultura e colaborou muito com seus conhecimentos sobre reprodução induzida de peixes. Além disso, sempre me motivou para a realização deste doutorado; afinal, irmão é para essas coisas!

À bióloga Fernanda Braz de Castilho Almeida Santos, pelo auxílio nas coletas dos embriões durante o período de incubação; afinal, irmã também é para essas coisas!

Aos irmãos Cláudio e Claudinei Batirola, para mim exemplos de força de trabalho, de conhecimento prático de piscicultura e principalmente exemplos de humildade. São amigos que considero muito, pela ajuda que me proporcionaram e tento de todos os modos retribuir com meu modesto conhecimento em piscicultura, quando eles necessitam.

Ao Prof. Dr. Alexandre Azevedo, pela motivação e auxílio nos estudos da embriogênese, tão importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Edson Montilha e Prof. Dr. Artur Antonio Andreato, amigos de jornada nas faculdades onde trabalho, que sempre me auxiliaram com seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Edmir Daniel Carvalho pela amizade e por sua lealdade, virtudes raras e imprescindíveis para as relações humanas.

À GA-Alevinos, por ceder os espaços da estação de piscicultura de Promissão-SP e pelos exemplos de liderança no mercado de alevinagem comercial e nos trabalhos de repovoamento de reservatórios, voltados para a conservação da ictiofauna de espécies nativas.

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Botucatu, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Zoologia, à Seção de Pós-Graduação do Instituto e ao Departamento de Morfologia, pela oportunidade e pelas condições oferecidas.

Aos novos colegas do Laboratório de Genética de Peixes, da Unesp de Bauru, pelo apoio nas análises citogenéticas.

Aos meus alunos, que de uma forma ou de outra me fazem aprender a cada dia a respeitar o próximo, seja pelas virtudes ou pelos defeitos (que prefiro chamar aqui de erros em reparação); fico torcendo para que um dia cada professor possa efetivamente contribuir com bons exemplos para a formação de cada indivíduo.

A todos os meus amigos e companheiros que não foram citados, pela amizade inestimável e por tudo que fizeram por mim.

Aos meus pais que sempre me incentivaram em meus objetivos, apesar das preocupações normais que pais amorosos têm com seus filhos.

A minha esposa Alessandra, mãe exemplar com quem compartilho os momentos da minha vida que entendeu as exigências e as dificuldades para a realização deste trabalho.

RESUMO

A aquicultura mundial se estabelece como atividade sustentada pelo aumento do consumo de carnes brancas e pela estagnação da captura e depleção dos estoques de peixes no ambiente. O uso de espécies como tilápias, carpas, trutas, salmões tornam-se cada vez mais comum nos países tradicionais na aquicultura. No Brasil espécies exóticas e alóctones sempre foram utilizadas na piscicultura e em projetos de repovoamento de reservatórios de hidrelétricas. Esses peixes tornaram-se invasores da maioria das bacias hidrográficas brasileiras, representando riscos para diversidade da ictiofauna do Brasil. A conservação de peixes é um tema que envolve ações que minimizam os impactos causados pelas atividades humanas como o desmatamento, a poluição, construção de reservatórios e a introdução de espécies exóticas ou alóctones. Técnicas genéticas a poliploidia, a reversão de sexo podem ser utilizadas como incremento à produção aquícola e também para promover a conservação da ictiofauna aplicando estas técnicas na reprodução de peixes exóticos para promover a esterilidade dos estoques de peixes introduzidos. A espécie *Astyanax altiparanae* foi utilizada como modelo biológico de reprodução induzida e manipulação de gametas para a aplicação e padronização das técnicas de poliploidia. Foram obtidos bons resultados com as técnicas de reprodução induzida por hormônios obtidos em extratos hipofisários e também com o uso de hormônios sintéticos. Para a manipulação dos embriões submetidos aos testes de poliploidia, foi caracterizado o desenvolvimento embriários do lambari *Astyanax altiparanae*, para a determinação dos choques de temperatura e de pressão hidrostática. Nos testes de triploidia com uso de choques de temperatura, foram obtidos indivíduos triplóides em baixa frequência. Nos tratamentos com choques de pressão hidrostática não foram obtidos indivíduos triplóides. Os testes em geral, foram considerados letais para a maioria dos indivíduos dos tratamentos comparados com os indivíduos do controle, que não foram submetidos aos choques de temperatura ou pressão hidrostática. Nos testes de tetraploidia não foram obtidos indivíduos tetraplóides e a letalidade dos indivíduos submetidos aos choques de temperatura e pressão hidrostática foi muito alta em comparação com o controle do experimento. Para a espécie *Astyanax altiparanae*, neste trabalho sugere-se que as técnicas de manipulação cromossômica de ploidia não foram efetivas devido à baixa

freqüência de obtenção de indivíduos triplóides e tetraplóides e alta letalidade dos embriões submetidos aos choques de temperatura e pressão hidrostática.

ABSTRACT

The world aquaculture represents an activity based on the increase of white meat intakes, reduction of fishery and depletion of fish stocks in the wild. The utilization of some species such as tilapias, carps, trouts and salmons have become more and more common in countries of traditional aquaculture. In Brazil, exotic and alien species were used in fishcultures as well as in repopulation of dam reservoirs. These fishes have invaded most of Brazilian hydrographic basins, representing a potential risk to the diversity of ichthyofauna in Brazil. Fish conservation is an issue that involves actions able to minimize the impacts caused by human activities, like deforestation, dam construction and introduction of exotic or alien species. Genetic techniques such as poliploidy and sex reversal may be used to increase aquaculture production and also to conserve the ichthyofauna by applying these techniques in the reproduction of exotic species, leading to sterility of introduced fish species. The species *Astyanax altiparanae* was used as a biological model of induced reproduction and gamete manipulation for the application and standardization of poliploidy techniques. Good results were obtained with both hormone-induced reproduction from pituitary extracts and synthetic hormones techniques. The embrionary development of *Astyanax altiparanae* was characterized prior the manipulation of embryos submitted to poliploidy tests, in order to determine thermal and hydrostatic pressure shocks. Triploidy tests using thermal shocks resulted in a low number of triploid individuals. Treatments involving pressure shocks failed in obtaining triploids. Overall, the tests were considered lethal for most individuals when comparing to those from control test, not exposed to neither thermal nor hydrostatic pressure shock. No tetraploid individual was obtained in tetraploidy tests and the lethality of individuals exposed to thermal and hydrostatic pressure was very high in relation to the control experiment. The present work suggests that the techniques of chromosomal manipulation regarding ploidy were unefficient for the species *Astyanax altiparanae* due to the low frequency of triploid and tetraploid individuals obtained, besides the high lethality of embryos exposed to thermal and hydrostatic pressure shocks.

SUMÁRIO

	Pg.
1 Introdução _____	2
1.1 Aqüicultura Mundial _____	2
1.2 Aqüicultura Continental Brasileira _____	5
1.3 Impactos na Biodiversidade _____	6
1.4 Conservação da Ictiofauna _____	9
1.5 O Lambari (<i>Astyanax</i>): Modelo Biológico e Espécie Promissora para a Piscicultura _____	13
1.6 Considerações gerais sobre os peixes do gênero <i>Astyanax</i> _____	15
1.6.1 A Família Characidae e a Subfamília Tetragonopterinae _____	15
1.6.2 O Gênero <i>Astyanax</i> _____	16
1.7 O Cultivo do Lambari _____	18
1.8 Reprodução e Desenvolvimento Embrionário _____	20
1.8.1 Reprodução Induzida ou Hipofização _____	22
1.8.2 Desenvolvimento Embrionário _____	23
1.9 Aplicação de Técnicas de Manipulação Genética _____	24
1.10 Potencial Biológico e Econômico do <i>Astyanax altiparanae</i> _____	26
1.11 Objetivos _____	29
2 Materiais e Métodos _____	32
2.1 Material de Estudo _____	32
2.2 Estações de Piscicultura _____	32
2.3 Métodos _____	33
2.3.1 Metodologia da indução da reprodução _____	33
2.3.2 Reprodução Induzida – “Desova Livre” _____	37
2.3.3 Reprodução Induzida – Extrusão de Gametas _____	40
2.3.4 Desenvolvimento Embrionário _____	46
2.3.5 Larvicultura Aplicação das Técnicas de Manipulação Cromossômica _____	46
2.3.6 Aplicação das Técnicas de Manipulação Cromossômica _____	47
2.3.7 Análises Citogenéticas _____	53
3 Resultados e Discussão _____	59
3.1 Reprodução Induzida _____	59
3.1.1 Desova Livre – Razão Sexual _____	61
3.1.2 Razão sexual na Desova Livre _____	63

3.1.3 Desova por Extrusão de Gametas _____	67
3.2 Embriogênese _____	70
3.3 Aplicação de Metodologia de Manipulação Genética _____	75
3.3.1 Choques de Temperatura _____	76
3.3.2 Choques de Pressão Hidrostática _____	83
4 Conclusões _____	90
5 Referências Bibliográficas _____	94

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Será que existe alguém que nunca ouviu falar no lambari? Possivelmente sim, um morador de uma grande cidade que não teve a oportunidade de observar e aproveitar da tranqüilidade e andar descalço nas areias de um riacho no campo!

Mas, pergunte sobre isso a um garoto qualquer que mora no interior e certamente ele responderá rápido que o lambari é um peixinho pequeno que tem lá no “corguinho”. Simplicidade ou não, os lambaris são conhecidos pela sua abundância nos ambientes de água doce típicos dos córregos, rios e lagos da região neotropical.

Não é difícil observar que quando falamos no nome do lambari, as lembranças da infância parecem ressurgir na nossa mente, revelando os momentos alegres e de liberdade, na inocência de uma criança que fazendo uso de uma peneira e um “embornal” saia feliz da vida após pescar dezenas de lambaris. Naqueles momentos, os perigos normais como cobras, aranhas ou mesmo o risco de afogamento, pareciam besteiras perto dos riscos que nossas crianças estão sujeitas nos dias de hoje.

Mas ainda relembrando o passado, eu tive a oportunidade quando criança de conhecer os lambaris nos córregos do entorno da cidade de Penápolis-SP, minha cidade natal. Jamais vou esquecer dos dias em que meu querido pai me colocou de baixo de uma cachoeira no Salto de Avanhandava, quando ainda não existia o reservatório da hidrelétrica, para pegar lambaris “com as mãos” dentro das locas durante a piracema. Hoje sei que o interesse do meu pai não eram os “lambaris” simplesmente e sim proporcionar um momento único e inesquecível ao seu filho!

Das brincadeiras da infância, o lambari se tornou para mim um meio de sobrevivência. A partir de 1995, comecei a criar o lambari com o objetivo de atender ao mercado da pesca esportiva em reservatórios, que estava em plena expansão. Devo muito aos “lambaris” o conhecimento prático em piscicultura que adquiri sobre manejo, doenças e parasitoses, transporte, estocagem, reprodução, nutrição e outras coisas que acontecem neste tipo de atividade e que a gente aprende no dia a dia. Atualmente, continuo com a criação e a venda do lambari para a pesca esportiva e junto com vários outros produtores que aderiram ao cultivo desta espécie de peixe, é provável que 4 milhões de lambaris sejam comercializados anualmente na região noroeste paulista neste ano! Não existem dados

oficiais sobre o cultivo do lambari no Brasil, mas sabemos que em todo o país esta espécie nativa vem sendo criada para diversos fins, como o de processamento para consumo, como base forrageira para espécies carnívoras e também como isca para a pesca esportiva.

Sempre desejei que um número maior de criadores optasse pela criação do lambari em suas propriedades. Em minhas andanças como técnico de piscicultura, consegui convencer alguns deles, que se tornaram grandes produtores de lambari. Mas, ainda não satisfeito e sempre conversando com o Prof. Fausto, pensamos na idéia de desenvolver algo com este pequeno peixe, com base no que o saudoso Prof. Silvio Toledo dizia: "...o lambari é um bom modelo para estudos biológicos pelas características que apresenta como gerador de prole numerosa, gerações curtas e de fácil reprodução; enfim, uma espécie ideal para estudos de genética aplicada".

Nesta tese de doutorado espero ter contribuído com informações sobre a reprodução artificial do lambari, de maneira que produtores possam desenvolver e otimizar suas pisciculturas com a criação desta espécie, melhorando a produtividade de larvas e alevinos. Espero que tais informações possam também contribuir para a possibilidade do uso das novas metodologias já existentes na área de biotecnologia, neste caso com a aplicação de técnicas de manipulação cromossômica utilizando a espécie *Astyanax altiparanae*. Certamente isto poderá resultar num salto em quantidade e qualidade da produção!

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Aqüicultura Mundial.

O homem se faz dependente da natureza, fazendo uso da biodiversidade para se alimentar, se vestir, para morar e para curar suas doenças (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). ROULE (1914) em sua publicação sobre piscicultura definiu que os humanos são fascinados pela exploração dos recursos vivos oriundos da água. O cultivo de organismos aquáticos destaca-se historicamente e nos dias atuais se desenvolve a ritmo avançado e a maior parte da aqüicultura mundial tem se desenvolvido em água doce e, principalmente, na Ásia (BORGHETTI & OSTRENSKY, 2002). A produção aqüícola de água doce consiste principalmente na piscicultura, com destaque para a ciprinicultura (cultivo de carpas), segundo CASTAGNOLLI (1996). A aqüicultura em águas salobras tem se dedicado principalmente à carcinicultura, promovendo o crescimento dos mercados de exportação de camarão (MELO, 2004). Com relação a maricultura, o que mais se tem produzido em volume são algas e moluscos (BRANDINI *et al.*, 2000).

A produção mundial de organismos aquáticos originados da aqüicultura cresceu de 13.480.431 toneladas métricas em 1987 para 34.116.249 toneladas métricas em 1996 (FAO, 1999) enquanto que em 2003 a produção total da aqüicultura foi de 42.000.000 de toneladas métricas e as estimativas baseadas para 2010 e 2015 são de 53.000.000 e 74.000.000 de toneladas métricas,

respectivamente (FAO, 2004). As estatísticas dão a impressão de que estes produtos se orientam pelo mercado de exportação (JOHNSON, 2003). O volume total de camarões marinhos e peixes como salmões que são exportados (29%) é equivalente aos dos peixes de água doce como tilápias ou carpas (28%), porém seus preços são mais elevados, o que constitui um importante componente em valor (FAO, 2004).

Para cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo (aproximadamente 17% da população mundial) o pescado é a fonte principal de proteínas animais. As proteínas de pescado são essenciais nas dietas alimentares de alguns países de população densa onde, contudo, a ingestão total de proteínas pode ser baixa. A aquicultura é a forma mais eficaz e sustentável de garantir que haja proteína suficiente para o mundo cuja população não pára de crescer (SORVIG, 2007). A dependência do pescado parece ser maior nas zonas costeiras que nas continentais. Entretanto, a produção mundial de pescados, após chegar a fornecer à população mundial o equivalente a 16,1 quilos *per capita* em 1997, sofreu uma queda em 1998 suprimindo apenas com 15,8 quilos *per capita* (FAO, 1998). Especialistas acreditam que, a médio prazo, deverá existir um limite na quantidade de alimento, incluindo pescados, que cada indivíduo poderá consumir e tetos de consumo serão estabelecidos. Está claro, entretanto, que esse limite será alcançado primeiro pelos países com economias prósperas e mais rapidamente ainda pelos países onde os pescados fazem parte da tradição alimentar, como o Japão (BORGHETTI & OSTRENSKY, 2002).

Segundo o relatório da FAO (1999), o crescimento econômico nos próximos 30 anos dará lugar a um aumento do número de pessoas com hábitos estabelecidos e constantes de consumo de pescado e uma grande variedade de produtos deverá

ser consumida. Porém, o volume total por pessoa flutuará demasiadamente. A aqüicultura se expandirá geograficamente, no que diz respeito às espécies cultivadas e às tecnologias utilizadas. É muito pouco provável que a Ásia continue dominando a produção na mesma proporção ocorrida nos anos 90 e a maricultura deverá representar uma grande parte da produção total, principalmente se a tecnologia do cultivo no mar se mostrar viável.

A aqüicultura cresce a ritmo sustentado agregando valores sobre os produtos cultivados, utilizando novas tecnologias de produção e de segurança alimentar. A FAO conclui que modificações genéticas de espécies aquáticas podem incrementar tanto a quantidade como a qualidade dos produtos da aqüicultura (FAO, 1998). O melhoramento genético tradicionalmente feito com os animais, a manipulação da estrutura cromossômica e a hibridação têm proporcionado notáveis contribuições ao incremento da produção aqüícola e já se pode prever que estas contribuições aumentem, à medida que as espécies aquáticas se tornem mais domesticadas e se siga aprimorando a tecnologia voltada ao melhoramento genético.

Fatores como a destruição de habitat natural, a utilização de antibióticos, a produção de farinha de pescados, a invasão de espécies exóticas nos ecossistemas e a fabricação de insumos com soja modificada geneticamente têm sido considerados obstáculos ao desenvolvimento da aqüicultura atual (SORVIG, 2007). PILLAY (1992) pondera que a aqüicultura não é considerada ainda uma atividade de grande potencial impactante, mas de atuação como elemento coadjuvante em relação a outras atividades humanas que utilizam as vias hídricas com destaque na degradação dos ecossistemas aquáticos. Nestas questões, faz-se necessária a aplicação da multi e interdisciplinariedade dos conhecimentos relativos ao ambiente a respeito dos fundamentos da ecologia básica e aplicada associadas às ações

antrópicas. Para a aqüicultura em geral, é fundamental o estabelecimento de políticas com as quais seja otimizado o setor aqüícola para o bem estar econômico e social, incluindo os valores nutricionais, a segurança alimentar, a inclusão social e a conservação ambiental, diretrizes estas fundamentais nos processos de gestão ambiental.

1.2 A Aqüicultura Continental Brasileira.

A aqüicultura é a atividade que mais tem crescido nas últimas décadas em todo o mundo, atingindo valores de cerca de 10% ao ano segundo os dados da FAO, 1999. Na aqüicultura brasileira, ao contrário das atividades agropecuárias mais tradicionais (bovinocultura, avicultura e suinocultura), que cultivam apenas uma, duas ou no máximo três diferentes espécies de animais, pelo menos 56 espécies de peixes e de outros organismos aquáticos vêm sendo utilizadas comercial ou experimentalmente pela aqüicultura continental brasileira (BORGHETTI & OSTRENSKY, 2002).

Entre os peixes, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) originário da bacia amazônica é atualmente a espécie cultivada no maior número de estados brasileiros, seguido pela tilápia (várias espécies), presente em atividades de cultivo em 22 Estados da Federação, não sendo produzida comercialmente somente na região Norte. E em terceiro lugar como peixe de maior distribuição nacional, está a carpa comum (*Cyprinus carpio*), com atividades de cultivo presentes em 20 Estados. Diante destes números, constata-se que entre as três espécies de peixes cultivados de maior distribuição nacional, duas são espécies exóticas, provenientes de outros

países, sendo a tilápia de origem africana e as carpas de origem asiática (BORGHETTI & OSTRENSKY, 2002).

A maior parte da produção mundial da aquicultura é proveniente ainda de sistemas semi-intensivos, considerados de baixa produtividade, fato este que também pode ser observado no Brasil. As perspectivas atuais apontam para modificações da produção na aquicultura brasileira, com base nos dados de crescimento dos cultivos nos sistemas intensivos como a produção de peixes em tanques-rede (CASTAGNOLLI, 2000). O Brasil apresenta área superior a 5 milhões de hectares de áreas alagadas, principalmente nos reservatórios das grandes hidrelétricas, sendo o país que apresenta o maior potencial para a produção de peixes de água doce em tanques-rede (CASTAGNOLLI, 2000). As espécies de tilápias, apesar de serem exóticas às bacias hidrográficas do Brasil, apresentam atualmente os melhores desempenhos zootécnicos nos cultivos em tanques-rede, ultrapassando os 100 kg/M³ de produção, tornando viável a implantação de uma cadeia produtiva da tilápia no Brasil.

1.3 Impactos na Biodiversidade.

Sabe-se que as espécies introduzidas, sejam elas provenientes de outros países (exóticas) ou transferidas de outras bacias hidrográficas (alóctones), quando disponíveis nos ambientes naturais ou em sistemas de cultivo provocam impactos de natureza complexa, em função das implicações que podem ter sobre a fauna local (AGOSTINHO, 1992). Apesar do número de introduções de espécies exóticas ou alóctones já realizadas nos ecossistemas aquáticos brasileiros, as informações disponíveis acerca dos impactos causados são ainda reduzidas, mas

sabe-se que estas podem afetar as espécies nativas pela competição por recursos (MARCHETTI, 1999), predação e piscivoria (GARCÍA-BERTHOU, 2002) transferência de patógenos e parasitas (GABRIELLI & ORSI, 2000) ou ainda por alterações introduzidas no habitat (ELVIRA & ALMODÓVAR, 2001), como o comportamento de revolver o substrato de fundo, tal como fazem as carpas e algumas espécies de tilápias (AGOSTINHO & JÚLIO JR., 1996). Estas espécies podem ainda causar reduções nos estoques nativos ou mesmo extinções locais, decorrentes de alterações no habitat e ainda de degradação genética das espécies nativas provocada pela miscigenação (AGOSTINHO & JÚLIO JR., 1996; FORYS & ALLEN, 1999).

As águas doces ocupam 0,0093% do volume total de água do planeta e no entanto, 12% das espécies animais vivem nas águas interiores. Cerca de 20.000 espécies de peixes vivem nos ambientes de água doce (NELSON, 1994). LOWE-McCONNELL (1999) refere-se à existência de mais de 1500 espécies de peixes que ocorrem somente na bacia Amazônica e na bacia do Prata, estimando-se ainda a ocorrência de cerca de 550 espécies na bacia do Rio Paraguai, especialmente no vasto complexo sistema do Pantanal (BONETTO, 1994).

Nota-se que a ictiofauna brasileira e sul-americana é rica em diversidade, mas os modelos aquícolas utilizados ainda são importados e estruturados com base no conhecimento adquirido no cultivo espécies exóticas, principalmente de tilápias e carpas praticados em todo o mundo. A introdução de espécies exóticas de plantas, peixes e outros organismos tem resultado em extensas modificações na cadeia alimentar em lagos e reservatórios no Brasil. Um exemplo deste processo pode ser ilustrado pela introdução acidental ou proposital de *Cichla ocellaris* (tucunaré) que

alterou profundamente a cadeia alimentar em lagos do rio Doce (TUNDISI & SAIJO, 1997).

Espécies como a corvina (*Plagioscion squamosissimus*), de hábito alimentar variado e com oportunismo trófico, constituem um bom exemplo para análise dos efeitos da introdução de espécies alóctones. Disseminada por toda a bacia do rio Paraná e atualmente com importante participação na pesca do reservatório de Itaipu, a corvina foi a espécie introduzida mais bem sucedida e que atualmente prolifera nos principais corpos d'água do alto Paraná (AGOSTINHO & JULIO JR, 1999). SANTOS & FORMAGIO (2000) demonstram que, enquanto a ocorrência de *Plagioscion squamosissimus* e de *Pimelodus maculatus* aumentou de 1987 a 1995 no reservatório de Volta Grande (MG), as espécies de pequeno porte, dos gêneros *Astyanax* e *Steindachnerina* tiveram seus estoques reduzidos ou nem sequer foram mais registradas, demonstrando que após a introdução da corvina, a ictiofauna deste reservatório alterou-se drasticamente.

A contínua interferência das atividades humanas nos sistemas aquáticos continentais do Brasil produziu impactos diretos ou indiretos, com conseqüências para a qualidade da água, a biota aquática e o funcionamento de lagos, rios e represas. Entre os principais agentes causadores de impacto estão as atividades de desmatamento, que resultam na perda da zona tampão entre sistemas terrestres e aquáticos; a mineração, que produz alterações físicas e químicas extremamente elevadas nos sistemas, além de provocar o assoreamento dos componentes hídricos; a construção de rodovias e ferrovias, que promovem a drenagem de áreas alagadas e a remoção de florestas, com alterações na estrutura dos rios e lagos ao longo das obras. Impactos continuados ainda podem ser causados por despejos de material residual proveniente de fontes orgânicas ou inorgânicas, pela introdução de

espécies exóticas nos mananciais hídricos e, com merecido destaque, os impactos resultantes da construção de reservatórios (DAVID *et al.*, 2006).

Segundo WOYNAROVICH (1991), as mudanças causadas no ambiente após os represamentos são catastróficas para muitas espécies de peixes, especialmente para aquelas de características migratórias de longa distância, como o dourado (*Salminus maxillosus*) e o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). O ambiente originalmente lótico se transforma numa região semi-lêntica, acarretando mudanças na temperatura da água, na oxigenação, na deposição de sedimentos e na química da água e do solo. Nesta condição ambiental percebe-se claramente que as fontes de matéria e energia são profundamente modificadas, passando a ocorrer um predomínio da produção primária fitoplanctônica com aumento do perifíton (fontes autóctones), em relação à fase do rio onde essas fontes eram de origem alóctone. Tais condições podem ser limitantes para as espécies de peixes típicas de rios, enquanto que outras podem não achar uma maneira de completar seu ciclo de vida após estas mudanças drásticas no ambiente, fazendo com que a diversidade e composição das espécies modifiquem-se bastante no vetor espaço-temporal (AGOSTINHO, 1992).

Acredita-se que ao aumentar a produtividade de um reservatório, as perdas do ambiente natural poderiam ser compensadas (WOYNAROVICH, 1991). Assim, ações de manejo da ictiofauna vêm sendo realizadas intensivamente nos reservatórios nos quais as espécies exóticas ou alóctones são introduzidas, com o propósito de preencher tais nichos vazios e aumentar a produção pesqueira (AGOSTINHO & JÚLIO JR., 1999, AGOSTINHO, 1992).

1.4 Conservação da Ictiofauna.

Enquanto a pesca extrativista tem se mostrado em estado de estagnação praticamente desde 1986, os dados estatísticos mostram que a produção de peixes cultivados no mundo para fins de alimentação humana mais do que dobrou entre 1987 e 1997, segundo dados da FAO (1999). Essas atividades, no entanto, teriam também aumentando potencialmente a destruição de habitats, a deposição de resíduos e as possibilidades de invasões de espécies exóticas em águas continentais e em estuários. Mesmo com essas evidências de impactos ambientais, os defensores da aquicultura refletem sobre a redução das pressões da pesca sobre os estoques naturais oceânicos e continentais, substituídos pelos organismos cultivados (LIMA-JÚNIOR & LATINI, 2006). Poucos especialistas em pesca e aquicultura atualmente ainda refutam a idéia de que a redução dos estoques oceânicos ocorreria em decorrência da destruição dos habitats e da exploração excessiva dos estoques de peixes oceânicos, que até recentemente eram utilizados como fonte de proteína animal barata para a produção de rações utilizadas nos cultivos da aquicultura (LIMA-JÚNIOR & LATINI, 2006).

Atualmente no Brasil as espécies mais adequadas para a aquicultura são exóticas e apresentam elevado potencial invasor. Em resposta aos chamados “pacotes tecnológicos” importados de outros países, o cultivo de espécies nativas seria então uma alternativa para solucionar essa necessidade de proteína animal. O Brasil apresenta a maior diversidade de peixes de água doce do planeta (LOWE-McCONNELL (1999). No entanto, considera-se que seriam necessários muitos investimentos em pesquisa para a adequação de algumas destas espécies às condições de criação em cativeiro, ressaltando-se ainda que espécies alóctones também possam ser causadoras de impactos sobre a ictiofauna existente (SANTOS

& FORMAGIO, 2000; TUNDISI & SAIJO, 1997). Cria-se, assim, uma situação conflituosa na tentativa de se chegar ao ponto de equilíbrio entre a atividade aquícola e a conservação ambiental. Considera-se, então, que o estabelecimento racional de um zoneamento das bacias hidrográficas pudesse funcionar como alternativa ao uso de espécies exóticas, permitindo distinguir áreas prioritárias para a proteção ambiental de outras nas quais as criações poderiam ser realizadas (LIMA-JUNIOR & LATINI, 2006).

Além dos impactos sobre a ictiofauna causados pela introdução de espécies exóticas, outros fatores podem contribuir de modo significativo para a perda da biodiversidade, como a mudança do regime hídrico dos corpos aquáticos, a poluição e a destruição dos habitats. Tendo em vista que a construção de grandes barragens implica obrigatoriamente no aproveitamento múltiplo do reservatório formado, os objetivos principais destes seria a geração de energia elétrica, seguida do controle de enchentes, abastecimento público, navegação, irrigação, turismo, pesca, etc. (MACHADO, 1975; DAVID *et al.*, 2006). Verifica-se que nestes novos ambientes estabelecidos, os recursos pesqueiros disponíveis à época da existência dos rios ainda não barrados sofrem frequentemente um crescente e acentuado processo de empobrecimento, não apenas quantitativo, mas também qualitativo. Assim, em razão de modificações no regime hídrico estabelecidas pelas condições de represamento do Rio Paraná e dos seus principais tributários, ocorreu o quase desaparecimento de certas espécies destes ambientes, como o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e o dourado (*Salminus maxillosus*), ao mesmo tempo em que foi verificado o predomínio de outras como a pirambeba (*Serrassalmus spilopleura*) e o acará (*Geophagus brasiliensis*), além da alteração da distribuição das populações (AGOSTINHO, 1992).

A poluição é um dos fatores que mais contribui para a alteração dos ecossistemas aquáticos. A ictiofauna é prejudicada pelo efeito danoso causado pelo lançamento de resíduos industriais e domésticos nos mananciais que além de alterarem as características físicas, químicas e biológicas da água, acarretam problemas de eutrofização, com efeitos negativos sobre os peixes e sobre a própria qualidade da água (VALENTINI *et al.*, 1972; MACHADO, 1975; DAVID *et al.*, 2006).

Uma alternativa apresentada para a conservação da ictiofauna nos ambientes modificados por represamentos é o trabalho desenvolvido nos centros de pesquisa e estações de aquicultura. Nestes, pode-se produzir alevinos de espécies autóctones de piracema visando à restauração de estoques endogâmicos e à ampliação dos estoques das espécies ameaçadas ou em processo de redução populacional, bem como de reinstalar estoques de espécies existentes anteriormente, como formas de controlar ou diminuir os efeitos de processos estabelecidos (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1992).

O repovoamento de peixes necessita de monitoramento. Programas de manejo e monitoramento genético de peixes usados no repovoamento de reservatórios de hidrelétricas vêm sendo desenvolvidos desde 1987 pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências, UNESP, de Botucatu (SP), nos reservatórios dos rios Paranapanema e Tietê. O principal objetivo desses programas de manejo e repovoamento tem sido, em última análise, contribuir para a conservação do potencial biológico de populações selvagens de peixes cujo habitat tenha sido alterado e que corram risco de redução ou até mesmo de desaparecimento.

As estações de piscicultura atualmente envolvidas nos projetos de conservação da ictiofauna estão sendo direcionadas para objetivos de manejo

genético dos estoques de peixes destinados ao repovoamento. Neste caso são ressaltados os esforços para minimizar as mudanças causadas pela deriva genética e pela consangüinidade, assim como pelas dificuldades decorrentes do processo de adaptação às condições de cultivo, de modo a que se maximizem características de adaptação e de desempenho dos estoques introduzidos nos reservatórios. (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1992)

O presente trabalho teve, assim, entre seus objetivos a possibilidade de utilização de uma espécie nativa da bacia do alto rio Paraná, *Astyanax altiparanae*, como modelo biológico, seja para a adaptação e estabelecimento de melhores protocolos de manejo e de criação desta espécie, de grande interesse para cultivo intensivo. Tais conhecimentos permitiriam viabilizar a aplicação de técnicas de biomanipulação genética, bem como estudos do controle genético dos estoques.

1.5 O Lambari (*Astyanax*): Modelo biológico e Espécie Promissora para a Piscicultura.

Existem muitas espécies de peixes conhecidas popularmente como lambaris, que povoam pequenos riachos, lagos e os grandes rios formadores das bacias hidrográficas de todo o ambiente tropical. O lambari-do-rabo-amarelo é uma espécie de pequeno porte, que atinge de 10 a 15 cm de comprimento, podendo chegar a 60 gramas de peso. Possui hábito alimentar onívoro e seu crescimento é rápido, chegando à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade em condições de cultivo, normalmente com 7 a 9 cm de comprimento para os machos e 12 a 15 cm de comprimento para as fêmeas (PORTO-FORESTI *et al.*, 2001).

O gênero *Astyanax*, pertencente à família Characidae, corresponde à maior unidade dos Tetragonopterinae, sob o ponto de vista sistemático e constitui um dos

gêneros dominantes da América do Sul (EIGENMANN, 1921). A representatividade deste gênero é bastante grande e complexa, com um número expressivo de representantes, sendo atualmente identificadas aproximadamente 74 espécies e subespécies. O nome comum destes peixes varia de região para região, sendo reconhecidos como “tambiú”, “piaba”, “piabinha”, “lambari-do-rabo-amarelo” e ainda outros nomes particulares e de uso local. Ao contrário das diferentes denominações comuns ao gênero *Astyanax*, a espécie *Astyanax bimaculatus*, como era referida anteriormente por diversos pesquisadores, apresentava distribuição ampla desde a Bacia do Prata até o Panamá e ainda desde águas de marés até elevações de aproximadamente 1.500 metros.

Em revisões sistemáticas e filogenéticas realizadas no gênero *Astyanax*, verificou-se que *Astyanax bimaculatus* não correspondia à consideração de uma espécie somente. A mais recente revisão taxonômica dos *Astyanax* das bacias do Paraná, do São Francisco e Amazônica resultou na reestruturação da nomenclatura das espécies deste gênero, passando-se à denominação de *Astyanax altiparanae* para o lambari-do-rabo-amarelo ou tambiú que ocorre na bacia do Rio Tietê e seus afluentes (GARUTTI, 1995). Tendo em vista que as experiências práticas de cultivo de peixes de pequeno porte são realizadas na maioria dos casos com exemplares desta espécie, considera-se que o lambari tambiú poderia ser uma boa opção na piscicultura brasileira.

Durante o período reprodutivo, diferenças morfológicas nítidas podem ser evidenciadas entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas, além de serem maiores e possuírem o corpo mais arredondado, são freqüentemente mais precoces no crescimento do que os machos (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2006). Neste período, observa-se ainda nas fêmeas uma forte irrigação por vasos

sangüíneos na região ventral do corpo, principalmente nas bases de inserção das nadadeiras peitorais e ventrais. Os machos são menores, possuem o corpo alongado e no período reprodutivo apresentam a nadadeira anal áspera ao toque, sendo tal característica importante para a sua identificação (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

1.6 Considerações gerais sobre os peixes do gênero *Astyanax*

1.6.1 A família Characidae e a subfamília Tetragonopterinae

A família Characidae (Pisces, Characiformes) engloba a maior parte dos peixes brasileiros de água doce incluindo também a grande maioria dos peixes de escama (BRITSKI, 1972). Na América do Sul essa família compreende cerca de 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros, nos quais se incluem peixes de hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e que ocupam uma grande variedade de habitats (BRITSKI, 1972).

A existência de um grande número de espécies em Characidae, associada à enorme variedade de formas, tem dificultado a proposição de classificações que reflitam agrupamentos naturais dentro dessa família, havendo dúvidas de que se trate efetivamente de um grupo monofilético (LUCENA, 1993). Segundo ALMEIDA-TOLEDO (1997), os estudos citogenéticos levados a efeito em Characidae refletem de certo modo a heterogeneidade característica dessa família, uma vez que têm sido detectadas diferentes particularidades citogenéticas entre os representantes das subfamílias que a compõem.

Tetragonopterinae é a subfamília de Characidae que representa o maior número de espécies no Brasil, sendo conhecida pelo fato de nela estarem incluídos os peixes vulgarmente chamados de lambaris. Essa subfamília está representada por toda a América do Sul e Central, estendendo-se da fronteira do México com os Estados Unidos até a Argentina (BRITSKI, 1972). A classificação dos seus representantes baseia-se na dentição, que é caracterizada pela presença de dentes cuspidados, organizados em duas ou três séries no pré-maxilar e em uma única série na mandíbula (BRITSKI, 1972). As espécies de Tetragonopterinae, cujo hábito alimentar predominante é o onívoro, vivem em uma grande variedade de ambientes (BRITSKI *et al.*, 1984).

Devido ao fato de a subfamília Tetragonopterinae apresentar uma enorme diversidade morfológica e específica, tem sido cada vez mais aceita a idéia de que esta não representa um agrupamento natural monofilético, mas parafilético (BUCKUP, 1998; WEITZMAN & MALABARBA, 1998).

1.6.2 O gênero *Astyanax*

Astyanax é considerado o gênero mais representativo da subfamília Tetragonopterinae, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (EIGENMANN, 1921). Esse gênero apresenta distribuição geográfica ampla na região Neotropical e possui aproximadamente uma centena de espécies e subespécies nominais (GARUTTI & BRITSKI, 2000).

Morfologicamente, as espécies pertencentes ao gênero *Astyanax* caracterizam-se por apresentarem duas séries de dentes no pré-maxilar (série interna com 5 dentes), linha lateral completa e nadadeira caudal nua, coberta de

escamas apenas na base (BRITSKI, 1972). Contudo, como elementos decorrentes da ausência de capturas e de estudos para uma perfeita identificação dos exemplares e amostras conseguidas, verifica-se que um número grande de espécies muitas das quais descritas com base em poucos exemplares, tem sido agrupado nesse gênero (GARUTTI, 1988).

A espécie *Astyanax bimaculatus* pode ser reconhecida pela presença de uma mancha ovalada escura na região umeral e outra na região caudal, enquanto *A. fasciatus* possui mancha umeral difusa e nadadeiras caudal e dorsal vermelho-vivas (BRITSKI, 1964; 1972). *Astyanax schubarti* é muito semelhante morfológicamente a *A. fasciatus*, da qual difere pela altura maior do corpo e por possuir nadadeiras amarelas (BRITSKI, 1964; 1972). Segundo GARUTTI (1988), *Astyanax* é um gênero complexo, podendo apresentar morfologia e padrões de coloração muito semelhantes entre as diferentes espécies.

Na revisão taxonômica das espécies e subespécies de *Astyanax* realizada por GARUTTI (1995), as formas identificadas inicialmente como pertencentes ao grupo *A. bimaculatus* por possuírem características em comum como a mancha umeral de forma oval e mancha no pedúnculo caudal estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, incluíam formas suficientemente distintas, justificando que se pudesse atribuir a cada uma delas a categoria de espécie. Esses estudos resultaram na descrição de 21 espécies novas, entre elas *Astyanax maculisquamis* (GARUTTI & BRITSKI, 2000), procedente da bacia do rio Paranã, afluente do rio Tocantins, assim como estabeleceu a denominação de *Astyanax altiparanae* para o lambari-de-rabo-amarelo para exemplares de ocorrência nos componentes da bacia do alto rio Paraná (GARUTTI, 1995). Até então, a mais recente revisão taxonômica do gênero *Astyanax* havia sido realizada por EIGENMANN (1921; 1927) e as

publicações posteriores se referiam apenas à descrição de espécies novas ou citações já conhecidas (GARUTTI, 1995).

1.7 Cultivo do Lambari.

Do ponto de vista de adequação e otimização, a criação do lambari nas propriedades rurais constitui-se numa excelente alternativa para pequenos e médios produtores, que procuram módulos de diversificação de suas atividades nas propriedades. O produto resultante da criação do lambari poderia ter diferentes destinações, entre as quais a sua utilização no consumo direto, sua industrialização na forma de conservas, ser utilizado como alimento natural ou forragem na criação de peixes carnívoros ou ainda ser comercializado como isca viva para a pesca esportiva, entre outras possibilidades (PAIVA, 1997).

Existem várias alternativas metodológicas para o cultivo do lambari. Pode-se iniciar a produção com a instalação de um policultivo, estocando o lambari com outras espécies de peixes, principalmente aquelas não carnívoras de grande porte como o pacu, por exemplo. Entretanto, dificuldades de manejo, principalmente durante a despesca dos peixes maiores, podem resultar em significativa mortalidade dos lambaris, devido às lesões e estresse causados durante a manipulação das redes de arrasto, sendo, por isso, mais indicada a prática do monocultivo para um melhor desempenho da criação (PORTO-FORESTI *et al.*, 2001).

A reprodução natural desta espécie pode ser realizada colocando-se os reprodutores previamente selecionados em tanques de terra. Nesta condição geralmente utilizam-se abrigos para os peixes como macrófitas (aguapés) em 10 a 15% da área do viveiro, que servem de proteção para as larvas e alevinos após a eclosão (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005). Este método resulta em boa produção de

larvas e alevinos, mas proporciona também algumas dificuldades em relação ao manejo posterior à reprodução, por dificultar o controle da sobrevivência das larvas e alevinos e da predação realizada pelos próprios reprodutores, que podem comer ovos e larvas. Mesmo com a remoção dos reprodutores após a reprodução, a dificuldade baseia-se na impossibilidade de controle da densidade dos lotes com idades diferenciadas nos tanques de reprodução natural (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

As diferentes espécies do gênero *Astyanax* foram estudadas por diversos autores quanto ao aspecto reprodutivo. IHERING E AZEVEDO (1936) relataram que *A. bimaculatus* apresentou desova parcelada durante toda a estação chuvosa. Contrariamente, NOMURA (1975) encontrou evidências de desova total nas espécies *A. fasciatus* e *A. schubarti* estudadas no rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, SP. Já AGOSTINHO *et al.* (1984) sugeriram o período de novembro a fevereiro para ocorrência da desova destas espécies e que esta se processa de forma parcelada. As estimativas para o tamanho de maturação sexual para *Astyanax* variam de 7,8 a 10,4 cm de comprimento total, conforme descrito em estudos realizados por NOMURA (1975); AGOSTINHO *et al.* (1984) e SANTOS *et al.* (1991). Estima-se ainda que a idade da primeira maturação gonadal em condições naturais seja de 3 anos de vida (SANTOS *et al.*, 1991) e em condições de cultivo esta ocorra logo aos 4 meses de vida (SILVA, 1996).

A ocorrência do processo de reprodução parcelada constituir-se-ia num fator de importância no cultivo do lambari, podendo viabilizar a obtenção de 3 a 4 desovas durante o ano e possibilitando um incremento substancial na produção. Contudo, um melhor controle no manejo da larvicultura também deveria ser desenvolvido, em decorrência do aparecimento de lotes de indivíduos em diferentes

estágios de crescimento. Do mesmo modo, sabe-se que problemas como as altas densidades decorrentes da falta de controle na produção de alevinos podem levar ao crescimento diferenciado dos indivíduos. E há também que se considerar a possibilidade da ocorrência de desovas de indivíduos precoces nascidos no período, que também irão contribuir para o aparecimento de heterogeneidade no tamanho, além de possíveis diferenças de tamanho decorrentes de características fisiológicas manifestadas em certas espécies, diferenciando machos e fêmeas (dimorfismo sexual).

Outra causa importante da diferenciação do crescimento, neste caso relacionada ao manejo dos estoques, é o desajuste de espaço físico no viveiro, que leva a um aumento da competição entre os peixes, agravando a heterogeneidade dos lotes. Esses casos, embora possam se constituir em fatores depreciativos da produção, não se apresentam como motivos imperativos para que a reprodução natural do lambari seja descartada num processo de produção. O método de despesca seletiva tem sido utilizado como uma alternativa, já que a cada semana do período reprodutivo é feita uma triagem dos lotes que atingem o tamanho desejado e estes são dirigidos para o processo de engorda (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

A heterogeneidade de tamanho do corpo é marcante nos lambaris durante as fases de alevino e juvenil, mantendo-se esta característica até a fase adulta. Uma expressão desta heterogeneidade é o dimorfismo sexual que se estabelece na fase adulta, em que as fêmeas em geral são maiores do que os machos (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2006).

1.8 Reprodução e Desenvolvimento Embrionário.

Os peixes se caracterizam por apresentarem todos os mecanismos de reprodução, principalmente o bissexualismo ou gonocorismo, hermafroditismo e a partenogênese (VAZZOLER, 1996). Tal característica, peculiar somente deste grupo de vertebrados, poderia explicar o grande número de espécies existentes com as mais diversas adaptações anátomo-fisiológicas. Nos teleósteos, o processo de reprodução ocorre de diferentes formas e, apesar de sua complexidade, as estruturas fundamentais das gônadas assemelham-se, de modo que elas são destinadas tanto para a produção de gametas necessários para o processamento da reprodução, como para a síntese e secreção de esteróides que regulam a atividade das células germinativas (CASTILHO-ALMEIDA, 1999). A oogênese pode ser subdividida em diferentes fases: crescimento do ovócito incluindo a vitelogênese; maturação final do ovócito e ovulação. Na espermatogênese, também são determinadas escalas de maturação, embora sem a mesma riqueza de detalhes que as referentes aos ovários (CHAVES, 1991).

Os ovários têm sido órgãos mais estudados que os testículos, possivelmente devido a elementos de natureza metodológica, em virtude das células da linhagem espermatogênica não sofrerem variações tão marcantes quanto às da linhagem ovocitogênica durante seu desenvolvimento. Uma análise histológica de testículos nunca será um indicador tão preciso do grau de maturação de um indivíduo macho quanto será a de ovários para as fêmeas (CHAVES, 1991).

Pode-se de dizer que a influência do sexo também se reflete em índices quantitativos, como a variação no peso e dimensões das gônadas. No caso dos testículos, esta variação não é tão pronunciada como a que é verificada nos ovários durante o desenvolvimento, mesmo no caso da ocorrência de um pequeno acréscimo de peso por produção de fluido seminal ao término da maturação nos

machos. Além de menores variações no peso das gônadas, os machos registram variações relativamente pequenas também no diâmetro das células em maturação, dado comumente utilizado na identificação do sexo dos reprodutores nos processos de hipofização de fêmeas em estações de piscicultura: enquanto os ovócitos crescem muito, os espermátócitos variam pouco de tamanho (CHAVES, 1991).

1.8.1 Reprodução Induzida ou Hipofização.

Nas espécies reofílicas ou de piracema, o desenvolvimento embrionário pode ser estudado em laboratório como consequência de eventos da reprodução induzidos por hormônios, que levam à ovulação controlada nas fêmeas e à espermiação nos machos. As dosagens utilizadas dependem do tipo de hormônio (sintético ou extrato hipofisário), da espécie e do tamanho (peso) dos reprodutores (WOYNAROVICH, 1991) nos quais o hormônio é aplicado.

A reprodução induzida (artificialmente) do lambari com a utilização de hormônios indutores mostra-se freqüentemente mais produtiva que a reprodução natural, pois permite um melhor controle, planejamento e otimização da produção, tanto na fase de alevinagem como na de engorda. Neste processo, os reprodutores são selecionados conforme as características externas, evidenciadas no período reprodutivo e são induzidos à liberação de ovócitos e de esperma com o uso de extratos hipofisários de peixes, aplicando-se duas doses de hormônios conforme as práticas usuais em estações de piscicultura (WOYNAROVICH, 1991).

Essa técnica de reprodução é facilmente realizada, podendo resultar num aproveitamento maior que aquele obtido com a reprodução natural. A incubação dos ovos e embriões do lambari também é realizada seguindo as práticas comuns de reprodução, com a produção de larvas e pós-larvas alcançando taxas de até 90% de sobrevivência (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005). Neste trabalho, pretendeu-se aprimorar a padronização da técnica de indução hormonal da reprodução do lambari-de-rabo-amarelo, estabelecer metodologia para a fertilização controlada realizada com base na extrusão dos gametas e também formalizar protocolos eficientes de produção de larvas e de facilidade de manejo dos reprodutores. Como decorrência das facilidades de aplicação de tais práticas, pode-se visualizar a possibilidade da utilização de metodologias de manipulação genética nesta espécie.

1.8.2 Desenvolvimento Embrionário

Ocorrida a fecundação no processo final de indução e extrusão dos gametas, os ovos são transferidos para incubadoras com água e aeração adequadas, onde ocorrerá o desenvolvimento até a eclosão das larvas (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

O desenvolvimento embrionário dos teleosteos pode ser caracterizado pelas seguintes etapas: pós-fecundação, segmentação, morfogênese, organogênese inicial, organogênese média, organogênese tardia e eclosão (RIBEIRO *et al.*, 1995). As etapas de morfogênese e organogênese inicial incluem as fases de gástrula inicial, intermediária e avançada. As etapas de organogênese

tardia e eclosão estendem-se desde o aparecimento dos primeiros pares de somitos até a eclosão das larvas (RIBEIRO *et al.*, 1995).

Uma proposta de estudo do processo e das etapas do desenvolvimento embrionário em *Astyanax altiparanae* poderia ter como objetivos, além da descrição do próprio evento embriológico, também a busca de informações sobre os estádios do desenvolvimento nos embriões, para possibilitar a aplicação das técnicas de manipulação cromossômica de indução de poliploidia (triploidia e tetraploidia), realizadas por meio de choques de temperatura ou de pressão hidrostática que são aplicadas no embrião em momentos específicos das fases iniciais do seu desenvolvimento.

1.9 Aplicação de Técnicas de Manipulação Genética

O cultivo do lambari em condições de alta densidade e a possibilidade da aplicação de metodologias específicas como técnicas de melhoramento genético, manipulação cromossômica (obtenção de indivíduos estéreis) e para reversão de sexo (visando à obtenção de linhagens monossexuais), pode certamente resultar na melhoria da produção, bem como viabilizar a utilização desta espécie em projetos de conservação e controle ambiental. O interesse na utilização destas técnicas no cultivo de lambaris merece destaque pelo fato da espécie apresentar gerações curtas, prole numerosa e ser de fácil manejo em condições de laboratório e de campo.

Uma perspectiva para o cultivo desta espécie está na utilização das técnicas de manipulação cromossômica, que podem ser aplicadas com relativa facilidade nos peixes, pelo fato de que este grupo geralmente apresenta fecundação externa, favorecendo o manuseio dos gametas (THORGAARD, 1983). Dentre as várias técnicas de manipulação cromossômica existentes, a triploidia é o tipo mais difundido na área da piscicultura (FORESTI *et al.*, 1994). O interesse na obtenção de indivíduos triplóides se deve às características de implicações econômicas que eles podem apresentar, que podem ser traduzidas na possibilidade de maior crescimento (WOLTERS, 1982) e em esterilidade nos estoques (TIWARY, 2000).

O maior crescimento dos peixes triplóides (3n) em relação aos diplóides (2n) decorre principalmente por apresentarem esterilidade gonádica. Durante o período de maturação sexual os diplóides de ambos os sexos sofrem um retardo no crescimento, concentrando suas energias no desenvolvimento das gônadas. Entretanto, as fêmeas triplóides, sendo estéreis, não desenvolvem gônadas funcionais e, continuando o crescimento em peso e comprimento, acabam por superar as fêmeas diplóides em 5% a 20% do peso ao final do período de maturação (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1992, 1996). Isso pode ser constatado com espécies como o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), a truta, as carpas chinesas e ainda outros peixes utilizados na aplicação das técnicas de triploidia (CASSANI & CANTON, 1986; HENKEN *et al.*, 1987; SHEEHAN *et al.*, 1999). Porém, alguns autores relatam que existem poucas diferenças entre peixes diplóides e triplóides, principalmente em para características de interesse econômico relacionadas aos índices de conversão alimentar, ao crescimento e ao peso total dos indivíduos analisados (KERBY *et al.*, 2002).

Experimentos de aplicação desta técnica de manipulação cromossômica já vêm sendo realizados de forma preliminar nos lambaris na Estação de Piscicultura Kabeya em Glicério (SP), desde 1999. Os objetivos principais da proposta concentram-se na padronização de metodologia para esta espécie que resulte na obtenção de alto índice de indivíduos triplóides, no controle da heterogeneidade de tamanho dos indivíduos adultos nos tanques de cultivo e também na utilização da esterilidade gonádica característica dos triplóides para o controle da densidade de peixes nos tanques, otimizando assim o cultivo e a produção nesta espécie.

Os indivíduos triplóides, por serem estéreis, também podem ser usados no controle da poluição genética que freqüentemente ocorre com os escapes ou

descartes das iscas vivas no ambiente natural (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005). Tal procedimento impedindo a miscigenação de populações e espécies isoladas naturalmente pode constituir-se numa estratégia importante para minimizar possíveis problemas adversos de impacto ambiental e conseqüente “contaminação genética” de rios e lagos com formas provenientes de sistemas externos.

Os estudos em desenvolvimento, envolvendo novas metodologias de cultivo e o uso de técnicas de manejo genético certamente poderão abrir novos caminhos para otimizar o cultivo não só desta espécie, mas de um modo geral na piscicultura, contribuindo também para a ampliação dos conhecimentos e sua utilização de modo adequado por parte dos criadores de peixes no Brasil.

Desse modo, também faz parte dos objetivos gerais deste trabalho realizar o desenvolvimento e a padronização das técnicas genéticas em piscicultura, promovendo com isso aplicações genéticas no manejo de espécies de interesse econômico e, ao mesmo tempo, ampliar as possibilidades de aplicação das técnicas de biotecnologia disponíveis, no cultivo de peixes.

1.10 Potencial Biológico e Econômico do *Astyanax altiparanae*

A pesca do tucunaré constitui um atrativo turístico da pesca esportiva e no Estado de São Paulo, a região dos Grandes Lagos, formados pelo represamento de grandes rios da região (Noroeste Paulista) está se transformando em grande área turística. Atualmente, podem ali ser encontradas duas espécies de peixes esportivos, o tucunaré amarelo (*Cicla ocellaris*) e o tucunaré azul (*Cicla temensis*), ambas originárias da bacia amazônica. Uma vez introduzidas nas bacias do Alto Paraná e Médio e Baixo Tietê, estas se adaptaram muito bem nos ambientes de águas lânticas dos reservatórios. São espécies carnívoras, consideradas vorazes e,

devido ao seu hábito predador, afetam as populações nativas de peixes dessas bacias hidrográficas, já fortemente alteradas pelo impacto dos barramentos (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

Para muitos pescadores, a pesca do tucunaré é considerada uma arte e para tal, diferentes instrumentos de captura como caniços, molinetes e iscas artificiais de todas as cores e formatos são utilizados. Mas, além de fugir ao menor ruído, este peixe, muito exigente em relação à isca, dificilmente consegue resistir a um lambari. Contudo, com a diminuição das populações destes pequenos peixes nos rios e com a edição de leis ambientais que não permitem a pesca indiscriminada na natureza, aumenta a cada dia a procura por lambaris para serem usados como isca para a pesca esportiva (PORTO-FORESTI *et al.*, 2001).

Até recentemente, os lambaris eram considerados por muitos produtores como elementos indesejáveis nos viveiros por invadirem e colonizarem rapidamente o ambiente de criação dos peixes nobres (PAIVA, 1997). Nos tanques de criação, competem por espaço e alimento com as espécies cultivadas. O aproveitamento destes pequenos peixes se resumia, então, à alegria dos funcionários nos dias de despesca, quando a sobra da captura formada pelos pequenos peixes era geralmente descartada. Este conceito foi mudando a partir de observações mais acuradas durante o manejo dos tanques de cultivo. Casos de associação de lambaris com tilápias não revertidas resultaram no controle da população destas, uma vez que os lambaris predavam os ovos, as larvas e pós-larvas das tilápias (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

Por outro lado, a ocorrência natural dos lambaris nos viveiros também passou a ser aproveitada por alguns produtores, com a sua comercialização na forma eviscerada e sem escamas, para bares e lanchonetes. Tais fatos corriqueiros na

piscicultura, que algumas vezes resultam de soluções criativas por parte do produtor, não têm resultado, contudo, em empreitadas para a criação de lambaris em monocultivo (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

Levando-se em conta a sua fácil reprodução, a boa taxa de sobrevivência das larvas e alevinos, o rápido crescimento e o hábito alimentar onívoro, as atividades de produção de lambaris para a produção de iscas vivas ou mesmo para o consumo direto ou processamento pode ser considerada uma boa opção de negócio.

O custo geral da produção de peixes nas pisciculturas depende de diferentes fatores, determinados por elementos que envolvem aspectos gerais de economia e componentes locais do mercado. Produtores que têm seus estabelecimentos nas regiões onde a pesca esportiva é praticada poderiam, como alternativa, ter maior retorno e garantia de sucesso no seu empreendimento se houvesse envolvimento também com atividades relacionadas ao comércio de iscas vivas. E haveria ainda a possibilidade de venda do produto na forma de congelados ou enlatados, após processamento adequado, conforme comentado por PORTO-FORESTI *et al.* (2005).

Existe ainda um outro mercado que poderá dar espaço ao cultivo do lambari, que é a indústria da farinha de peixe, onde as exigências de produção de um produto de boa qualidade no mercado mundial são cada vez mais urgentes. Segundo a FAO, a aqüicultura consome 35% da farinha de peixe obtida no mundo todo. Em 2006 foram produzidas 6 milhões de toneladas de farinha de peixe e 1 milhão de toneladas de óleo de peixe (SORVIG, 2007).

A procura de subprodutos da pesca entre as grandes marcas de fábricas de ração animal vem aumentando a cada ano, acirrando a disputa por esta matéria-prima e considera-se que o cultivo do lambari poderia se adequar perfeitamente às

condições exigidas por esse mercado. Um produto de custos competitivos teria por base nesta espécie a fácil obtenção de alevinos, o crescimento rápido, a rusticidade, o fácil manejo e outras características que são observadas dia a dia pelos produtores. Além disso, esta espécie se adapta facilmente ao arraçoamento com rações formuladas com base em produtos de origem vegetal, o que reduziria de modo significativo os custos com alimentação.

Considera-se, então que o estabelecimento de conhecimentos aprofundados sobre as características biológicas das espécies de peixes, neste caso representadas pelo lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) e a utilização destas informações em associação à aplicação de técnicas adequadas de manejo e de reprodução, de melhoramento genético dos estoques e de desenvolvimento e aplicação de protocolos específicos de metodologias em biotecnologia, poderão resultar na formulação de um modelo de desenvolvimento e incentivo para os piscicultores, ampliando as possibilidades de crescimento desta área.

1.11 Objetivos

Este trabalho teve por objetivo geral a caracterização e aprimoramento do processo de reprodução induzida em *Astyanax altiparanae* (lambari-de-rabo-amarelo), visando o estabelecimento de procedimentos mais eficientes de produção para utilização no cultivo intensivo desta espécie e a adaptação de protocolos de fertilização controlada e desenvolvimento embrionário, para viabilizar a aplicação de técnicas de biomanipulação do genoma. Assim, para formular informações e direcionar sua aplicação em programas de cultivo, pretendeu-se:

a) caracterizar, de modo detalhado, o processo da reprodução induzida pela aplicação de hormônios hipofisários e sintéticos em *Astyanax altiparanae*, para estabelecer protocolos adequados da técnica de reprodução induzida, caracterizando as fontes hormonais, dosagens, razão sexual viável, hora-grau e extrusão de gametas;

b) descrever as etapas do desenvolvimento embrionário da espécie nas suas diferentes transformações, caracterizando a fertilização, as fases embrionária e pré-larval até a eclosão, visando com isso estabelecer os tempos iniciais do processo de clivagem, para permitir a aplicação das técnicas de manipulação genética;

c) realizar, se possível, testes de aplicação das técnicas de manipulação genética, indutoras de modificações do grau de ploidia dos indivíduos com o uso de choques de temperatura e de pressão hidrostática, para a obtenção de indivíduos triplóides ou tetraplóides, visando estabelecer um protocolo de utilização desta metodologia de indução de poliploidia para esta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material de Estudo

A espécie de peixe escolhida para a realização dos estudos programados foi *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo) pertence ao gênero *Astyanax*, da família Characidae, amplamente distribuído pela América do Sul, na região Neotropical. Vários representantes do grupo ocorrem na região, mas a escolha da espécie deveu-se à sua ampla ocorrência nos componentes da Bacia do Alto Rio Paraná. Na Figura 1 abaixo, está representado um exemplar de *Astyanax altiparanae*.



Figura 1. Exemplar adulto de *Astyanax altiparanae*

2.2 Estações de Piscicultura

As atividades de campo executadas no presente trabalho foram realizadas em parte no Laboratório de Reprodução de Peixes da Estação de Piscicultura Kabeya, localizada no

município de Glicério, SP e também no Laboratório de Reprodução de Peixes da Estação de Piscicultura da GA-Alevinos, localizado nas dependências da Usina Hidrelétrica Mário Lopes Leão (AES-Tietê), município de Promissão-SP (Figuras 2a e 2b). As atividades de análise laboratorial foram realizadas no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Instituto de Biociências da Unesp, campus de Botucatu-SP e no Laboratório de Genética de Peixes, da Faculdade de Ciências da Unesp, campus de Bauru-SP .



Figura 2. Locais da realização das atividades de campo, **(a)** piscicultura Kabeya localizada no município de Glicério-SP; **(b)** piscicultura GA Alevinos, localizada na usina hidrelétrica de Promissão, SP.

2.3 Métodos

2.3.1 Metodologias da Indução da Reprodução

Para a realização dos experimentos de reprodução induzida foram utilizados estoques de reprodutores de *Astyanax altiparanae* mantidos na Estação de Piscicultura Kabeya e também na Estação de Piscicultura da GA-Alevinos. Foram utilizados os métodos de indução da reprodução por meio da aplicação de extratos hipofisários naturais seguindo a metodologia descrita por WOYNAROVICH (1986); também foram usados hormônios sintéticos para facilitação da ovulação das fêmeas e espermição dos machos, gerando dados para comparação dos resultados de fecundação e geração de proles.

Os exemplares de *Astyanax altiparanae* utilizados no processo de reprodução foram selecionados com base nos caracteres sexuais secundários dos animais, indicadores do processo de maturação gonadal (Figura 3).

As fêmeas maduras apresentaram como característica marcante o abdome proeminente e bastante desenvolvido, quando comparadas ao dos indivíduos do sexo masculino, além da presença de intensa vascularização, conforme é mostrado na Figura 4 (a). Os machos de *A. altiparanae* apresentam o corpo mais esguio e o abdômen normalmente desenvolvido (Figura 4b). Para sua identificação visual em relação às fêmeas, verificou-se que os indivíduos machos apresentam espículas nos raios da nadadeira anal durante o período reprodutivo (Figura 5), enquanto nas fêmeas esta nadadeira apresenta-se lisa, sem a presença de espículas (Figura 6).

Outra diferença morfológica entre fêmeas e machos observada nesta espécie de lambari, que possibilita a discriminação dos sexos refere-se aos padrões de crescimento dos indivíduos. Durante a fase de crescimento juvenil, as fêmeas atingem comprimento total maior que o dos machos (Figura 7), o que se constituiria numa característica de interesse a ser considerada no estabelecimento de programas de cultivo e exploração zootécnica desta espécie.

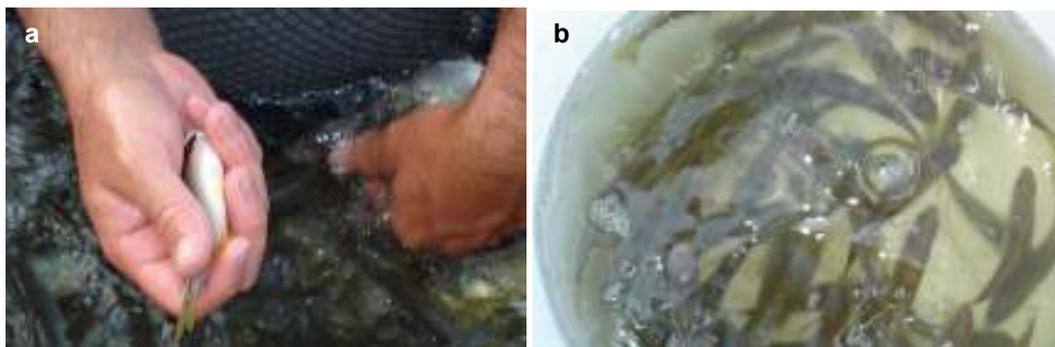


Figura 3. Seleção e manejo de reprodutores de *Astyanax altiparanae* (a); em (b), sexagem dos indivíduos e sua separação em recipientes apropriados.

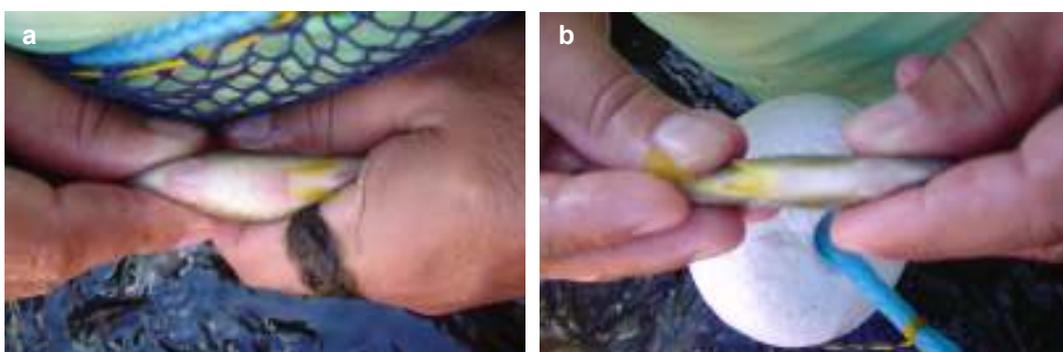


Figura 4. Caracteres sexuais secundários relacionados à identificação do sexo em indivíduos adultos de *Astyanax altiparanae*. Em (a), exemplar de indivíduo fêmea com o abdômen bastante desenvolvido e intensamente vascularizado; em (b), exemplar de indivíduo macho apresentando o abdômen menos dilatado que o da fêmea e manuseio da nadadeira anal para constatação de ocorrência da “aspereza” característica.

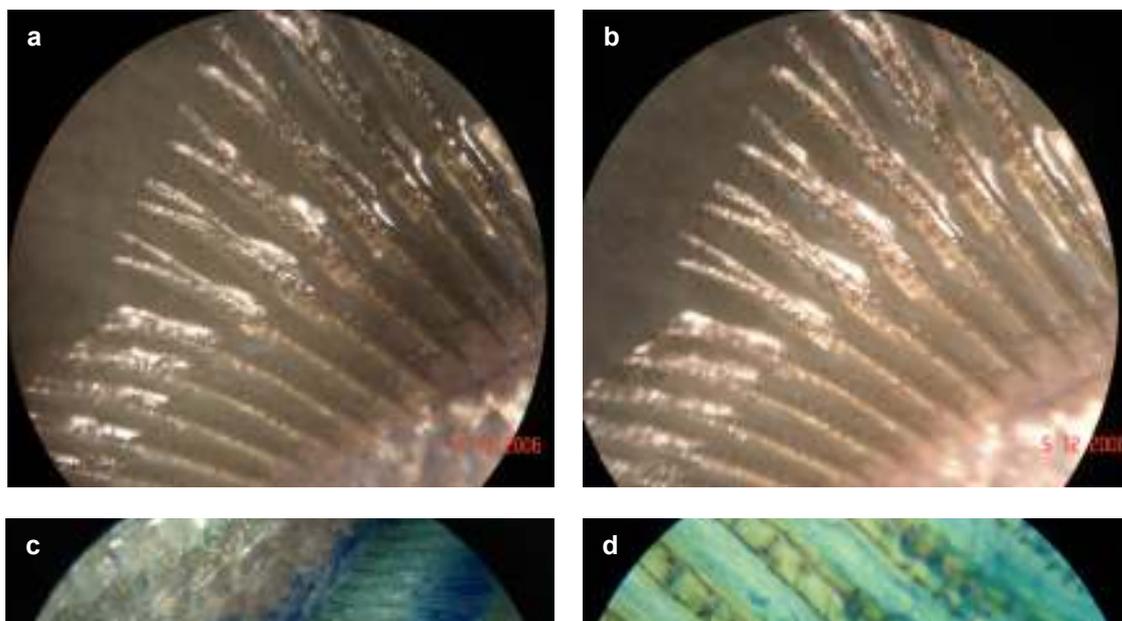


Figura 5. Observação em microscopia de pequeno aumento da nadadeira anal de indivíduo macho de *Astyanax altiparanae*, mostrando a presença dos ganchos da estrutura, característica sexual secundária que indica que o indivíduo está maduro. Em (a) e (b) sem utilização de coloração; em (c) e (d), com utilização de coloração por azul de metileno.

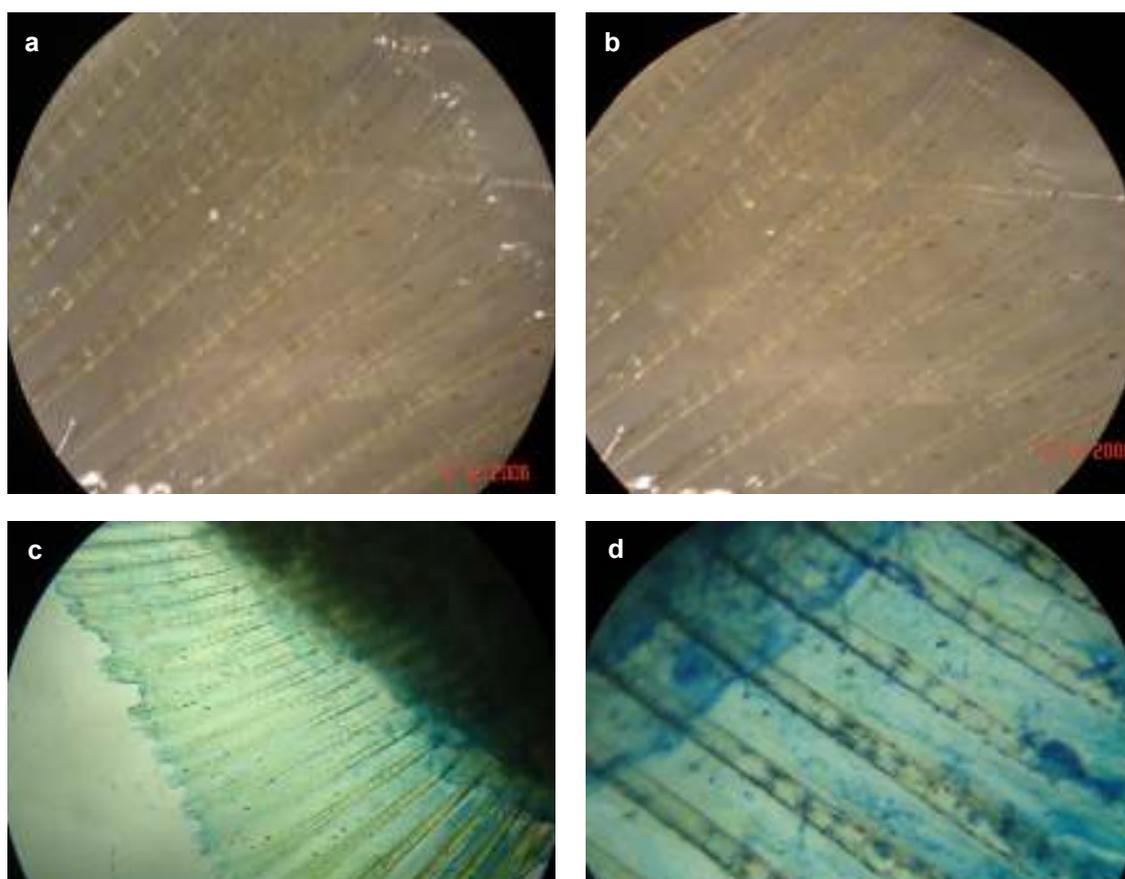


Figura 6. Observação em microscopia de pequeno aumento da nadadeira anal de indivíduo fêmea de *Astyanax altiparanae*, demonstrando a ausência de ganchos nas extremidades da estrutura óssea deste componente anatômico nestes indivíduos. Em (a) e (b) sem utilização de coloração; em (c) e (d), com utilização de coloração por azul de metileno.

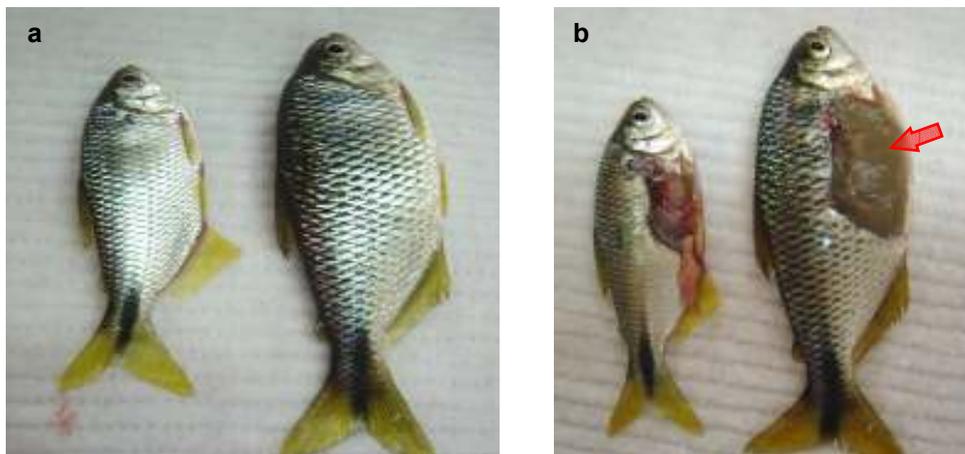


Figura 7. Aspectos externos e internos de indivíduos adultos de *Astyanax altiparanae*. Em (a), caracterização da diferença de tamanho entre exemplares adultos de macho (esquerda) e fêmea (direita). Em b, visualização da

diferenças no tamanho e na distribuição das gônadas na cavidade abdominal (setas) em exemplares de macho (esquerda) e de fêmea (direita).

2.3.2 Reprodução Induzida – “Desova Livre”

A denominação “desova livre” utilizada no presente trabalho de reprodução artificial de peixes é caracterizada quando fêmeas e machos recebem doses específicas de hormônios e são colocados juntos em aquários ou incubadoras, para que possam realizar as atividades de reprodução (Figura 8). Inicialmente, machos e fêmeas foram colocados em aquários separados até a aplicação da primeira dose de hormônio e colocados juntos nos aquários após a segunda dose de hormônio. Finalizada a administração das dosagens hormonais, após a segunda dosagem a temperatura da água foi registrada a cada 1 hora. Esta contagem de tempo e registro da temperatura da água permite estabelecer uma relação entre tempo e ação dos hormônios, denominada “hora grau”.

Estudos anteriores determinaram valores entre 180 a 200 de “hora-grau” para a ocorrência da desova livre no lambari. Após as aplicações hormonais e decorrido o período de tempo determinado, a reprodução pode ocorrer naturalmente sem a necessidade de manipulação e extrusão dos gametas. Os reprodutores são então retirados dos aquários ou incubadoras após a ocorrência da desova, evitando-se a possibilidade de canibalismo da prole pelos parentais. Em alguns casos, as fêmeas de lambari podem “abortar” a desova, liberando os ovócitos logo após a administração da primeira dose de hormônio.



Figura 8. Casais de *Astyanax altiparanae* mantidos na incubadora para realização da desova livre, acomodados em uma tela para facilitação da retirada dos indivíduos da incubadora após a desova, para evitar possível canibalismo da prole pelos parentais.

Na aplicação desta técnica reprodutiva, utilizou-se o método da hipofisação com o uso de extrato bruto de hipófise de carpa, aplicando-se dosagens fracionadas nas fêmeas e nos machos (WOYNAROVICH, 1986). O extrato de hipófise foi preparado a partir de material (hipófises) extraído de outros peixes em estado de reprodução (Figura 9a). As glândulas, que são conservadas secas, são maceradas e o produto suspenso em soro fisiológico sendo então aplicado na região da base da nadadeira peitoral dos animais (Figura 9b). As dosagens foram

administradas nas fêmeas e nos machos em intervalos que variaram de 8 a 12 horas entre a primeira e a segunda aplicação, conforme descrito nos tratamentos ilustrados na Tabela 1.

A variação nos intervalos das aplicações entre as primeiras e segundas doses de hormônio é determinada conforme a resposta de ovulação das fêmeas.

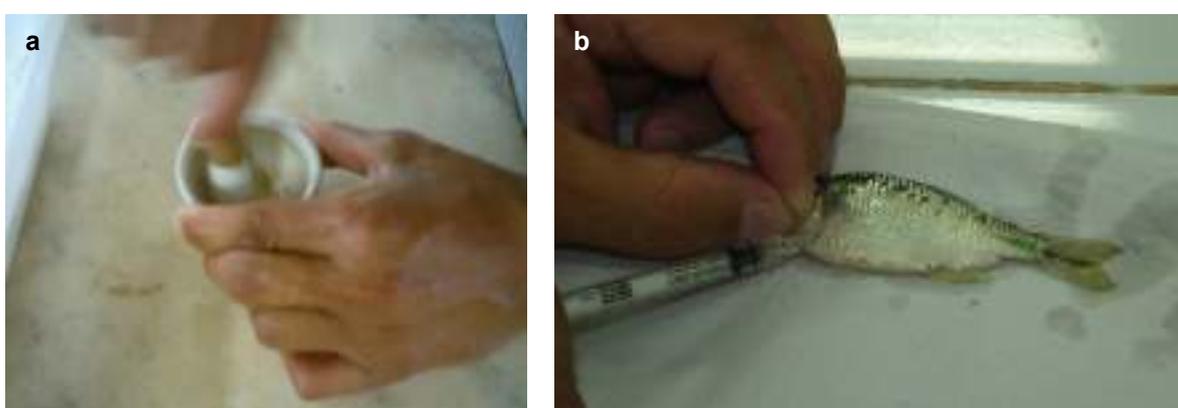


Figura 9. (a) Preparação do extrato contendo os hormônios indutores da reprodução, utilizando-se hipófises de carpa; (b) aplicação do hormônio para indução da reprodução, realizada na base da nadadeira peitoral do animal.

Tabela 1. Aplicação, dosagens de extrato bruto diluído de hipófise e intervalo entre as aplicações em fêmeas e machos de *Astyanax altiparanae*, conforme tratamentos 1 e 2.

TRATAMENTOS	APLICAÇÃO	DOSAGEM	INTERVALO
1	Primeira Dosagem (1)	1,5 mg de hipófise/kg de peixe	-
(Fêmeas)	Segunda Dosagem (2)	4,0 mg de hipófise/kg de peixe	8 HORAS/12 HORAS
2	Primeira Dosagem (1)	1,0 mg de hipófise/kg de peixe	-
(Machos)	Segunda Dosagem (2)	1,0 mg de hipófise/kg de peixe	8 HORAS/12 HORAS

Neste método de reprodução induzida, os reprodutores são normalmente colocados nos tanques na proporção de 2 machos para cada fêmea (2:1). Tal proporção, embora considerada em bases empíricas aplica-se como a proporção sexual mais razoável para se atingir à melhor taxa de fecundidade na “desova livre”. Para contrapor tal método empírico, foram testadas diferentes razões sexuais para observação da influência determinada pelas diferentes proporções de machos para cada fêmea, com observação posterior das taxas de fertilização de ovos e porcentagem de nascimento de larvas obtidas. Na tabela abaixo (Tabela 2), está colocada a proporção de sexos e a razão sexual nos testes realizados de “desova livre”. A realização de testes com a variação apenas na proporção dos machos deve-se ao fato de que a produção de esperma é bastante restrita nesta espécie, representando um fator determinante e limitante nos programas de reprodução com vistas à produção intensiva.

Tabela 2. Proporção de sexos e razão sexual dos testes realizados na “desova livre” de *Astyanax altiparanae*.

TRATAMENTOS	MACHOS	FÊMEAS	RAZÃO SEXUAL
M1	20	20	1:1
Réplica M1	20	20	1:1
M2	40	20	2:1
Réplica M2	40	20	2:1
M3	60	20	3:1
Réplica M3	60	20	3:1
M4	80	20	4:1
Réplica M4	80	20	4:1

* As dosagens e aplicações nestes testes repetem a metodologia descrita acima para a reprodução induzida de desova livre.

2.3.3 Reprodução Induzida – Extrusão de Gametas

Após a seleção de reprodutores, a realização do processo de indução da reprodução artificial de peixes por meio da extrusão de gametas inicia-se com a separação dos lotes de machos e fêmeas, que devem ser estocados em diferentes recipientes e mantidos isolados. Adotou-se como padrão a utilização de lotes de 500 peixes para cada evento de reprodução induzida por extrusão de gametas, selecionando-se entre 100 fêmeas e 400 machos, aproximadamente.

No processo de indução da reprodução do lambari, utilizou-se preferencialmente hormônio sintético a base de gonadotrofina coriônica humana (hCG) cuja ação é praticamente idêntica à do hormônio luteinizante (LH) presente na hipófise. Neste caso, utilizou-se o hormônio Profasi HP gonadotrofina coriônica humana (hCG) altamente purificada conforme descrição do fabricante, produto este facilmente encontrado nas farmácias de alopatia. Este hormônio sintético apresenta-se em ampolas de 2.000, 5.000 e 10.000UI (Unidades Internacionais de gonadotrofina coriônica humana), acompanhadas de ampola de solução de diluição com a seguinte composição: cloreto de sódio – 9 mg e água destilada – 1 ml. Como a reprodução do lambari é realizada em lotes de aproximadamente 500 animais, por conveniência optou-se pelas ampolas de 2.000 UI, evitando sobras e a conseqüente perda de viabilidade do produto que é facilmente degradado após a sua manipulação. O hormônio sintético foi preparado sempre imediatamente antes do uso e aplicado conforme o esquema apresentado na Figura 10.

Hormônio Sintético (hCG)

Ampolas de 2000 UI



Exemplo

PRIMEIRA DOSE (FÊMEAS) = 1 UI/g →



1 UI/g X 1000 g = 1000 UI



Diluir o hormônio em 1 ml de solvente (solução estoque), pegar 0,5 ml desta solução estoque e diluir em 9,5 ml de soro fisiológico. Aplicar 0,1 ml da solução final em cada fêmea na dosagem de 1 UI/g.

* Exemplo utilizado para a primeira dosagem hormonal em fêmeas de lambari

Figura 10. Esquema de aplicação do hormônio sintético (hCG) na indução de reprodução em *Astyanax altiparanae*.

As dosagens foram aplicadas utilizando-se doses fracionadas nas fêmeas e nos machos. O hormônio sintético foi diluído em soro fisiológico e aplicado na região da base da nadadeira peitoral dos animais (Figura 11). As injeções foram administradas nas fêmeas e nos machos, com intervalo de 12 horas entre a primeira e segunda aplicação, conforme descrito nos tratamentos ilustrados na Tabela 3.



Figura 11. Aplicação do hormônio para a indução da reprodução. A agulha é introduzida na base da nadadeira peitoral do animal.

Tabela 3. Dosagens e aplicações de hormônio sintético em fêmeas e machos de *Astyanax altiparanae*, conforme tratamentos 1 e 2.

TRATAMENTOS	APLICAÇÃO	DOSAGEM	INTERVALO
1	Primeira Dosagem (1)	1,0 UI de hormônio/g de peixe	-
(Fêmeas)	Segunda Dosagem (2)	3,0 UI de hormônio/g de peixe	12 HORAS
2	Primeira Dosagem (1)	Sem aplicação	-
(Machos)	Segunda Dosagem (2)	2,5 UI de hormônio/g de peixe	12 HORAS (relação Fêmea)

Realizada a administração das dosagens hormonais, a temperatura da água foi registrada a cada 1 hora, após a aplicação da segunda dosagem. Com isso, foi determinada a hora-grau para a desova do lambari, estabelecida entre os valores de 140 e 160 e atingido este valor, foi realizada a extrusão dos gametas das fêmeas e dos machos. Inicialmente, as fêmeas foram retiradas dos aquários e muito bem enxugadas com pano seco e limpo, para que se iniciasse o procedimento da extrusão dos ovócitos sem a presença de água, evitando a ativação do fechamento da micrópila do ovócito. Este procedimento é realizado exercendo-se pressão suave com os dedos no abdômen dos animais na direção antero-posterior (Figura 12), de modo a provocar a liberação dos ovócitos e do esperma no recipiente coletor.

Os gametas femininos foram depositados em placas de Petri ou em cubas de louça (Figura 12), aguardando os procedimentos de extrusão dos gametas dos machos, que são

depositados sobre os ovócitos (Figura 13). Conforme verificado na realização de protocolos preliminares de reprodução induzida desta espécie, constatou-se que os indivíduos do sexo masculino do lambari liberam pouca quantidade de esperma durante a extrusão. Para a situação controle dos experimentos utilizou-se então o esperma colhido de 2 a 3 machos para cada fêmea, procurando garantir mais segurança de sucesso no processo da reprodução.

Realizada a extrusão dos gametas, procedeu-se à homogeneização dos mesmos que pode ser feita com o auxílio de uma pena grande ou simplesmente utilizando os dedos das mãos previamente lavados e secos (Figura 14a). Em seguida, na fase final do processo, adicionou-se água à mistura dos gametas contidos no recipiente para a ativação destes e ocorrência da fertilização (Figura 14b). Após cerca de 2 minutos da mistura com água, iniciou-se o processo de lavagem dos ovos em água corrente no mesmo recipiente; esta atividade prosseguiu por alguns minutos, até a completa eliminação de restos celulares. Os ovos foram então depositados em incubadoras de cerca de 160 litros, na proporção de 10 desovas por incubadora (Figura 15a e 15b), quando foram realizados os experimentos gerais de viabilidade do processo utilizado. Foram realizadas seguidas amostragens de embriões nas primeiras horas da incubação para acompanhamento e registro das taxas de fertilização.



Figura 12. Extrusão dos ovócitos de fêmeas do lambari, *Astyanax altiparanae*.



Figura 13. Extrusão dos gametas masculinos do lambari, *Astyanax altiparanae*, que são depositados sobre os ovócitos das fêmeas.

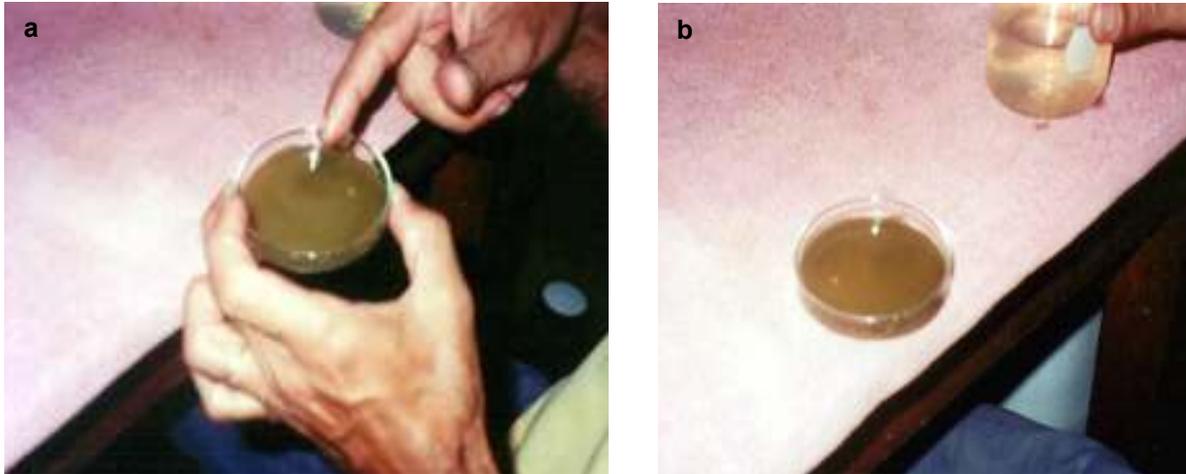


Figura 14. (a) Homogeneização dos gametas do lambari, *Astyanax altiparanae*, com o dedo; (b) adição de água da incubadora à mistura de gametas, para efetivação do processo de fertilização dos ovócitos.

Figura 15. (a) Ovos do lambari após a fertilização, no processo de limpeza em água corrente; (b) incubadoras de fibra de vidro, com capacidade aproximada de 160 litros, onde foram depositados os ovos de *Astyanax altiparanae* para o seu desenvolvimento até a eclosão e nascimento das larvas.



2.3.4 Desenvolvimento Embrionário

Durante o período de desenvolvimento embrionário que se realiza nas incubadoras de ovos, foram realizadas coletas de amostras de embriões em diferentes tempos de incubação. Inicialmente, na primeira hora do desenvolvimento, foram coletados ovos a cada 10 minutos, a partir do ponto zero (fertilização). Após a primeira hora, os ovos foram coletados a cada 1 hora até a eclosão das larvas. Os ovos coletados nos devidos tempos foram fixados em solução de KARNOVISK (1965) por 48 horas a 4°C, lavados e estocados em álcool 70% para posterior coloração em hematoxilina e análise em microscopia de luz.

Durante a análise do desenvolvimento embrionário da espécie estudada, realizada por meio da microscopia de luz, foram geradas tabelas que representam a morfologia e as fases do desenvolvimento embrionário desde as fases iniciais do embrião até a eclosão da larva. Os protocolos de estudo do desenvolvimento embrionário do lambari poderão fornecer informações detalhadas para a possível aplicação das técnicas de manipulação cromossômica, principalmente para a indução de poliploidia que exige a aplicação de choques térmicos ou de pressão hidrostática em momentos determinados do período inicial da clivagem do embrião.

2.3.5 Larvicultura

Após a eclosão, as larvas permaneceram nas incubadoras até atingirem a fase de pós-larva. A sobrevivência das larvas foi acompanhada pela observação do desenvolvimento até a absorção total do saco vitelínico e início da alimentação exógena, ocorrido com cerca de 18 horas.

2.3.6 Testes de Aplicação das Técnicas de Manipulação Cromossômica

As técnicas de poliploidia empregadas foram aplicadas somente após o estabelecimento dos protocolos de desenvolvimento embrionário da espécie, onde foram estimados os tempos reais das fases do desenvolvimento e início da clivagem nos embriões. Com a caracterização do tempo e das transformações embrionárias, tentativas de indução de triploidia e de tetraploidia foram realizados com a utilização de tratamentos com altas e baixas temperaturas da água, bem como com a aplicação de choques de pressão hidrostática de diferentes intensidades.

Para indução da triploidia, foram aplicados choques de temperatura e pressão no início do processo de desenvolvimento precisamente após a fecundação, na tentativa de determinar a retenção do segundo corpúsculo polar do óvulo e permitir, assim, a formação de embriões com dois lotes genômicos maternos e um paterno. O protocolo utilizado foi formulado com base nas informações compiladas a partir dos trabalhos de THORGAARD (1983); TOLEDO-FILHO (1996); MOREIRA (2001) e de HUERGO (2004), entre outros.

A indução de tetraploidia foi testada com a realização de aplicação dos choques de temperatura e pressão hidrostática antecedendo à primeira clivagem do ovo, que proporciona a fusão dos dois blastômeros em formação no início do desenvolvimento embrionário, possibilitando a origem de embriões tetraplóides que apresentam o dobro do lote genômico normal da espécie. O protocolo utilizado foi formulado com base nas informações copiladas a partir dos trabalhos de THORGAARD (1983); TOLEDO-FILHO (1996) e de MOREIRA (2001), entre outros, realizados com diferentes espécies.

A comprovação da efetividade dos tratamentos de triploidia e tetraploidia foi realizada por análises citogenéticas, sendo utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos a técnica descrita por FORESTI *et al.* (1993). Para caracterização de poliploidia, foi utilizada a coloração das células pela impregnação com nitrato de Prata, segundo a técnica descrita por HOWELL & BLACK (1980) e utilizada por FORESTI *et al.*, (1994) no estudo da triploidia induzida em pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

Foram utilizadas duas desovas para cada tratamento ou seja, óvulos de duas fêmeas fertilizadas para cada teste, estimando-se entre 5.000 a 6.000 ovos para cada tratamento, obtidos de fêmeas com peso entre 15 a 25 gramas.

2.3.6.1 *Choques de Temperatura*

Os testes de indução de triploidia e tetraploidia por choques de temperatura, foram realizados de acordo com os protocolos apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Protocolo de testes de indução de triploidia em *Astyanax altiparanae*, com a aplicação de choques com diferentes temperaturas e tempos de exposição.

TRATAMENTO	TEMPERATURA DO CHOQUE	INÍCIO DO CHOQUE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
TRI 1	38°C	2' após fecundação	3 minutos
TRI 2	38°C	5' após fecundação	3 minutos
TRI 3	40°C	2' após fecundação	3 minutos
TRI 4	40°C	5' após fecundação	3 minutos
TRI 5	6°C	2' após fecundação	30 minutos
TRI 6	6°C	5' após fecundação	30 minutos
CONTROLE	Ambiente	-	-

Tabela 5. Protocolo de testes de indução de tetraploidia em *Astyanax altiparanae*, com a aplicação de choques com diferentes temperaturas e tempos de exposição.

TRATAMENTO	TEMPERATURA DO CHOQUE	INÍCIO DO CHOQUE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
TETRA 1	36°C	20' após fecundação	1 minuto
TETRA 2	36°C	20' após fecundação	5 minutos
TETRA 3	38°C	20' após fecundação	1 minuto
TETRA 4	38°C	20' após fecundação	5 minutos
TETRA 5	6°C	20' após fecundação	60 minutos
TETRA 6	6°C	20' após fecundação	60 minutos
CONTROLE	ambiente	-	-

Para a realização dos choques térmicos, os tratamentos a quente foram realizados utilizando-se uma placa de aquecimento mostrada na Figura 16 (Marca Corning modelo Stirrer Hot Plate) e frascos (bequers) de 500 ml de volume com água da incubadora, onde foram colocados os ovos de cada tratamento do experimento. A placa de aquecimento permitiu a estabilização das temperaturas estabelecidas nos protocolos dos testes. Para a realização dos choques a frio utilizou-se água da incubadora resfriada na geladeira (Figura

17). Durante o tempo de exposição dos ovos a baixas temperaturas, os recipientes também foram colocados na geladeira, mantendo-se as temperaturas estabelecidas nos protocolos dos testes.

Tanto nos choques quentes quanto frios, as temperaturas dos tratamentos foram controladas utilizando-se termômetros com bulbo de mercúrio, evitando-se possíveis variações que poderiam influenciar na efetividade dos choques térmicos.

A efetividade dos tratamentos com choques de temperatura, foi avaliada por meio da taxa de sobrevivência de alevinos de lambari, para testar a viabilidade na aplicação das técnicas observando-se a ocorrência de triploídes e tetraploídes e o nível de letalidade decorrente dos tratamentos em comparação ao grupo controle.



Figura 16. Placa de aquecimento utilizada para choques de altas temperaturas.

O termômetro colocado no recipiente foi utilizado para controle e monitoramento da temperatura durante o tratamento de choque térmico quente sobre embriões de *Astyanax altiparanae*.



Figura 17. Realização dos choques térmicos em embriões de *Astyanax altiparanae* submetidos à baixa temperatura. A temperatura foi controlada por termômetros mergulhados na água contida nos recipientes.

2.3.6.2 Choques de Pressão Hidrostática

Os testes de indução de triploidia e de tetraploidia foram realizados conforme protocolos apresentados nas Tabelas 6 e 7. Os tratamentos com pressão hidrostática utilizados estão expressos em valores de psi (1 psi = 0,7031 Kg/cm²).

Tabela 6. Protocolo dos testes de triploidia utilizados para *Astyanax altiparanae*, com os embriões submetidos a choques de pressão hidrostática aplicados por diferentes tempos.

TRATAMENTO	Intensidade de pressão (psi)	Início do choque	Tempo de exposição
TRI 1	3000	2' após fecundação	5' minutos
TRI 2	4000	2' após fecundação	2' minutos
TRI 3	4000	2' após fecundação	5' minutos
TRI 4	4000	5' após fecundação	2' minutos
TRI 5	4000	5' após fecundação	5' minutos
TRI 6	4000	8' após fecundação	5' minutos
TRI 7	5000	5' após fecundação	5' minutos
CONTROLE	sem choque	-	-

Tabela 7. Protocolo dos testes de tetraploidia utilizados para *Astyanax altiparanae*, com os embriões submetidos a choques de pressão hidrostática aplicados por diferentes tempos.

TRATAMENTO	Intensidade de	Início do choque	Tempo de
------------	----------------	------------------	----------

	pressão (psi)		exposição
TETRA 1	3000	20' após fecundação	5' minutos
TETRA 2	4000	20' após fecundação	2' minutos
TETRA 3	4000	20' após fecundação	5' minutos
TETRA 4	4000	20' após fecundação	2' minutos
TETRA 5	4000	20' após fecundação	5' minutos
TETRA 6	4000	20' após fecundação	8' minutos
TETRA 7	5000	20' após fecundação	5' minutos
CONTROLE	sem choque	-	-

Para a realização dos testes de poliploidia utilizando choques de pressão hidrostática, utilizou-se uma câmara de aço com volume aproximado de 300 ml, equipada com êmbolo pelo qual foi exercida a força produzida por prensa hidráulica (Figura 18) onde foram colocados os ovos de *Astyanax altiparanae* de cada tratamento nos testes de triploidia e tetraploidia.

Os protocolos utilizados incluíram apenas os testes considerados não letais em observações prévias à realização dos experimentos do trabalho. A exclusão de cada teste é comentada no capítulo dos resultados.

A efetividade dos tratamentos foi avaliada por meio da determinação da taxa de sobrevivência dos alevinos, que forneceu indicações sobre a viabilidade da aplicação das técnicas. Foi registrada a ocorrência de indivíduos triploides e tetraploides e o nível de letalidade decorrente dos tratamentos, em comparação ao grupo controle.



Figura 18. (a) Aparelho utilizado para produção de pressão hidrostática (b) apresentando câmara de aço com volume de cerca de 300 ml, equipada com êmbolo pelo qual é exercida a força produzida por prensa hidráulica, para atingir os níveis de pressão exigidos e medidos em psi. Em (c), detalhe da câmara, onde são depositados os ovos de *Astyanax altiparanae*.

2.3.7 Análises Citogenéticas

As análises citogenéticas foram realizadas com o objetivo de identificar a ploidia dos indivíduos nos tratamentos e no grupo controle. Foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (LOZANO *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vitro* (FORESTI *et al.*, 1993), preparações diretas de células renais *in vivo* (FORESTI *et al.*, 1981) e coloração das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) com Nitrato de Prata (HOWELL & BLACK, 1980). Algumas modificações foram realizadas nessas técnicas, ajustando-as para a espécie estudada.

2.3.7.1 Estimulação de Mitoses

Em algumas preparações cromossômicas foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular para obtenção de maior número de mitoses nos indivíduos, que constou de injeção de solução de fermento biológico segundo OLIVEIRA *et al.* (1988). O procedimento utilizado consistiu em:

- 1) preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2) incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min;

- 3) injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal. A injeção da quantidade total é realizada em duas doses, dividida e aplicada no período de 48 h;
- 4) manter o animal em aquário bem aerado.

2.3.7.2 *Preparação Direta para Obtenção de Cromossomos Mitóticos de Peixes*

➤ *Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos in vivo*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo* foi a descrita por FORESTI *et al.* (1981) e utilizada com algumas modificações. O procedimento consiste em:

- 1) injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;
- 2) deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 min;
- 3) sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);
- 4) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 5) transferir a solução obtida para um tubo de centrifuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;
- 6) retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 7) adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrifuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 8) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 9) repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
- 10) pingar o material em lâminas;
- 11) deixar secar ao ar.

As lâminas podem ser guardadas no congelador durante muito tempo, servindo, assim, para aplicação de várias técnicas de bandamento cromossômico.

➤ *Técnica de obtenção de cromossomos metafásicos “in vitro”*

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos *in vitro* foi a descrita por FORESTI *et al.* (1993) e utilizada com algumas modificações. O procedimento consistiu em:

- 1) sacrificar o animal, retirando tecidos da parte anterior do rim, brânquias e testículos no caso dos machos;
- 2) colocar os tecidos retirados em placas de Petri contendo 6 ml de solução de Hanks em temperatura ambiente;
- 3) dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, dissociar inicialmente o material com pinças de ponta fina e depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur;
- 4) retirar a suspensão celular da placa de Petri e transferi-la para um tubo de centrifuga. Acrescentar 1 gota de solução de colchicina a 0,05% e agitar levemente.
- 5) transferir o tubo para o interior de uma estufa a 37°C por 15 min;
- 6) centrifugar o material a 1000rpm por 8 min. Retirar e descartar o sobrenadante, acrescentar 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) e agitar levemente;
- 7) retornar o tubo para o interior da estufa a 37°C por 30 min;
- 8) retirar o tubo contendo suspensão de células da estufa, adicionar 5 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente) e agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur. Deixar repousar por 5 min em temperatura ambiente;
- 9) adicionar cerca de 6ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrifuga (1000 ± 100 rpm) por 10 minutos;
- 10) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador novo. Centrifugar por 7 minutos a 1000 ± 100 rpm;
- 11) repetir o item 8 por duas ou três vezes e fazer a suspensão final;
- 12) pingar o material em lâminas;
- 13) deixar secar e proceder à coloração.

As lâminas podem ser guardadas no congelador durante muito tempo, servindo, assim, para aplicação de várias técnicas de bandamento cromossômico.

2.3.7.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (Ag-NO₃).

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por HOWELL & BLACK (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentam-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1 g de AgNO₃ dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das NORs é o seguinte:

- 1) hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 min em HCl 1N a 60°C;
- 2) secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 3) deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3), a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada, retirando a lamínula e deixar secar;
- 4) corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6.7) por aproximadamente 10 seg;
- 5) deixar secar ao ar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Reprodução Induzida

A seleção de reprodutores para aplicação nos experimentos de reprodução induzida foi realizada em indivíduos adultos do lambari-do-rabo-amarelo estocados nos tanques da estação de piscicultura. A escolha dos indivíduos e identificação de sexos foi realizada com base nas diferenças morfológicas entre machos e fêmeas e em caracteres sexuais secundários externos, indicadores também do grau de maturidade sexual dos exemplares, conforme caracterizado na Figura 4.

Trabalhos anteriormente realizados sobre a reprodução induzida do lambari *Astyanax bimaculatus* demonstraram que nesta espécie, enquanto a nadadeira anal das fêmeas permanece lisa e sem espículas, nos machos ela se apresenta com pequenos ganchos nas extremidades dos ossículos formadores deste apêndice. Este tipo de dimorfismo sexual também aparece em vários representantes de Characidae capturados no ambiente natural nos seus períodos reprodutivos (SATO *et al.*, 2006) e mostraram-se fundamentais para a sexagem dos indivíduos na espécie estudada no presente trabalho, *Astyanax altiparanae*. Além disso, foi observado que em condições de cultivo utilizando-se altas densidades de estocagem, a presença das espículas nos machos se manteve e pode ser detectada por longo tempo nos indivíduos, em alguns casos ocorrendo esse tipo de dimorfismo sexual durante todo o ano.

Na reprodução induzida do lambari (*Astyanax altiparanae*) foi utilizado o processo padrão da formação de “pools” de reprodutores, constituídos por cerca de 500 animais por evento reprodutivo, para facilitação dos cálculos das dosagens hormonais e, principalmente, para promover viabilização da produção de pós-larvas para serem estocadas nos tanques e viveiros de piscicultura. Foi observado que tanto na reprodução induzida por desova livre como naquela por extrusão de gametas, com realização de fecundação controlada, os ovócitos apresentaram cores diferenciadas em tonalidades de marrom, aparecendo o produto da desova também esverdeado ou amarelado (Figura

19). Esta variação de coloração do material gamético extrusado das fêmeas, de ocorrência comum nas espécies do grupo, já havia sido observada também por IHERING & AZEVEDO (1936).

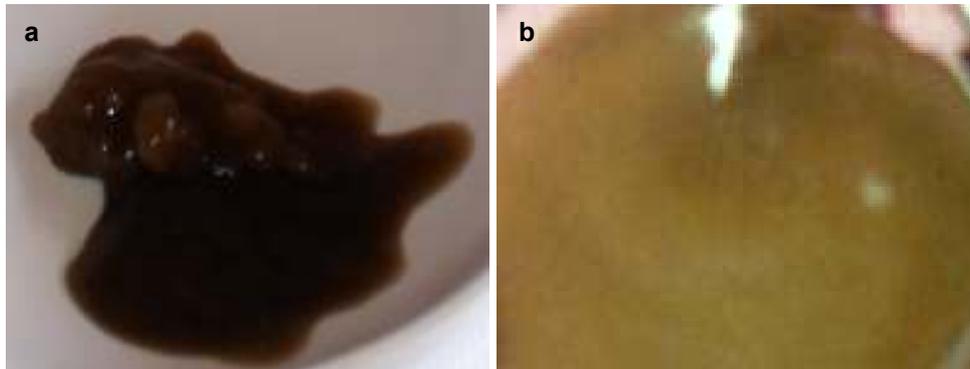


Figura 19. Aspecto geral dos ovócitos obtidos de fêmeas maduras de *Astyanax altiparanae*, apresentando diferentes colorações para o produto gamético; (a) cor marrom e (b) cor verde-amarelada.

Foi verificado que as diferenças de coloração apresentadas pelo produto da desova aparentemente não determinaram diferenças no desempenho reprodutivo das fêmeas manipuladas na reprodução induzida. Supõe-se que o diferencial na coloração dos ovócitos poderia tratar-se apenas de um politipismo pigmentar, sem qualquer influência na viabilidade reprodutiva das fêmeas, durante a realização da reprodução artificial. Por outro lado, há necessidade de verificação da possibilidade de determinadas cores do produto estarem associadas com a idade e desenvolvimento dos gametas nesta espécie, fatos determinantes para o sucesso da aplicação do processo reprodutivo. Foi observado também que após a fertilização os ovos passaram a apresentar tênue camada pegajosa revestindo o córion tornando-se semi-aderente. Esta característica também foi descrita por SATO *et al.*, (2006), nos estudos das características dos gametas e do processo de reprodução induzida de *Astyanax bimaculatus*.

3.1.1 “Desova Livre”

A realização do processo de reprodução denominado “desova livre” permite a obtenção de boas taxas de nascimento de larvas. Avaliando os resultados obtidos durante os testes realizados, a média da fecundação ficou entre 40 e 60%, utilizando-se 2 machos para cada fêmea, razão sexual usualmente empregada na execução dos protocolos para reprodução desta espécie na estação de

piscicultura da GA-Alevinos e comumente utilizada também pelos produtores. Esta relação serviu como controle e como base de comparação para os diferentes tratamentos experimentais realizados sobre a proporção de sexos dos reprodutores na reprodução de *Astyanax altiparanae*.

As aplicações das dosagens de extrato bruto de hipófise carpa nos reprodutores de lambari variaram em intervalos entre 8 e 12 horas. A variação nos intervalos das aplicações entre as primeiras e segundas doses de hormônio foi determinada conforme a resposta de ovulação das fêmeas, uma vez que as condições ambientais, a nutrição e a saúde dos peixes podem interferir diretamente na maturação gonadal dos lotes de reprodutores, influenciando assim, a possibilidade de manipulação da reprodução artificial (PORTO-FORESTI *et al.*, 2005). Por tratar-se de uma técnica empírica, a reprodução induzida por hormônios hipofisários pode ser alterada estrategicamente em dosagens e intervalos de aplicação, tendo por base os melhores resultados da reprodução e sobrevivência das larvas de peixes conforme indicado por WOYNAROVICH (1986).

Seguindo a metodologia de reprodução induzida utilizada rotineiramente para espécies de peixes tropicais, após a aplicação das dosagens específicas de hormônios indutores foi realizado acompanhamento da sua ação fisiológica, sendo utilizados valores de hora-grau adequados para esta espécie, que resultaram na expulsão dos produtos gaméticos em torno de 180 a 200 horas-grau. Após ser efetuada a fertilização foram levantados dados de efetividade deste processo por meio da contagem direta dos embriões viáveis e em desenvolvimento nas incubadoras, bem como realizadas estimativas de sobrevivência pela contagem dos indivíduos na fase de pós-larva, no momento da soltura nos tanques de alevinagem.

A viabilidade dos embriões e larvas obtidos por meio desta técnica também pode ser fundamentada no fácil manejo dos reprodutores e o reduzido tempo de manipulação dos peixes durante a reprodução. Foi verificado que a taxa de sobrevivência dos reprodutores após a realização do processo de reprodução ficou entre 95 a 97%. Estes altos valores de sobrevivência provavelmente puderam ser obtidos devido ao baixo nível de estresse a que os parentais foram submetidos, uma vez que cuidados foram tomados para evitar a ocorrência de lesões no corpo dos animais, que poderiam resultar em ferimentos ou na perda de escamas. Contudo, foi registrada a morte de alguns indivíduos que deve ter ocorrido provavelmente devido ao processo fisiológico de ação dos hormônios indutores da reprodução, administrados de acordo com os protocolos estabelecidos para indução do processo reprodutivo.

A reprodução por desova livre pode ser realizada entre os meses de setembro a fevereiro, sendo que o período compreendendo os meses de novembro, dezembro e janeiro, é considerado o mais adequado para a realização deste tipo de reprodução para a maioria das espécies de peixes desta região, incluindo o lambari-do-rabo-amarelo. Tal afirmação tem por base os dados obtidos de frequência de reprodução, sendo que a desova obtida para a maioria das fêmeas (entre 90 a 100%) coincide com o período citado anteriormente. Nos meses de setembro, outubro e fevereiro a reprodução pode ser tentada, mas verifica-se que é maior o número de fêmeas que “falham”, não realizando a ovulação esperada ou produzindo ovócitos imaturos que resultam em baixas taxas de fertilização.

Deve ser ressaltado ainda que esta alternativa de reprodução, do ponto de vista da sua maior viabilidade de aplicação, limita-se ao período mais intenso da reprodução natural do lambari que neste caso foi observado ocorrer principalmente durante os meses de novembro a janeiro, podendo eventualmente ser diferente para outras regiões do país (SATO *et al.*, 2006). No caso da localidade exercer alguma influência nos resultados da reprodução sugere-se o melhor acompanhamento dos reprodutores, com relação à manifestação das características sexuais secundárias e pela realização de testes para avaliações dos melhores períodos para a aplicação desta técnica.

3.1.2 Razão sexual na Desova Livre

Com a aplicação do método de “desova livre” na reprodução do lambari, foram testadas e comparadas diferentes proporções de machos para cada fêmea, na tentativa de buscar mais eficiência na aplicação desta técnica. A escolha de variação na razão sexual dos reprodutores, com a utilização de número maior de indivíduos do sexo masculino em relação ao feminino, além da busca de maior efetividade do processo de fertilização, também responde aos requisitos de conservação genética do estoque. Os dados de estudos sobre melhores combinações nos cruzamento apontam para o fato de que a utilização de maior número de machos pode significar maior possibilidade de aumento de variabilidade genética e heterose nas futuras gerações, desde que os parentais não sejam portadores de baixa diversidade genética e endogâmicos (TOLEDO-FILHO, 1996).

Por outro lado, sabe-se que na espécie utilizada no presente trabalho, os machos produzem pouca quantidade de esperma, inviabilizando algumas vezes a aplicação de programas de reprodução por extrusão de gametas. Assim, o estabelecimento de uma relação adequada entre o número de

fêmeas e de machos utilizados nos cruzamentos poderia se constituir num fator de garantia da produção.

Após a realização dos procedimentos da técnica de reprodução induzida e obtenção da desova livre, amostras de embriões foram analisadas em microscópio estereoscópico, para estabelecimento dos fatores de fertilidade e determinação da frequência de embriões viáveis no processo da reprodução. Considera-se que a sobrevivência indicada seja o reflexo da taxa de fertilização obtida. Os resultados obtidos sobre a razão sexual com os melhores índices de sobrevivência neste tipo de reprodução induzida, estão relacionados na Tabela 8 e indicam o tratamento M3, utilizando a proporção de 3 machos: 1 fêmea, com os maiores valores de sobrevivência (entre 69,3% e 69,7%, para a réplica). Também a razão utilizada no experimento M2, que utilizou a proporção de 2 machos: 1 fêmea, resultou em valores altos (65,8%) numa das réplicas; de modo semelhante o experimento M4, em que a razão foi de 4 machos: 1 fêmea, uma réplica apresentou 69,9% como taxa de sobrevivência. Os dados da Figura 20 demonstram que existe correlação dos dados entre a maior frequência de embriões que sobreviveram e o maior número de machos para cada fêmea, apesar de não serem significativos os valores de diferença obtidos pelo teste Qui-Quadrado. Estas observações são confirmadas pela análise dos dados que constam da Figura 21, demonstrando que tanto nos tratamentos quanto nas réplicas, o uso do maior número de machos para cada fêmea contribuiu para o aumento das taxas de fertilização, traduzidas pelos valores de maior sobrevivência dos embriões. Observa-se também uma tendência de estabilização dos valores no experimento M4, no qual a razão utilizada foi de 4 machos: 1 fêmea.

Tabela 8. Frequência de embriões de *Astyanax altiparanae* viáveis, resultantes da aplicação do processo de reprodução por “desova livre”, utilizando diferentes razões na relação do número de machos e de fêmeas.

TRATAMENTOS	MACHOS	FÊMEAS	RAZÃO SEXUAL M/F	SOBREVIVÊNCIA %	HORA GRAU
M1	20	20	1:1	39,7	180
RÉPLICA M1	20	20	1:1	38,9	180
M2	40	20	2:1	32,4	180
RÉPLICA M2	40	20	2:1	65,8	180
M3	60	20	3:1	69,3	180

RÉPLICA M3	60	20	3:1	69,7	180
M4	80	20	4:1	56,6	180
RÉPLICA M4	80	20	4:1	69,9	180

* Razão sexual significativamente diferente para $p < 0,001$, Qui-quadrado teste.

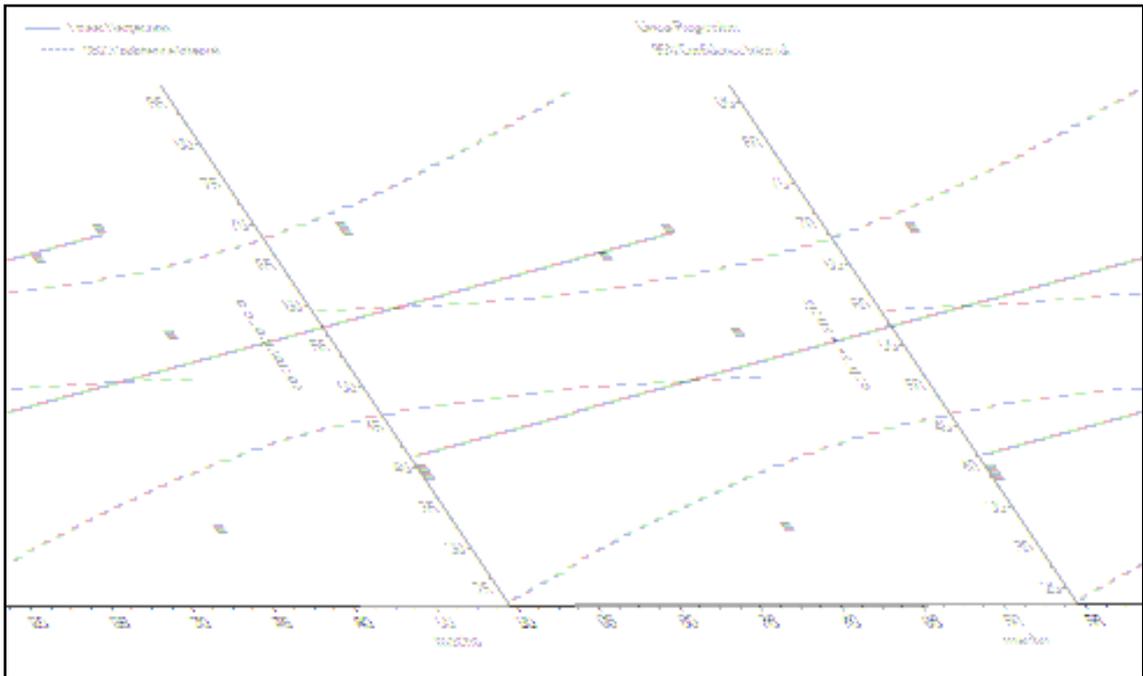


Figura 20. Correlação linear entre a relação do número de machos para o de fêmeas de *Astyanax altiparanae* presentes e a formação de embriões viáveis. Equação da reta: $y = 0,459x + 32,3$

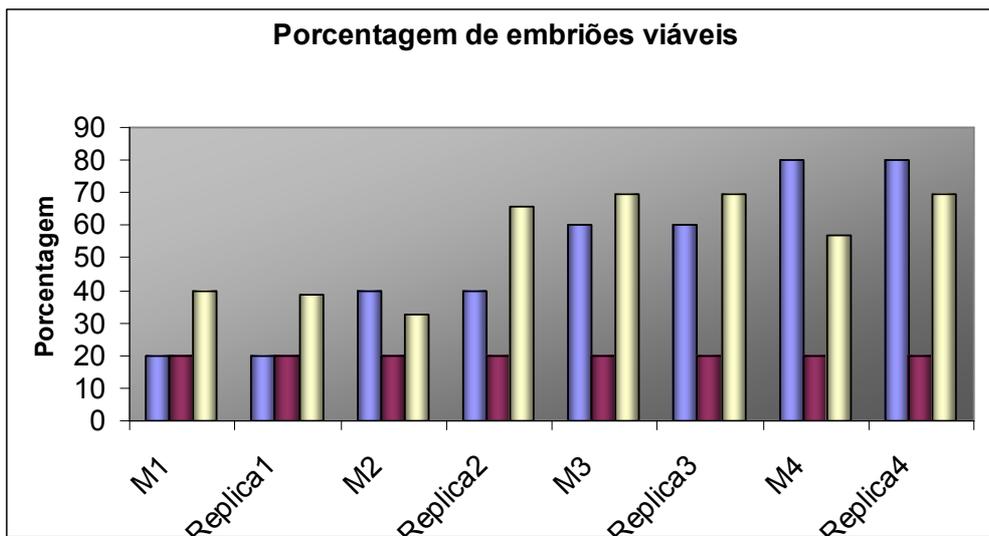


Figura 21. Porcentagem de sobrevivência de embriões de *Astyanax altiparanae* em diferentes razões sexuais utilizados na reprodução por “desova livre”.

3.1.3 Desova por Extrusão de Gametas

A aplicação desta técnica pode apresentar vários aspectos favoráveis à sua utilização em programas de reprodução do lambari-do-rabo-amarelo como nos casos em que se fizesse necessário o prolongamento do período de obtenção de larvas desta espécie fora da época normal e de reprodução intensiva. Esta técnica foi utilizada em diferentes testes durante o período que compreendeu o mês de setembro de um ano até o mês de maio do ano seguinte. Não foi aplicada apenas durante os meses de ocorrência de baixas temperaturas da água, típicas dos meses de outono e inverno na região. Nestas condições, as gônadas dos peixes também passam por alterações na atividade tecidual, reduzindo ou cessando a produção de gametas (VAZZOLER, 1996). A aplicação desta técnica permitiu a manipulação dos gametas e dos embriões do lambari, com a caracterização e controle das fases do desenvolvimento embrionário, possibilitando, assim, a realização de testes de com técnicas genéticas de manipulação cromossômica na espécie *Astyanax altiparanae*.

Os resultados obtidos com a reprodução induzida por extrusão de gametas são relevantes sob os aspectos de produtividade de larvas, facilidade da manipulação dos gametas e manejo geral da espécie que esta técnica pode proporcionar. Nos testes realizados, o uso de hormônios sintéticos sugere uma eficiência maior em comparação aos resultados obtidos quando foram utilizados extratos hipofisários. A hipofização foi utilizada como teste de reprodução, tendo sido relacionados casos de fêmeas que não ovularam ou que abortaram, liberando os ovócitos precocemente e em momento impróprio para a fertilização, contudo, em número menor do que aquelas que se desenvolveram segundo o protocolo normal de reprodução artificial. Para a espécie utilizada e consideradas as condições do experimento, a aplicação deste indutor natural mostrou-se pouco relevante, em

comparação aos resultados obtidos com o uso de hormônio sintético. Portanto, o uso de extratos hipofisários neste caso, ficou restrito à aplicação nos protocolos de reprodução induzida de desova livre.

Tais resultados poderiam ser decorrentes do fato de que enquanto o hormônio sintético apresenta-se como uma substância mais pura, precisa e homogênea, o extrato hipofisário pode conter diferentes tipos de impurezas como restos de tecidos e substâncias com diversas atividades, como proteínas e hormônios, que poderiam interferir na perfeita ação dos componentes indutores da reprodução nos peixes.

O emprego desta técnica tornou-se rotina nas estações de piscicultura onde se desenvolveu este trabalho. Durante o período de reprodução dos peixes foram observadas taxas de fecundação e sobrevivência larval entre 78,0% e 88,4%, conforme mostrado na Tabela 9. Nesta tabela estão relacionados os resultados tratamentos dos testes de reprodução, mostrando as altas taxas de sobrevivências obtidas para os embriões de lambari pelo processo de reprodução induzida por extrusão de gametas, utilizando-se gametas obtidos e utilizados na proporção de três machos extrusados para cada fêmea (razão sexual 3:1) e hora-grau de 140 para a realização da extrusão. Como observado para a reprodução por “desova livre”, a utilização de maior proporção de machos (3:1) em relação à das fêmeas, também se mostra mais vantajosa, pois, além de garantir mais segurança de sucesso da reprodução também pode promover aumento da variabilidade genética da prole, com a participação de mais indivíduos parentais do sexo masculino na reprodução induzida (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996; PORTO-FORESTI *et al.*, 2005).

Comparando-se os protocolos utilizados na realização da reprodução de *Astyanax altiparanae* no presente trabalho com os dados relatados para *Astyanax bimaculatus* descritos por SATO *et al* (2006), podem ser verificadas diferenças nos valores da hora-grau para a realização da extrusão dos gametas, apresentados como 140 horas-grau para *Astyanax altiparanae* e 331 horas-grau para *Astyanax bimaculatus*. Deve ser considerado que a metodologia utilizada por aquele autor apresentou algumas diferenças em relação àquela utilizada no presente trabalho.

A sobrevivência dos reprodutores utilizados nos experimentos de reprodução mostrou taxa acima de 90% de sobrevivência, após as atividades de hipofização e extrusão dos gametas. Casos de perdas esporádicas de alguns indivíduos também ocorreram, provavelmente decorrentes da intensa manipulação desenvolvida nos procedimentos de extrusão dos gametas. Também devem ser

considerados os processos fisiológicos de ação dos hormônios indutores da reprodução administrados no organismo para indução do processo reprodutivo.

Tabela 9. Frequência de embriões de *Astyanax altiparanae* viáveis, resultantes da aplicação do processo de reprodução por “desova por extrusão”. Foi utilizada a razão de três machos para cada fêmea (3:1), com a extrusão realizada a partir de 140 horas-grau.

TRATAMENTOS	MACHOS	FÊMEAS	RAZÃOSEXUAL M/F	SOBREVIVÊNCIA %	HORA- GRAU
T1	3	1	3:1	79,8	140
T2	3	1	3:1	88,4	140
T3	3	1	3:1	87,4	140
T4	3	1	3:1	78,0	140

3.2 Embriogênese

A coleta de embriões foi realizada após a reprodução induzida por extrusão de gametas. Neste caso, a amostragem foi realizada durante e após a fertilização, proporcionando a observação de todas as etapas necessárias para o acompanhamento dos estádios do desenvolvimento embrionário do lambari. Na Tabela 10, estão representados os aspectos morfológicos e a descrição resumida das fases do desenvolvimento embrionário de *A. altiparanae*, a partir do momento da fertilização, realizada durante a primeira hora da embriogênese. Na Tabela 11 estão representadas as fases seguintes, a partir do início da segunda hora até a finalização da embriogênese e eclosão, completada com cerca de 11 horas de desenvolvimento, de embrião até a fase de larva. Destas tabelas constam também as medidas de temperatura da água da incubadora, que apresentou variação entre 25°C e 26°C durante o processo.

O tempo de incubação foi de 11 horas nas condições ambientais que influenciaram o desenvolvimento durante a incubação dos embriões. Observou-se, ainda, que em outras condições ambientais com temperaturas acima de 26°C, o desenvolvimento embrionário para esta espécie permaneceu em torno das 11 horas de incubação, sugerindo-se que este é período de tempo do desenvolvimento para incubação dos embriões até o nascimento das larvas, podendo ser considerado como padrão para esta espécie. Segundo estudos realizados por SATO *et al* (2006), a espécie *Astyanax bimaculatus* apresentou ovo adesivo e pequeno, com embriogênese de curta duração. A eclosão das larvas desta espécie ocorreu após tempo médio em 17 horas de incubação. Contudo, outros experimentos realizados pelo mesmo autor referentes ao processo reprodutivo desta espécie, revelaram tempos de incubação de 36 horas com a temperatura da água a 18 °C, de 18 horas a 23 °C e de 12 horas a 28 °C (SATO *et al.*, 2006), para o desenvolvimento completo dos embriões até a eclosão.

Tabela 10. Caracterização sucinta das fases do desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* na primeira hora de incubação, apresentando aspectos morfológicos dos embriões.

AMOSTRAGEM	T (°C)/ DA ÁGUA	FASES DO DESENVOLVIMENTO	FIGURA
1 (Zero e 20 minutos)	26°C	Ovo recém fertilizado Fase inicial da reprodução no momento da fertilização, denominado de ponto zero da coleta de embriões.	
2 (30 minutos)	26°C	2 blastômeros Ocorrência da primeira clivagem do embrião que iniciou-se entre 20 e 30 minutos a partir do ponto zero, quando surgiram os primeiros embriões com dois blastômeros.	

3 (40 minutos)	26°C	4 blastômeros Clivagens do embrião com 4 blastômeros se desenvolvendo após 40 minutos do ponto da fertilização	
4 (50 minutos)	26°C	8, 14 e 16 blastômeros Após 50 minutos de desenvolvimento do embrião à partir do ponto zero, foram observados embriões com 8, 14 e 16 blastômeros	
5 (60 minutos)	26°C	32 blastômeros - Blástula Estádio de blástula com aproximadamente 32 blastômeros, fase registrada com 60 minutos de desenvolvimento embrionário à partir da fertilização dos óvulos.	

Tabela 11. Caracterização do desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* após a primeira hora de incubação dos embriões.

AMOSTRAGEM	T (°C) DA ÁGUA	FASES DO DESENVOLVIMENTO	FIGURA
6 (2 horas)	26°C	Gástrula inicial com 25% de epibolia	
7 (3 horas)	26°C	Gástrula com 50% de epibolia	
8 (4 horas)	26°C	Gástrula com 75% de epibolia	

9 (5 horas)	26°C	Gástrula tardia com 90% de epibolia (Organogênese inicial)	
10 (6 horas)	25°C	Organogênese inicial	
11 (7 horas)	25°C	Organogênese inicial	

Tabela 11. Continuação ...

12 (8 horas)	25°C	Organogênese final, 24 pares de somitos	
13 (9 horas)	25°C	Larva em crescimento, intestino posterior e cauda	

14 (10 horas)	25°C	Larva em crescimento, intestino posterior e cauda	
15 (11 horas)	25°C	Larva recém eclodida	

Os dados constantes das Tabelas 10 e 11 resumem as fases do desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae*, com base na descrição do desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus*, realizada por NINHAUS-SILVEIRA (2004). Na Tabela 10, a amostragem representa os produtos da fase final da reprodução, que se inicia no momento da fertilização dos ovócitos, denominado ponto zero. As células isoladas (zigotos) apresentam-se normalmente isoladas e arredondadas devido à hidratação. Entre esta fase e a seguinte, exposta na amostragem 2, procedem os eventos principais do desenvolvimento embrionário para a aplicação das técnicas de manipulação cromossômica. Neste período ocorrem os processos que culminam com a primeira clivagem celular do embrião, iniciada num período entre 15 e 25 minutos após a fertilização. Este evento determina o aparecimento de embriões com dois blastômeros, que são identificados nesta fase. Na amostra 3 são encontrados embriões com 4 blastômeros, que aparecem cerca de 40 minutos após a o ponto zero. A continuidade das clivagens leva ao aparecimento de embriões com 8 e 16 blastômeros, no período decorrido de tempo de cerca de 50 minutos. Os embriões atingem o estágio de blástula quando

apresentam cerca de 32 blastômeros, o que ocorre no período 5 após 60 minutos da fertilização.

Após a primeira hora do desenvolvimento embrionário, as amostras passaram a ser coletadas em intervalos de 1 hora, tendo em vista que se iniciam no embrião também modificações internas expressivas; as modificações observadas externamente ocorrem de modo mais lento. As amostras coletadas a partir deste ponto foram analisadas e as informações obtidas estão relacionadas na Tabela 11. Na amostra 6, coletada cerca de 2 horas após o ponto de fertilização, podem ser observados embriões na fase inicial do processo de gastrulação, que se apresentam com 25% de epibolia. O processo de desenvolvimento prossegue, sendo possível observar nos embriões da amostra 7, coletados após 3 horas da fertilização, os embriões na fase da característica de gástrula, com 50% de epibolia, enquanto que na amostra 8, com os embriões continuando a finalização do processo de gastrulação, a epibolia atinge valores de cerca de 75 %. Nas amostras 9, 10 e 11 pode-se verificar embriões ainda em processo de gastrulação, alguns com 90% de epibolia, ao lado de outros em fase de organogênese inicial. A amostra 12, coletada 8 horas após o ponto zero ilustra a ocorrência da organogênese final já com a presença de somitos nos embriões. Nas amostras 13 e 14 têm início as fases finais do desenvolvimento, com a larva em crescimento e mostrando a formação do intestino posterior e da cauda. Finalmente, na amostra 15 da Tabela 11, foram encontrados embriões na fase final do desenvolvimento e larvas recém eclodidas, que iniciaram sua movimentação na coluna d'água da incubadora.

3.3 Testes de Poliploidia

O uso da poliploidia em peixes é uma técnica de manipulação cromossômica que pode ser aplicada em piscicultura e já foi relatada por vários autores como TAVE (1993), THORGAARD (1983), RANZANI-PAIVA (1998), HUERGO (2004), PORTO-FORESTI & FORESTI (2004), entre outros. Porém, os indivíduos triplóides e tetraplóides frequentemente não apresentam condições para garantir sua viabilidade, do modo como ocorre com os indivíduos diplóides normais. As transformações genômicas e estruturais afetam a sobrevivência de embriões e larvas, provavelmente devido ao efeito letal dos choques utilizados nas técnicas de manipulação cromossômica (MOREIRA, 2001) ou ao acúmulo de genes recessivos, prejudiciais ao desenvolvimento. Tratamentos com choques de temperatura e pressão hidrostática foram utilizados na tentativa de formalizar protocolos para a obtenção de indivíduos triplóides e tetraplóides de *Astyanax altiparanae*.

A baixa sobrevivência observada após a fase de larva e de alevino no lambari e as baixas frequências de peixes triplóides e tetraplóides obtidas nos tratamentos realizados dentro das condições estabelecidas no presente trabalho indicam que, para esta espécie, outros protocolos precisam ser testados para viabilizar a aplicação das técnicas de manipulação cromossômicas, principalmente aquelas relacionadas à obtenção de indivíduos poliplóides. A seguir, são apresentados os resultados obtidos nos testes realizados, que constaram de tratamentos com choques de temperatura e pressão hidrostática aplicados aos embriões do lambari, na tentativa de induzir poliploidia.

3.3.1 Choques de Temperatura

Os tratamentos para indução de triploidia realizados com base nos protocolos descritos na Tabela 4, resultaram em taxas de sobrevivência variáveis dos embriões que deram origem as larvas. Estas, após o período de alimentação endógena, foram transferidas para 4 tanques de alvenaria de 3 m² de área e foram alimentadas com plâncton cultivado em viveiros e ração balanceada com 55% de proteína bruta (PB). No tratamento 1 (TRI 1) foram obtidos 83 juvenis após um período de 60 dias da realização da reprodução e do choque de temperatura e no tratamento 2 (TRI 2) a sobrevivência foi baixa apresentando apenas 14 juvenis. Foram analisados 32 indivíduos dos tratamentos 1 e 10 indivíduos do tratamento 2, submetidos a um choque de temperatura de 38°C, 2 minutos para o TRI 1 e 5 minutos para TRI 2, após a fecundação durante 3 minutos de exposição.

Para identificação do grau de ploidia dos indivíduos e saber determinar a eficácia dos tratamentos indutores, inicialmente foram realizadas análises dos indivíduos do grupo controle. Neste tratamento foram disponibilizados cerca de 800 indivíduos, que sobreviveram até a fase juvenil

(Tabela 12), quando as análises foram realizadas. Destes, 20 foram analisados citogeneticamente para determinação do número de cromossomos de cada indivíduo.

As preparações cromossômicas resultaram em metáfases de boa qualidade, a partir das quais foram realizadas as contagens e montados os cariótipos, conforme representado na Figura 22. Todos os indivíduos apresentaram número diplóide de $2n=50$ cromossomos, como seria esperado.

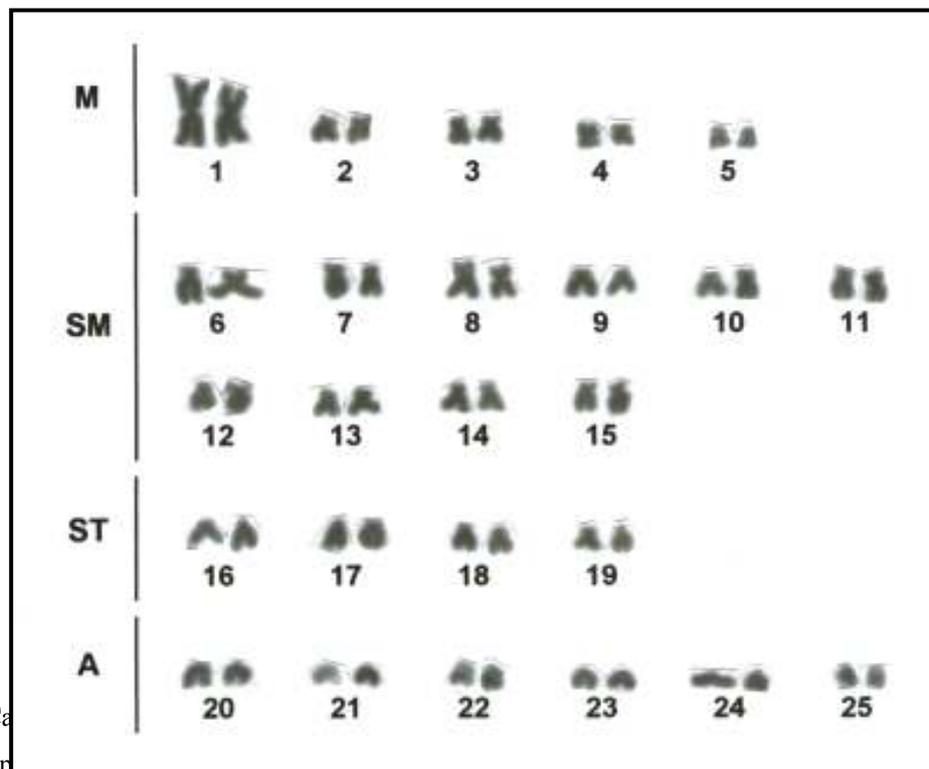


Figura 22. Cariótipo de controle dos testes de poliploidia.

Foram então realizadas as análises citogenéticas de 32 indivíduos obtidos nos tratamentos 1 e 2 (TRI 1 e TRI 2), conforme apresentado na Tabela 5. Os resultados obtidos mostraram que entre os indivíduos analisados, apenas três foram identificados como triploides, apresentando metáfases mitóticas com três lotes cromossômicos da espécie (Figura 23). Nos tratamentos 3 e 4 (TRI 3 e TRI 4) a sobrevivência foi muito baixa, resultando em apenas 5 indivíduos, todos na parcela referente ao tratamento TRI 3 e nenhum no tratamento TRI 4. As análises citogenéticas realizadas nos 5 indivíduos obtidos no tratamento TRI 3, todos foram identificados como triploides e apresentaram metáfases semelhantes àquelas já relacionadas na Figura 23.

A obtenção dos cromossomos dos peixes para análise é realizada através de metodologia relativamente simples e de baixo custo, que permite uma rápida caracterização das espécies (PORTO-FORESTI & FORESTI, 2004). Usualmente as espécies apresentam pares de cromossomos (e assim são chamados de diplóides ou com $2n$ cromossomos) que são divididos igualmente na formação dos gametas que recebem cada um, metade do número de cromossomos dos pais (um conjunto haplóide de cromossomos ou n cromossomos). Através de uma análise inicial, pode-se

identificar diferentes espécies (com diferentes números de cromossomos, por exemplo), bem como caracterizar o aparecimento de indivíduos triplóides (3n cromossomos) e tetraplóides (4n cromossomos) (PORTO-FORESTI & FORESTI, 2004). Este procedimento foi utilizado no presente trabalho e mostrou ser muito eficaz no diagnóstico.

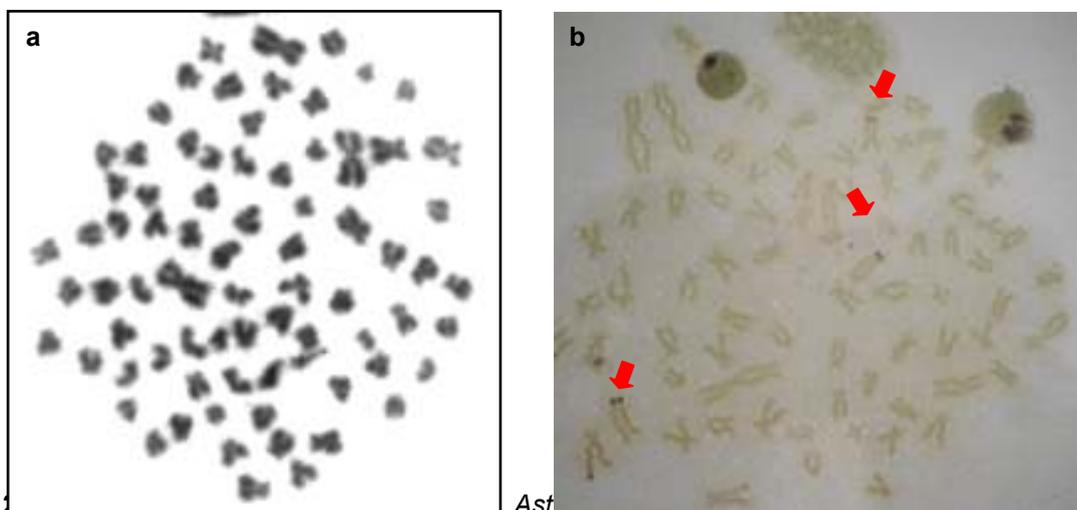


Figura 1. Kariótipo de *Astyanax altiparanae* de cromossomos da espécie (3n=75 cromossomos) (a). Em b, aplicando a técnica de identificação da NOR, 3 cromossomos se apresentam marcados.

Nos tratamentos TRI 5 e TRI 6 realizados com choques de baixa temperatura, conforme protocolo descrito na Tabela 5, a sobrevivência obtida entre os indivíduos submetidos aos tratamentos foi maior do que nos choques de alta temperatura (Tabela 12). Desses tratamentos, sobreviveram aproximadamente 500 indivíduos no TRI 5 e 600 indivíduos no TRI 6. As análises citogenéticas realizadas em 50 indivíduos destes tratamentos não revelaram a ocorrência de indivíduos triplóides em nenhum dos tratamentos (TRI 5 e TRI 6).

Os resultados obtidos nos testes de indução de triploidia por choques térmicos e relacionados na Tabela 12 parecem indicar maiores possibilidades de sucesso com o uso de choques de altas temperaturas. Tratamentos realizados com a temperatura de 38°C resultaram na indução de indivíduos triplóides viáveis, embora em baixa frequência (9,4%). Os choques frios aplicados aparentemente não foram suficientes para determinar a retenção dos cromossomos.

Tabela 12. Testes de indução de triploidia em *Astyanax altiparanae*, com aplicação de choques de temperatura em diferentes tempos de exposição. São apresentados os dados de sobrevivência na fase juvenil e a frequência de indivíduos triplóides.

TRATAMENTO	TEMPERATURA DO CHOQUE	INÍCIO DO CHOQUE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	SOBREVIVÊNCIA NA FASE DE JUVENIL	% TRIPLÓIDES
------------	-----------------------	------------------	--------------------	----------------------------------	--------------

TRI 1	38°C	2' após fecundação	3 minutos	83	9,4%
TRI 2	38°C	5' após fecundação	3 minutos	14	0%
TRI 3	40°C	2' após fecundação	3 minutos	5	100%
TRI 4	40°C	5' após fecundação	3 minutos	0	0%
TRI 5	6°C	2' após fecundação	30 minutos	*500	0%
TRI 6	6°C	5' após fecundação	30 minutos	*800	0%
CONTROLE	Temperatura ambiente	Sem choque	Não realizado	3.600 indivíduos	0%

* Os peixes foram estimados utilizando-se uma peneira como medida da para contar os indivíduos que sobreviveram nos tratamentos realizados.

Devido à necessidade de grande número de tanques para estocagem dos peixes de todos os tratamentos, os indivíduos do controle foram colocados em tanques de terra de 200 m² e a sobrevivência foi estimada com base no desempenho de produção da piscicultura (entre 60 a 70% de sobrevivência, na fase juvenil).

A indução de poliploidia frequentemente está associada à ocorrência de altas taxas de mortalidade, conforme foi observado nos testes de triploidia realizados. Isto pode ser ter como causa o desenvolvimento anormal determinado pela adição de um novo conjunto cromossômico ao genoma diplóide, que poderia resultar em desbalanços da atividade gênica nas células ou ainda devido ao efeito latente da ação do choque térmico (RIGOLINO, 2003). Pode ser considerado também que fatores como o grau de “inbreeding”, que seria potencializado com a retenção do segundo corpúsculo polar, poderiam determinar um aumento da frequência de genes recessivos e determinar a inviabilidade dos embriões. Além disso, a intensidade dos choques de temperatura e a duração dos tratamentos aplicados, a ocorrência de deformações nos alevinos e o menor crescimento quando comparados aos indivíduos do grupo controle (diplóides), poderiam se constituir em fatores determinantes para a obtenção de resultados positivos nos testes de triploidia, conforme comentado por KERBY (2002) e RIGOLINO (2003), entre outros.

Os tratamentos realizados com o objetivo de obtenção de indivíduos tetraplóides e realizados de acordo com os protocolos apresentados na Tabela 5, apresentaram taxas de sobrevivência variáveis dos embriões, como ocorrido nos tratamentos para obtenção de triplóides. As larvas que sobreviveram aos tratamentos de indução de tetraploidia foram transferidas para 4 tanques de alvenaria de 3 m² de área após o período de alimentação endógena e foram alimentadas com plâncton cultivado em viveiros e ração balanceada com 55% de proteína bruta, seguindo o mesmo protocolo aplicado nos testes de triploidia.

Os tratamentos 1 e 2 (TETRA 1 e TETRA 2), nos quais os embriões foram submetidos a choque térmico de 36°C, cerca de 20 minutos decorridos após a fertilização, por períodos de 1 e 5 minutos de duração, resultaram em cerca de 700 indivíduos que se desenvolveram até a fase juvenil (Tabela 13), caracterizada 60 dias após a realização da reprodução e aplicação do choque de temperatura. A análise citogenética realizada em 40 indivíduos desses tratamentos, não caracterizou a ocorrência de indivíduos tetraplóides (com 4n=100 cromossomos). Para os tratamentos 5 e 6 (TETRA 5 e TETRA 6), nos quais os embriões foram submetidos a choque térmico de 6°C, cerca de 20 minutos decorridos após a fertilização, por períodos de 60 minutos de duração, a sobrevivência foi de aproximadamente 1.200 juvenis

(Tabela 13). Pela análise citogenética realizada em 50 indivíduos não foi caracterizada a ocorrência de indivíduos tetraplóides, sendo todos diplóides normais, com 50 cromossomos. Os tratamentos TETRA 3 e TETRA 4, considerados letais em testes realizados previamente à aplicação do protocolo final utilizado no experimento, não foram relacionados.

Os resultados obtidos parecem demonstrar que a técnica aplicada não foi eficiente na indução de tetraploidia em nenhum dos tratamentos realizados. Contudo, as altas taxas de sobrevivência observadas até a fase juvenil parecem indicar que o fato dos tratamentos não terem atingido os limites da letalidade, podem oferecer condições para a viabilidade de aplicação da metodologia escolhida, com o aperfeiçoamento dos protocolos.

Indivíduos tetraplóides têm sido com o uso de diferentes protocolos, utilizando tanto a aplicação de choques de altas quanto baixas temperaturas em diversas espécies (CHOURROUT, 1984; CHOURROUT *et al.*, 1986; TABATA, 2004). Tais tratamentos são bem sucedidos se o momento de aplicação do agente bloqueador da divisão celular seja preciso, que a temperatura seja suficiente para impedir a segregação dos lotes cromossômicos no processo de divisão celular em andamento e que este tenha duração no tempo suficiente para manter as condições estabelecidas até que a célula, agora com novos conjuntos cromossômicos, possa retomar seu caminho normal de divisão. Se alguma destas condições não for atingida, o processo pode resultar na inviabilidade do embrião. Os resultados obtidos nos testes de indução de tetraploidia em *Astyanax altiparanae* dão indicações de que novas tentativas devem ser feitas, uma vez que, as taxas de sobrevivência relativamente altas encontradas e a presença apenas de indivíduos diplóides normais autorizariam a experimentação com tratamentos mais radicais, com valores de temperatura mais altos e mais baixos que aqueles utilizados nos protocolos apresentados. Também o momento de aplicação dos tratamentos deve ser revisto, com início dos choques térmicos em tempos menores que 18 minutos após a fertilização.

Choques térmicos quentes ou frios podem ser efetivos quando empregados na temperatura além do limite tolerado pela espécie. Choques com intensidades entre 8 e 11°C para peixes de águas quentes como *Cyprinus carpio* e *Tilapia áurea* e tratamentos entre 26 e 28°C para peixes de águas frias como salmonídeos, foram efetivos na sobrevivência dos embriões, conforme citado por RIGOLINO (2003) e TABATA, (2004). Obtenção de indivíduos tetraplóides tem sido mais comum em experimentos com espécies de salmonídeos (CHOURROUT, 1984; CHOURROUT *et al.*, 1986).

Tabela 13. Testes de indução de tetraploidia em *Astyanax altiparanae*, com aplicação de choques de temperatura em diferentes tempos de exposição. São apresentados os dados de sobrevivência na fase juvenil e a frequência de indivíduos triploides.

TRATAMENTO	TEMPERATURA DO CHOQUE	INÍCIO DO CHOQUE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	SOBREVIVÊNCIA NA FASE DE JUVENIL	% TETRAPLÓIDES
TETRA 1	36°C	20' após fecundação	1 minuto	*400	0%
TETRA 2	36°C	20' após fecundação	5 minutos	*300	0%
TETRA 5	6°C	20' após fecundação	60 minutos	*600	0%
TETRA 6	6°C	20' após fecundação	60 minutos	*600	0%
CONTROLE	Temperatura ambiente	Sem choque	Não realizado	**5.000	0%

* Os peixes foram estimados utilizando-se uma peneira como medida da para contar os indivíduos que sobreviveram nos tratamentos realizados.

** Devido à necessidade de número de tanques para estocagem dos peixes de cada tratamento, os indivíduos do controle foram colocados em tanques de terra de 200 m² e a sobrevivência foi estimada com base no desempenho de produção da piscicultura (entre 60 a 70% de sobrevivência na fase juvenil).

3.3.2 Choques de Pressão Hidrostática

Utilizando choques de pressão para obtenção de indivíduos triploides, observou-se que as taxas de sobrevivência se mostraram muito baixas nas fases de alevino e juvenil. As larvas obtidas após o período de alimentação endógena, foram transferidas para tanques de alvenaria de 1 m² de área e foram alimentadas com plâncton cultivado em viveiros e ração balanceada com 55% de proteína bruta. Foram realizados testes prévios para observação do nível de letalidade dos valores de pressão hidrostática expressos em psi aplicados nos embriões de lambari. Acima de 5000psi, observou-se que para a espécie *Astyanax altiparanae* o nível de letalidade dos embriões foi de 100% nos tratamentos realizados neste trabalho. A partir da realização de protocolos preliminares, foram estabelecidos os tratamentos com pressão hidrostática que foram utilizados.

Os tratamentos 1 (TRI 1), 2 (TRI 2), 3 (TRI 3), 4 (TRI 4), 5 (TRI 5) e 6 (TRI 6), foram realizados no mesmo período e os juvenis caracterizados após um período de 45 dias da realização da reprodução e do choque de pressão hidrostática. Conforme demonstrado na Tabela 14, no tratamento 1 (TRI 1) a sobrevivência foi de 5 indivíduos juvenis, no tratamento 2 (TRI 2) a sobrevivência foi de 20 indivíduos juvenis; no tratamento 3 (TRI 3) foi de 9 indivíduos juvenis; no tratamento 4 (TRI 4) foi de 15 indivíduos juvenis; no tratamento 5 (TRI 5) foi de 5 indivíduos juvenis e no tratamento 6 (TRI 6) foi de 9 indivíduos juvenis. O tratamento TRI 7, considerado letal em testes realizados previamente à aplicação do protocolo final utilizado no experimento, não foi relacionado.

Todos os indivíduos obtidos nos testes de indução de triploidia em *Astyanax altiparanae* por choques de pressão hidrostática foram submetidos à análise citogenética, para verificação do número de cromossomos de cada indivíduo. Todos se mostraram diplóides, com 50 cromossomos, não sendo caracterizados indivíduos triploides nestes experimentos. Os dados obtidos permitem supor que os

tratamentos utilizados, de acordo com os protocolos estabelecidos para aplicação nas condições do presente trabalho, não resultaram na indução de triploidia (Tabela 14).

Tabela 14. Testes de indução de triploidia utilizados para *Astyanax altiparanae*, com aplicação de choques de pressão hidrostática. São considerados o momento de início do choque, os diferentes tempos de exposição dos embriões, a sobrevivência na fase juvenil e a freqüência de indivíduos triplóides.

TRATAMENTO	INTENSIDADE DE PRESSÃO (PSI)	INÍCIO DO CHOQUE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	SOBREVIVÊNCIA NA FASE DE JUVENIL	% TRIPLÓIDES
TRI 1	3.000	2' após fecundação	5' minutos	5	0%
TRI 2	4.000	2' após fecundação	2' minutos	20	0%
TRI 3	4.000	2' após fecundação	5' minutos	9	0%
TRI 4	4.000	5' após fecundação	2' minutos	15	0%
TRI 5	4.000	5' após fecundação	5' minutos	5	0%
TRI 6	4.000	8' após fecundação	5' minutos	9	0%
CONTROLE	Sem choque	Não realizado	Não realizado	* 3.000	0%

* Devido à necessidade de número de tanques para estocagem dos peixes de cada tratamento, os indivíduos do controle foram colocados em tanques de terra de 200 m² e a sobrevivência foi estimada com base no desempenho de produção da piscicultura (entre 60 a 70% de sobrevivência na fase juvenil).

A produção de triplóides em peixes depende de vários fatores como a intensidade do choque, o tempo de duração e exposição dos ovos ao choque, bem como da qualidade dos ovos utilizados (HUERGO, 2004). Em trabalhos realizados com *Rhandia quelen*, submetidos aos testes de indução de triploidia, os tratamentos com choques térmicos resultaram em sobrevivência menor quando comparados aos mesmos testes com utilização de choques de pressão hidrostática (HUERGO, 2004).

Peixes tetraplóides possuem quatro conjuntos de cromossomos e podem ser obtidos por meio de choques aplicados no embrião antes da primeira clivagem e da formação dos primeiros blastômeros (MOREIRA, 2001; PORTO-FORESTI & FORESTI, 2004).

Como resultado da utilização de choques de pressão para obtenção de indivíduos tetraplóides, foi observado que as taxas de sobrevivência se mostraram muito baixas nas fases de alevino e juvenil, do mesmo modo como foi observado nos tratamentos para obtenção de indivíduos triplóides. As larvas obtidas foram transferidas para tanques de alvenaria de 1 m² de área, após o período de alimentação endógena e foram alimentadas com plâncton cultivado em viveiros e ração balanceada com 55% de proteína bruta. Testes prévios realizados para observação dos níveis de letalidade decorrentes dos valores de pressão hidrostática expressos em psi aplicados nos embriões de *Astyanax altiparanae*, revelaram que acima de 5000psi o nível de letalidade dos embriões foi de 100% neste trabalho. A partir das informações obtidas com a realização de protocolos preliminares, foram estabelecidos os tratamentos com pressão hidrostática que foram utilizados.

Os tratamentos 1 (TETRA 1), 2 (TETRA 2), 3 (TETRA 3), 4 (TETRA 4), foram realizados no mesmo período e os juvenis caracterizados após 45 dias da realização da reprodução e do choque de pressão hidrostática. No tratamento 1 (TETRA 1) a sobrevivência foi de 4 indivíduos juvenis; no tratamento 2 (TETRA 2) foi de 16 indivíduos; no tratamento 3 (TETRA 3) foi de 4 indivíduos e no tratamento 4 (TETRA 4) foi de 10 indivíduos. Todos os indivíduos sobreviventes dos testes de indução de tetraploidia com o uso de choques de pressão hidrostática foram submetidos à análise citogenética, para verificação do número de cromossomos. Todos apresentaram número diplóide de 2n=50 cromossomos sendo, portanto, considerados diplóides normais; indivíduos tetraplóides não foram caracterizados nos tratamentos realizados. Portanto, os resultados obtidos com os diferentes tratamentos demonstram que estes não foram efetivos para a indução de tetraploidia nas condições utilizadas no presente trabalho (Tabela 14). Os resultados obtidos e demonstrados acima apresentaram frequência muito baixa de sobrevivência sem ocorrência de indivíduos tetraplóides (Tabela 15). Os tratamentos TETRA 5, TETRA 6 e TETRA 7 (Tabela 7), considerados letais em testes realizados previamente à aplicação dos protocolos do experimento, não foram relacionados.

Tabela 15. Testes de indução de tetraploidia utilizados para *Astyanax altiparanae*, com aplicação de choques de pressão hidrostática. São considerados o momento de início do choque, os diferentes

tempos de exposição dos embriões, a sobrevivência na fase juvenil e a frequência de indivíduos triploides.

TRATAMENTO	INTENSIDADE DE PRESSÃO (PSI)	INÍCIO DO CHOQUE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	SOBREVIVÊNCIA NA FASE JUVENIL	% TETRAPLÓIDES
TETRA 1	3.000	20' após fecundação	5' minutos	4	0%
TETRA 2	4.000	20' após fecundação	2' minutos	16	0%
TETRA 3	4.000	20' após fecundação	5' minutos	4	0%
TETRA 4	4.000	20' após fecundação	2' minutos	10	0%
CONTROLE	sem choque	Não realizado	Não realizado	*3.000	0%

* Devido à necessidade de número de tanques para estocagem dos peixes de cada tratamento, os indivíduos do controle foram colocados em tanques de terra de 200 m² e a sobrevivência foi estimada com base no desempenho de produção da piscicultura (entre 60 a 70% de sobrevivência na fase juvenil).

A intensidade de pressão hidrostática de 5000psi mostrou-se letal para os embriões de *Astyanax altiparanae* nos testes prévios realizados para os diferentes tempos de exposição escolhidos, enquanto os tratamentos com choques de intensidade de 3000 e 4000psi apresentaram baixa viabilidade, com taxas reduzidas de sobrevivência de indivíduos que chegaram à fase juvenil. Contudo, alguns autores utilizaram, em diferentes espécies, choques de pressão hidrostática com valores entre 7000 e 11000psi, conforme descrito por CASSANI & CATON (1986) e tempo maior de exposição que o determinado nos protocolos formulados para este trabalho, que foi entre 2 e 5 minutos de duração. Ressalta-se que, concordando com a afirmação de HUERGO (2004), vários processos fisiológicos que ocorrem em ovos recém fertilizados não são totalmente conhecidos, sendo determinados por reações desencadeadas entre a fertilização e a primeira clivagem. Estes poderiam desencadear efeitos diversos e levar à imprecisão o resultado dos choques aplicados nos tratamentos de indução da tetraploidia. A obtenção de indivíduos tetraploides tem sido obtida de modo mais freqüente em experimentos com espécies de salmonídeos do que com espécies de águas quentes (CHOURROUT, 1984 e CHOURROUT *et al.*, 1986)

Os estudos desenvolvidos nesse trabalho, envolvendo metodologias de cultivo e os testes de aplicação de técnicas de biomanipulação certamente poderão abrir novos caminhos para otimizar o cultivo não só desta espécie de *Astyanax*, mas de um modo geral, de outras espécies de interesse para a piscicultura, contribuindo para a ampliação dos conhecimentos e sua utilização de modo adequado por parte dos criadores de peixes no Brasil.

Espera-se, por fim, que as informações geradas com a experimentação desenvolvida neste trabalho possam resultar em subsídios para a formulação de novos projetos, envolvendo o desenvolvimento e a padronização das técnicas genéticas em piscicultura, promovendo com isso a aplicação do conhecimento genético em conservação e ao mesmo tempo promovendo a divulgação e a aplicação da biotecnologia para o cultivo de peixes.

CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

No presente trabalho utilizou-se a espécie de peixe *Astyanax altiparanae*, conhecida popularmente como lambari-do-rabo-amarelo, para a aplicação de metodologias de reprodução induzida, visando sedimentar conhecimentos que permitissem a realização de testes com técnicas de manipulação cromossômica. A formulação de protocolos viáveis de indução de poliploidia em indivíduos desta espécie poderia resultar em modelos de aplicação para programas de piscicultura com outras espécies de ocorrência na região tropical. Os resultados obtidos permitiram formular as seguintes conclusões:

- A utilização do processo de reprodução induzida denominado “desova livre”, permitiu a obtenção de boas taxas de eclosão e obtenção de larvas desta espécie. Esta metodologia apresentou-se como uma opção de fácil aplicação, indicando que o protocolo atual, que já vem sendo utilizado pelos piscicultores, poderia ser aperfeiçoado e potencializando, maximizando os resultados. Sua aplicação mostrou-se mais efetiva durante os períodos mais quentes do ano, que correspondem aos meses de novembro, dezembro e janeiro na região. Foi verificado que as melhores taxas de produção de larvas para esta espécie, quando aplicado este processo de reprodução, correspondem a uma razão sexual com proporção maior de indivíduos machos para cada fêmea (3:1 ou 4:1). O sucesso com o uso de maior número de machos em relação ao de fêmeas poderia, assim, estar relacionado simplesmente à disponibilização de esperma para a fertilização nesta espécie.

- No processo de reprodução induzida envolvendo a extrusão dos gametas, observou-se que sua utilização possibilita a manipulação direta dos gametas e o controle do processo de fertilização. Tais particularidades podem dar oportunidade para a formulação de protocolos de manipulação dos cromossomos nos embriões, viabilizando a aplicação de metodologias biotecnológicas na piscicultura.

- O estudo do desenvolvimento embrionário do lambari *Astyanax altiparanae* foi realizado com a finalidade de caracterizar as fases do processo, principalmente as fases iniciais, para possibilitar a aplicação das técnicas de indução de poliploidia. Foi observado que a primeira clivagem do embrião do lambari ocorreu entre 20 e 30 minutos a partir da fertilização do ovócito (tempo zero). Além disso, observou-se que o período médio de incubação dos embriões até a eclosão das larvas foi de aproximadamente 11 horas, mesmo em diferentes condições ambientais.

- Nos testes de indução de triploidia e de tetraploidia realizados em *Astyanax altiparanae* foram observados altos índices de letalidade, tanto nos tratamentos com choques de temperatura quanto naqueles em que a pressão hidrostática foi usada como agente indutor. Os resultados indicam que os protocolos utilizados não foram efetivos, dentro das condições estabelecidas nos experimentos, para viabilizar a produção de indivíduos poliplóides em escala de utilização em programas de piscicultura.

- Embora tenham resultado em altas taxas de mortalidade dos embriões, os tratamentos visando a indução de triploidia resultaram em indivíduos que sobreviveram até a fase de juvenil, quando foram caracterizados citogeneticamente. Os choques com altas temperaturas resultaram em indivíduos triplóides, ainda que em baixa frequência. Os tratamentos de indução com a aplicação de pressão hidrostática não resultaram em indivíduos triplóides.

- Os choques térmicos ou de pressão hidrostática aplicados nos embriões desta espécie para indução de tetraploidia, não resultaram em indivíduos tetraplóides, embora as taxas de sobrevivência observadas nos tratamentos tenham sido altas, comparadas aos testes de triploidia. A análise citogenética realizada em indivíduos amostrados em estágio juvenil revelou a presença apenas de diplóides. Considera-se que a modificação dos protocolos, com a aplicação de tratamentos mais radicais, tanto de variação da temperatura quanto da intensidade dos tratamentos de pressão, além da verificação mais específica do momento de aplicação dos agentes, poderiam determinar o incremento das frequências de embriões poliplóides.

- Os testes citogenéticos realizados mostraram-se efetivos para a identificação dos níveis de ploidia dos indivíduos resultantes dos tratamentos utilizados no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, C.A.; MOLINARI, S.L.; AGOSTINHO, A.A.; VERANI, J.R. (1984). Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L) (Osteichthyes-Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. *Revista Brasileira de Biologia*, v.44, p. 31-16.
- AGOSTINHO, A.A. (1992). Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. In: Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil. Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia, 127p.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO Jr., H.F. (1996). Ameaça ecológica: Peixes de outras águas. *Ciência Hoje*, v.21, n. 124, p. 36-44.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO Jr., H.F. (1999). Peixes da bacia do alto Paraná. In: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Trad.: Vazzoler, A.E.A.M.; Agostinho, A.A.; Cunningham, P.T.M. São Paulo: EDUSP, p. 374-399.
- ALMEIDA-TOLEDO L.F. (1997). Contribuição à citogenética de peixes neotropicais. São Paulo: Instituto de Biociências de São Paulo, USP, 84 p. Tese de Livre-Docência - Instituto de Biociências de São Paulo. Universidade de São Paulo.
- BONETTO, A.A. (1994). Austral rivers of South America. In Margalef, R. (ed.): *Limnology Now: a paradigm of planetary problems*.
- BORGHETTI, J.R. & OSTRENSKY, A. (2002). Problemas e Perspectivas para a Pesca e para a Aqüicultura Continental no Brasil. In: *Águas Doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. São Paulo: Escrituras Editora, 2.ed.
- BRANDINI, F.P.; SILVA, A.S.; PROENÇA, L.A.O. (2000). Oceanografia e Maricultura. In: *Aqüicultura no Brasil*. Brasília: CNPq/ Ministério da Ciência e Tecnologia.

- BRITSK, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B.S. (1984). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para peixes da bacia do São Francisco). Câmara dos Deputados, Brasília, 143p.
- BRITSKI, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, p.79-108.
- BUCKUP, P.A. (1998). Relationships of the characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi). In: Phylogeny and classification of Neotropical fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, p, 123-144.
- CASSANI, J.R. & CATON,W.E. (1986). Growth comparisons of diploid and triploid grass carp under varying conditions. Prog. Fish-Cult. V. 48, 184-18.
- CASTAGNOLLI, N. (1996). Aqüicultura para o ano 2000. CNPq, Brasília, 95 p.
- CASTAGNOLLI, N. (2000). Piscicultura Intensiva e Sustentável. In: Aqüicultura no Brasil. Brasília: CNPq/ Ministério da Ciência e Tecnologia.
- CASTILHO-ALMEIDA, R.B. (1999). Proporção de sexos e análise estrutural das gônadas de *Synbranchus marmoratus* (Pisces, Synbranchiformes).Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 91p.
- CHAVES, P.T.C. (1991). Testículos: estrutura e dinâmica de maturação. In Histologia de Peixes. Semana sobre histologia de peixes da F.C.A.V.J.-UNESP, Jaboticabal, 83p.
- CHOURROUT, D. (1984). Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. Aquaculture, v. 36, 111-126.

- CHOURROUT, D.; CHEVASSUS, B.; KRIEG, F.; HAPPE, A.; BURGER, G.; RENARD, P.(1986). Production os second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females. Potencial of tetraploid fish. Theor. Appl. Genet. v. 72, 193-1986.
- DAVID, G.S.; CARVALHO, E.D.; NOVAES, J.L.C.; BIONDI, G.F. (2006). A tilápia do rio Tietê- Desafios e contradições da pesca artesanal de tilápias nos reservatórios hipereutróficos do médio rio Tietê. Revista Panorama da Aqüicultura, v.16, nº 97.
- EIGENMANN, C.H. (1921). The American Characidae. Mem. Mus. Comp. Zool., v. 43, p 227-310.
- EIGENMANN, C.H. (1927). The American Characidae. Mem. Mus. Comp. Zool., v. 43, p 311-30.
- ELVIRA, B.; ALMODÓVAR, A. (2001). Freshwater fish introduction in Spain: Facts and figures in the beginning of the 21 century. Journal Fish Biology., v. 59, p. 323-331.
- FAO -United Nations Food and Agriculture Organization (1998). Aquaculture Production Statistics. Roma, FAO Fisheries Circular. 815: Revision 10, 197p.
- FAO - United Nations Food and Agriculture Organization (1999). Aquaculture Production Statistics. Roma, FAO Fisheries Circular. 815: Revision 11, 203p.
- FAO - United Nations Food and Agriculture Organization (2004). Aquaculture Production Statistics.SOFIA.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO-FILHO, S.A. (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. Cytogenet Cell Genet., v. 31, p. 137-144.

- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, v. 49, p. 810-13.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; CARVALHO, E.D. (1994) Ploidy evaluation in the pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes): Techniques and comments. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 54, p. 31-37.
- FORYS, E.A.; ALLEN, C.R. (1999). Biological invasions and deletions: community change in south Florida. *Biological Conservation*, n. 87, p. 341-347.
- GABRIELLI, M.A.; ORSI, M.L. (2000) Dispersão de *Lernea cyprinacea* (Linnaeus) (Crustacea, Copepoda) na região norte do estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia.*, v.17, n.2, p. 395-399.
- GARCIA – BERTHOU. E. (2002). Ontogenetic diet shifts and interrupted piscivory in introduced largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Internat. Hydrobiol.*, v.87, p. 335-365.
- GARUTTI, V. (1988). Morfologia, Reprodução e Aspectos evolutivos de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do rio Paraná. Tese de Doutorado, IBUSP, 151p.
- GARUTTI, V. (1995). Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. São Jose do Rio Preto, Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, 286p.

- GARUTTI, V. & BRITSKI, H.A. (2000). Descrição de uma nova espécie de *Astianax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool. Porto Alegre*, v.13, p.65-88.
- HENKEM, A.M.; BRUNINK, A.M.; RICHTER, C.J.J. (1987). Differences in growth rate feed utilization between diploid and triploid african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel, 1882). *Aquaculture* v.63, 233-242.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014-1015.
- HUERGO, G.P.C.M. (2004). Indução à triploidia no jundiá (*Rhandia quelen*, QUOY & GAIMARD, 1824) através do choque de pressão hidrostática. Florianópolis: Univer. Feder.de Santa Catarina; Dissertação de Mestrado, 32p.
- IHERING, R. von; AZEVEDO, P. (1936). As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). *Arch. Inst. Biol.*, v.7, p 75-106.
- JOHNSON, H.M. (2003). Mercado americano de frutos do mar em 2020- provável benefício da forte demanda para a Aqüicultura. *Rev. ABCC*, v 5, n 4, 35-39.
- KARNOVSKY, M.I. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal Cell Biology*, v.27, p. 37-8 a.
- KERBY, J.H.; EVERSON, J.M.; HARRELL, M.R.; GEIGER, J.G.; STARLING, C.C.; REVELS, H. (2002). Performance comparisons between diploid and triploid sunshine bass in fresh water ponds. *Aquaculture*, v. 211, p. 91-108.
- LIMA-JÚNIOR, D.P.; LATINI,A.O. (2006). E se a aqüicultura se expandir no Brasil? *Revista Ciência Hoje*, v. 38, n 226, 67-71.
- LOWE-McCONNELL, R.H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: Edusp. 535p.

- LOZANO, R.; REJON, C.R. and REJON, M.R. (1988) A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain Technology*, v. 66, n. 6, p. 335-338.
- LUCENA, C.A.S. (1993). Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). São Paulo, Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 125p.
- MACHADO, C.E.M. (1975). Grandes barragens e meio ambiente; dois aspectos importantes. São Paulo, CESP, 50p.
- MARCHETTI, M.P. (1999). An experimental study of competition between the native Sacramento perch (*Archoplites interruptus*) and introduced bluegill (*Leporinus macrochirus*). *Biological Invasions*, v. 1, n. 1, p.55-65.
- MELO, S. (2004). Reaberto o mercado americano para o camarão brasileiro. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v. 14, n 86, 43-45.
- MOREIRA, H. E. (2001). Fundamentos da Moderna Aqüicultura. Canoas: Ed ULBRA, 200 p.
- NELSON, J.S. (1994). *Fishes of the World*. 3ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. (2004). Desenvolvimento embrionário e preservação criogênica do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 103p.
- NOMURA, H. (1975). Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. *Revista Brasileira de Biologia*, v35. n 4, p 775-98.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F; TOLEDO-FILHO, S.A. (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, v. 41, p. 227-236.
- PAIVA, R (1992). Lambari, de invasor a hóspede. *Revista Globo Rural*, v11, n 142, p. 49-53.
- PILLAY, T.V.R. (1992). *Aquaculture and the Environment*. Londres, Fishing News Books,189p.
- PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B. (2001). Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. *Panorama da Aqüicultura*, v.11, n. 67, p. 15-19.
- PORTO-FORESTI F.; FORESTI, F. (2004). Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (eds.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004, p. 195 a 215.

- PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; FORESTI, F. (2005). Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). IN: Espécies Nativas para Piscicultura no. Santa Maria: Ed UFMS, 468p.
- PRIMACK, R. B. & RODRIGUES, E. (2001) Biologia da Conservação. Londrina: MITTERMEIER, MYERS & MITTERMEIER, C. G. *Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX, S. A., 430p.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TABATA, Y.A.; EIRAS, A.C. (1998). Hematologia comparada entre diplóides e triplóides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces, Salmonidae). Revista Brasileira de Zoologia, v.15, n. 4, p 1093-1102.
- RIBEIRO, C.R.; SANTOS, H. S.; BOLZAN, A.A. (1995). Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (Pacu, *Piaractus mesopotamicus*; Tambaqui, *Colossoma macropomum* e Híbrido Tambacu). Revista Brasileira de Biologia, v. 55, p. 65-78.
- RIGOLINO, M.G. (2003). Utilização do padrão de pigmentação ocular em embriões como indicador de triploidia em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 59p.
- ROULE, L. (1914). *Traité Raisonné de la Pisciculture et des Pêches*. Paris, Livrarie J.- B. Bailliére et Fils, 734 p.
- SANTOS, G.B.; FORMAGIO, P.S. (2000) Estrutura da ictiofauna dos reservatórios do rio Grande, com ênfase no estabelecimento de peixes piscívoros exóticos. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.21, n. 203, p. 98-106.
- SANTOS, R.A.; CAMPOS, E.C.; CAMARA, J.J.C.; MANDELLI JÚNIOR, J. (1991). Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v.18, p 1-11.
- SATO, Y; SAMPAIO, E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. (2006). Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia v. 23, n 1, p. 267-273.
- SHEEHAN, R.J.; SHASTEEN, S.P.; SURESH, A.V.; KAPUSCINSKI, A.R.; SEEB, J.E. (1999). Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. V. 128, p491-498.
- SILVA, J.V; ANDRADE, D.V.; OKANO, W.Y. (1996). Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris – tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 submetidos a diferentes tipos de alimentação. Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.48, n.1, p 47-54.
- SORVIG, A. (2007). Aquicultura: uma alternativa necessária à demanda do mercado de pescados. Revista eletrônica The Wharton School, janeiro.
- TABATA (2004). Obtenção e desempenho de indivíduos ginogênicos meióticos e mitóticos de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 109p.
- TAVE, D. (1993). Genetics for fish hatchery managers. Van Nostrand Reinhold, New York, 2 ed., 415 p.
- TIWARY, B.K.; KIRUBAGARAN, R.; RAY, A.K. (2000) Gonadal development in triploid *heteropneustes fossilis*. Journal of Fish Biology, v. 57, p 1343-1348.
- THORGAARD, G.H. (1983) Chromosome set manipulation and sex control in fish. Fish Physiology, vol 9b, 31p.
- TOLEDO_FILHO, S.A.; ALMEIDA_TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. (1992). Cadernos de Ictiogenética. v.1, 39p.
- TOLEDO_FILHO, S.A.; FORESTI, F.; ALMEIDA_TOLEDO, L.F. (1996). Biotecnologia genética aplicada a piscicultura. São Paulo: Cadernos de Ictiogenética, v.3, 30p.
- TUNDISI, J.G.; SAIJO, Y. (1997). Limnological studies on the Rio Doce Valley Lakes, Brazil. Brazilian Academy of Sciences/University of São Paulo/School of Engineering at São Carlos. p.513.

- VALENTINI, H. (1972). Considerações sobre a pesca no estado de São Paulo. Biol. Inst. Pesca série de Divulgação, São Paulo, (1): p.1-28.
- VAZZOLER, A.E.A.M. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleosteos: Teoria e Prática. Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 169p.
- WEITZMAN, H.S. & MALABARBA, L.R. (1998). Perspectives about the phylogen and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: L.R. MALABARBA; R.E. REIS; R.P. VARI; Z.M.S. LUCENA; & C.A.S. LUCENA. (Eds.) Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- WOLTERS, W.R.; LIBEY, G.S.; CHRISMAN, C.L. (1982). Effect of triploid on growth and gonad developmet of channel catfish. Transactions of American Fisheries Society, v. 111, p10-105.
- WOYNAROVICH, E. (1986). Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos. Brasília, CODEVASF, 68p.
- WOYNAROVICH, E. (1991). The hydroelectric power plants and the fish fauna. Verh. Internat. Verein. Limnol., v. 24, p. 2531-2536.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, C.A.; MOLINARI, S.L.; AGOSTINHO, A.A.; VERANI, J.R. (1984). Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L) (Osteichthyes-Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. *Revista Brasileira de Biologia*, v.44, p. 31-16.
- AGOSTINHO, A.A. (1992). Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. In: Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil. Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia, 127p.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO Jr., H.F. (1996). Ameaça ecológica: Peixes de outras águas. *Ciência Hoje*, v.21, n. 124, p. 36-44.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO Jr., H.F. (1999). Peixes da bacia do alto Paraná. In: Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Trad.: Vazzoler, A.E.A.M.; Agostinho, A.A.; Cunningham, P.T.M. São Paulo: EDUSP, p. 374-399.
- ALMEIDA-TOLEDO L.F. (1997). Contribuição à citogenética de peixes neotropicais. São Paulo: Instituto de Biociências de São Paulo, USP, 84 p. Tese de Livre-Docência - Instituto de Biociências de São Paulo. Universidade de São Paulo.
- BONETTO, A.A. (1994). Austral rivers of South America. In Margalef, R. (ed.): *Limnology Now: a paradigm of planetary problems*.
- BORGHETTI, J.R. & OSTRENSKY, A. (2002). Problemas e Perspectivas para a Pesca e para a Aqüicultura Continental no Brasil. In: *Águas Doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. São Paulo: Escrituras Editora, 2.ed.
- BRANDINI, F.P.; SILVA, A.S.; PROENÇA, L.A.O. (2000). Oceanografia e Maricultura. In: *Aqüicultura no Brasil*. Brasília: CNPq/ Ministério da Ciência e Tecnologia.

- BRITSK, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B.S. (1984). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para peixes da bacia do São Francisco). Câmara dos Deputados, Brasília, 143p.
- BRITSKI, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, p.79-108.
- BUCKUP, P.A. (1998). Relationships of the characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi). In: Phylogeny and classification of Neotropical fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, p, 123-144.
- CASSANI, J.R. & CATON,W.E. (1986). Growth comparisons of diploid and triploid grass carp under varying conditions. Prog. Fish-Cult. V. 48, 184-18.
- CASTAGNOLLI, N. (1996). Aqüicultura para o ano 2000. CNPq, Brasília, 95 p.
- CASTAGNOLLI, N. (2000). Piscicultura Intensiva e Sustentável. In: Aqüicultura no Brasil. Brasília: CNPq/ Ministério da Ciência e Tecnologia.
- CASTILHO-ALMEIDA, R.B. (1999). Proporção de sexos e análise estrutural das gônadas de *Synbranchus marmoratus* (Pisces, Synbranchiformes).Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 91p.
- CHAVES, P.T.C. (1991). Testículos: estrutura e dinâmica de maturação. In Histologia de Peixes. Semana sobre histologia de peixes da F.C.A.V.J.-UNESP, Jaboticabal, 83p.
- CHOURROUT, D. (1984). Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. Aquaculture, v. 36, 111-126.

- CHOURROUT, D.; CHEVASSUS, B.; KRIEG, F.; HAPPE, A.; BURGER, G.; RENARD, P.(1986). Production os second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females. Potencial of tetraploid fish. Theor. Appl. Genet. v. 72, 193-1986.
- DAVID, G.S.; CARVALHO, E.D.; NOVAES, J.L.C.; BIONDI, G.F. (2006). A tilápia do rio Tietê- Desafios e contradições da pesca artesanal de tilápias nos reservatórios hipereutróficos do médio rio Tietê. Revista Panorama da Aqüicultura, v.16, nº 97.
- EIGENMANN, C.H. (1921). The American Characidae. Mem. Mus. Comp. Zool., v. 43, p 227-310.
- EIGENMANN, C.H. (1927). The American Characidae. Mem. Mus. Comp. Zool., v. 43, p 311-30.
- ELVIRA, B.; ALMODÓVAR, A. (2001). Freshwater fish introduction in Spain: Facts and figures in the beginning of the 21 century. Journal Fish Biology., v. 59, p. 323-331.
- FAO -United Nations Food and Agriculture Organization (1998). Aquaculture Production Statistics. Roma, FAO Fisheries Circular. 815: Revision 10, 197p.
- FAO - United Nations Food and Agriculture Organization (1999). Aquaculture Production Statistics. Roma, FAO Fisheries Circular. 815: Revision 11, 203p.
- FAO - United Nations Food and Agriculture Organization (2004). Aquaculture Production Statistics.SOFIA.
- FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; TOLEDO-FILHO, S.A. (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. Cytogenet Cell Genet., v. 31, p. 137-144.

- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, v. 49, p. 810-13.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; CARVALHO, E.D. (1994) Ploidy evaluation in the pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes): Techniques and comments. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 54, p. 31-37.
- FORYS, E.A.; ALLEN, C.R. (1999). Biological invasions and deletions: community change in south Florida. *Biological Conservation*, n. 87, p. 341-347.
- GABRIELLI, M.A.; ORSI, M.L. (2000) Dispersão de *Lernea cyprinacea* (Linnaeus) (Crustacea, Copepoda) na região norte do estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.17, n.2, p. 395-399.
- GARCIA – BERTHOU. E. (2002). Ontogenetic diet shifts and interrupted piscivory in introduced largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Internat. Hydrobiol.*, v.87, p. 335-365.
- GARUTTI, V. (1988). Morfologia, Reprodução e Aspectos evolutivos de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do rio Paraná. Tese de Doutorado, IBUSP, 151p.
- GARUTTI, V. (1995). Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. São Jose do Rio Preto, Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, 286p.

- GARUTTI, V. & BRITSKI, H.A. (2000). Descrição de uma nova espécie de *Astianax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Sér. Zool. Porto Alegre*, v.13, p.65-88.
- HENKEM, A.M.; BRUNINK, A.M.; RICHTER, C.J.J. (1987). Differences in growth rate feed utilization between diploid and triploid african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel, 1882). *Aquaculture* v.63, 233-242.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014-1015.
- HUERGO, G.P.C.M. (2004). Indução à triploidia no jundiá (*Rhandia quelen*, QUOY & GAIMARD, 1824) através do choque de pressão hidrostática. Florianópolis: Univer. Feder.de Santa Catarina; Dissertação de Mestrado, 32p.
- IHERING, R. von; AZEVEDO, P. (1936). As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). *Arch. Inst. Biol.*, v.7, p 75-106.
- JOHNSON, H.M. (2003). Mercado americano de frutos do mar em 2020- provável benefício da forte demanda para a Aqüicultura. *Rev. ABCC*, v 5, n 4, 35-39.
- KARNOVSKY, M.I. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal Cell Biology*, v.27, p. 37-8 a.
- KERBY, J.H.; EVERSON, J.M.; HARRELL, M.R.; GEIGER, J.G.; STARLING, C.C.; REVELS, H. (2002). Performance comparisons between diploid and triploid sunshine bass in fresh water ponds. *Aquaculture*, v. 211, p. 91-108.
- LIMA-JÚNIOR, D.P.; LATINI,A.O. (2006). E se a aqüicultura se expandir no Brasil? *Revista Ciência Hoje*, v. 38, n 226, 67-71.
- LOWE-McCONNELL, R.H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: Edusp. 535p.

- LOZANO, R.; REJON, C.R. and REJON, M.R. (1988) A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain Technology*, v. 66, n. 6, p. 335-338.
- LUCENA, C.A.S. (1993). Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). São Paulo, Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 125p.
- MACHADO, C.E.M. (1975). Grandes barragens e meio ambiente; dois aspectos importantes. São Paulo, CESP, 50p.
- MARCHETTI, M.P. (1999). An experimental study of competition between the native Sacramento perch (*Archoplites interruptus*) and introduced bluegill (*Leporinus macrochirus*). *Biological Invasions*, v. 1, n. 1, p.55-65.
- MELO, S. (2004). Reaberto o mercado americano para o camarão brasileiro. *Revista Panorama da Aqüicultura*, v. 14, n 86, 43-45.
- MOREIRA, H. E. (2001). Fundamentos da Moderna Aqüicultura. Canoas: Ed ULBRA, 200 p.
- NELSON, J.S. (1994). *Fishes of the World*. 3ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. (2004). Desenvolvimento embrionário e preservação criogênica do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 103p.
- NOMURA, H. (1975). Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. *Revista Brasileira de Biologia*, v35. n 4, p 775-98.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F; TOLEDO-FILHO, S.A. (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, v. 41, p. 227-236.
- PAIVA, R (1992). Lambari, de invasor a hóspede. *Revista Globo Rural*, v11, n 142, p. 49-53.
- PILLAY, T.V.R. (1992). *Aquaculture and the Environment*. Londres, Fishing News Books, 189p.
- PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B. (2001). Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. *Panorama da Aqüicultura*, v.11, n. 67, p. 15-19.
- PORTO-FORESTI F.; FORESTI, F. (2004). Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (eds.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004, p. 195 a 215.

- PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; FORESTI, F. (2005). Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). IN: Espécies Nativas para Piscicultura no. Santa Maria: Ed UFMS, 468p.
- PRIMACK, R. B. & RODRIGUES, E. (2001) Biologia da Conservação. Londrina: MITTERMEIER, MYERS & MITTERMEIER, C. G. *Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX, S. A., 430p.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TABATA, Y.A.; EIRAS, A.C. (1998). Hematologia comparada entre diplóides e triplóides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces, Salmonidae). Revista Brasileira de Zoologia, v.15, n. 4, p 1093-1102.
- RIBEIRO, C.R.; SANTOS, H. S.; BOLZAN, A.A. (1995). Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (Pacu, *Piaractus mesopotamicus*; Tambaqui, *Colossoma macropomum* e Híbrido Tambacu). Revista Brasileira de Biologia, v. 55, p. 65-78.
- RIGOLINO, M.G. (2003). Utilização do padrão de pigmentação ocular em embriões como indicador de triploidia em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 59p.
- ROULE, L. (1914). *Traité Raisonné de la Pisciculture et des Pêches*. Paris, Livrarie J.- B. Bailliére et Fils, 734 p.
- SANTOS, G.B.; FORMAGIO, P.S. (2000) Estrutura da ictiofauna dos reservatórios do rio Grande, com ênfase no estabelecimento de peixes piscívoros exóticos. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.21, n. 203, p. 98-106.
- SANTOS, R.A.; CAMPOS, E.C.; CAMARA, J.J.C.; MANDELLI JÚNIOR, J. (1991). Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v.18, p 1-11.
- SATO, Y; SAMPAIO, E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. (2006). Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia v. 23, n 1, p. 267-273.
- SHEEHAN, R.J.; SHASTEEN, S.P.; SURESH, A.V.; KAPUSCINSKI, A.R.; SEEB, J.E. (1999). Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. V. 128, p491-498.
- SILVA, J.V; ANDRADE, D.V.; OKANO, W.Y. (1996). Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris – tambiú, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 submetidos a diferentes tipos de alimentação. Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.48, n.1, p 47-54.
- SORVIG, A. (2007). Aquicultura: uma alternativa necessária à demanda do mercado de pescados. Revista eletrônica The Wharton School, janeiro.
- TABATA (2004). Obtenção e desempenho de indivíduos ginogenéticos meióticos e mitóticos de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 109p.
- TAVE, D. (1993). Genetics for fish hatchery managers. Van Nostrand Reinhold, New York, 2 ed., 415 p.
- TIWARY, B.K.; KIRUBAGARAN, R.; RAY, A.K. (2000) Gonadal development in triploid *heteropneustes fossilis*. Journal of Fish Biology, v. 57, p 1343-1348.
- THORGAARD, G.H. (1983) Chromosome set manipulation and sex control in fish. Fish Physiology, vol 9b, 31p.
- TOLEDO FILHO, S.A.; ALMEIDA TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. (1992). Cadernos de Ictiogenética. v.1, 39p.
- TOLEDO FILHO, S.A.; FORESTI, F.; ALMEIDA TOLEDO, L.F. (1996). Biotecnologia genética aplicada a piscicultura. São Paulo: Cadernos de Ictiogenética, v.3, 30p.
- TUNDISI, J.G.; SAIJO, Y. (1997). Limnological studies on the Rio Doce Valley Lakes, Brazil. Brazilian Academy of Sciences/University of São Paulo/School of Engineering at São Carlos. p.513.

VALENTINI, H. (1972). Considerações sobre a pesca no estado de São Paulo. Biol. Inst. Pesca série de Divulgação, São Paulo, (1): p.1-28.

VAZZOLER, A.E.A.M. (1996). Biologia da reprodução de peixes teleosteos: Teoria e Prática. Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 169p.

WEITZMAN, H.S. & MALABARBA, L.R. (1998). Perspectives about the phylogen and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: L.R. MALABARBA; R.E. REIS; R.P. VARI; Z.M.S. LUCENA; & C.A.S. LUCENA. (Eds.) Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS.

WOLTERS, W.R.; LIBEY, G.S.; CHRISMAN, C.L. (1982). Effect of triploid on growth and gonad developmet of channel catfish. Transactions of American Fisheries Society, v. 111, p10-105.

WOYNAROVICH, E. (1986). Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos. Brasília, CODEVASF, 68p.

WOYNAROVICH, E. (1991). The hydroelectric power plants and the fish fauna. Verh. Internat. Verein. Limnol., v. 24, p. 2531-2536.

RESUMO

A aquicultura mundial se estabelece como atividade sustentada pelo aumento do consumo de carnes brancas e pela estagnação da captura e depleção dos estoques de peixes no ambiente. O uso de espécies como tilápias, carpas, trutas, salmões tornam-se cada vez mais comum nos países tradicionais na aquicultura. No Brasil espécies exóticas e alóctones sempre foram utilizadas na piscicultura e em projetos de repovoamento de reservatórios de hidrelétricas. Esses peixes tornaram-se invasores da maioria das bacias hidrográficas brasileiras, representando riscos para diversidade da ictiofauna do Brasil. A conservação de peixes é um tema que envolve ações que minimizam os impactos causados pelas atividades humanas como o desmatamento, a poluição, construção de reservatórios e a introdução de espécies exóticas ou alóctones. Técnicas genéticas a poliploidia, a reversão de sexo podem ser utilizadas como incremento à produção aquícola e também para promover a conservação da ictiofauna aplicando estas técnicas na reprodução de peixes exóticos para promover a esterilidade dos estoques de peixes introduzidos. A espécie *Astyanax altiparanae* foi utilizada como modelo biológico de reprodução induzida e manipulação de gametas para a aplicação e padronização das técnicas de poliploidia. Foram obtidos bons resultados com as técnicas de reprodução induzida por hormônios obtidos em extratos hipofisários e também com o uso de hormônios sintéticos. Para a manipulação dos embriões submetidos aos testes de

poliploidia, foi caracterizado o desenvolvimento embriários do lambari *Astyanax altiparanae*, para a determinação dos choques de temperatura e de pressão hidrostática. Nos testes de triploidia com uso de choques de temperatura, foram obtidos indivíduos triplóides em baixa frequência. Nos tratamentos com choques de pressão hidrostática não foram obtidos indivíduos triplóides. Os testes em geral, foram considerados letais para a maioria dos indivíduos dos tratamentos comparados com os indivíduos do controle, que não foram submetidos aos choques de temperatura ou pressão hidrostática. Nos testes de tetraploidia não foram obtidos indivíduos tetraplóides e a letalidade dos indivíduos submetidos aos choques de temperatura e pressão hidrostática foi muito alta em comparação com o controle do experimento. Para a espécie *Astyanax altiparanae*, neste trabalho sugere-se que as técnicas de manipulação cromossômica de ploidia não foram efetivas devido à baixa frequência de obtenção de indivíduos triplóides e tetraplóides e alta letalidade dos embriões submetidos aos choques de temperatura e pressão hidrostática.

