

TETRAPLOIDIA EM *Rhamdia quelen* (QUOY E GAIMARD, 1824) POR CHOQUE TÉRMICO DUPLO (QUENTE E FRIO)

Silvano GARCIA^{1,2}, Hilton AMARAL JÚNIOR², George Shigueki YASUY³, Fernanda LIEBL², Luís Ivan Martinhão SOUTO⁴, Evoy ZANIBONI-FILHO¹

RESUMO

Avaliou-se a eficiência do choque térmico duplo para induzir tetraploidia em jundiá *Rhamdia quelen* em diferentes tempos pós-fertilização. Vinte mililitros de ovos (10, 15, 20, 25, 30 e 35 mpf – minutos pós-fertilização) foram tratados com choque térmico quente ($39\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) durante 3 min seguido de choque térmico frio ($1,0\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Um grupo controle foi utilizado. As taxas de fertilização e de eclosão foram medidas 12 hpf (horas pós-fertilização) e 30 hpf, respectivamente. Decorridas 60 hpf, 25 larvas de cada unidade experimental foram fixadas para verificação da ploidia, por citometria de fluxo. As taxas de fertilização foram de 87,83% para o controle e de 23,4%; 28,5%; 30,4%; 20,0%; 30,3% e 36,7%, para os grupos tratados com choque térmico aos 10, 15, 20, 25, 30, 35 mpf, respectivamente. Encontraram-se tetraploides apenas nos grupos de ovos tratados aos 15 mpf e 20 mpf. Este é o primeiro trabalho de indução de tetraploidia em jundiá por choques térmicos quente e frio, o qual possibilitou o aperfeiçoamento dessa técnica.

Palavras-chave: jundiá; tetraploide; choque de temperatura; poliploidia.

TETRAPLOIDY IN *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD 1824) BY A DUAL THERMAL SHOCK (HEAT AND COLD)

ABSTRACT

The efficiency of double thermal shock to induce tetraploidy in *Rhamdia quelen* (jundiá) at different post-fertilization periods was assessed. Each test was performed with 20 mL of eggs (10, 15, 20, 25, 30 and 35 mpf – minutes post-fertilization) exposed to hot thermal shock ($39\pm 0.2^{\circ}\text{C}$) for 3 min, followed by cold thermal shock ($1.0\pm 0.1^{\circ}\text{C}$) for 30 min. A control group was also employed. Fertilization and hatching rates were evaluated 12 and 30 hours post-fertilization (hpf), respectively. After 60 hpf, twenty-five larvae from each experimental unit were fixed to verify the ploidy by flow cytometry. Control fertilization rate was 87.83% and reached 23.4%, 28.5%, 30.4%, 20.0%, 30.3%, 36.7% respectively for 10, 15, 20, 25, 30, 35 mpf. Tetraploids were detected only at 15 mpf and 20 mpf. This is the first research of tetraploidy in jundiá obtained by hot and cold shocks, making possible the improvement of this technique.

Key words: jundiá; tetraploidy; thermal shock; poliploidy.

Artigo Científico: Recebido em 09/11/2016; Aprovado em 02/04/2017

¹Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga 1346, 8803-001 Florianópolis, SC, Brazil, evoy@lapad.ufsc.br (autor correspondente)

²Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Rua Joaquim Garcia S/N, 88340-000 Camboriú, SC, Brasil.

³Laboratório de Teriogenologia FZEA-USP Pirassununga

⁴Instituto Federal Catarinense, Campus Camboriú. Rua Joaquim Garcia S/N, 88340-000 Camboriú, SC, Brasil.

INTRODUÇÃO

O jundiá *Rhamdia quelen* é um bagre nativo da América do Sul que possui grande potencial para a aquicultura na região Sul do Brasil. É um animal rústico que apresenta rápido crescimento, tolera variação de temperatura e se reproduz com facilidade. Entretanto, ocorre declínio da taxa de crescimento quando os peixes atingem a maturidade sexual, pois passam a desviar parte da energia para o processo reprodutivo. Esse fato é agravado nos machos devido à precocidade da maturação gonadal (FRACALOSSO *et al.*, 2004; BALDISSEROTTO e RADUNZ-NETO, 2004; HUERGO e ZANIBONI-FILHO, 2006). Isto proporciona um crescimento desuniforme dos peixes, aumentando a necessidade de manejo e os custos de produção, além de prolongar o ciclo de cultivo (GARCIA *et al.*, 2013).

Uma das técnicas utilizadas para mitigar o problema decorrente do crescimento desuniforme é a indução de triploidia, forma de manipulação cromossômica mais comumente usada em aquicultura. Um dos maiores interesses na produção de peixes triploides está relacionado à esterilidade gonadal que estes apresentam (FANJUL e TORO, 1991; KUSUNOKI *et al.*, 1994; MELO *et al.*, 2006; HUERGO e ZANIBONI-FILHO, 2006; TURRA *et al.*, 2012; PRESTON *et al.*, 2013).

Apesar das vantagens dos indivíduos triploides em cultivos, a indução da triploidia na forma direta está frequentemente associada à ocorrência de altas taxas de mortalidade. Além disso, a intensidade do choque térmico pode possibilitar a presença de deformações (MELLO *et al.*, 2006). Uma dificuldade encontrada com o emprego da técnica de triploidização direta relaciona-se à identificação dos triploides, já que são peixes fenotipicamente idênticos aos diploides e as técnicas de análises comumente utilizadas para identificação da ploidia são pouco precisas e, quando eficientes, são onerosas, pois utilizam aparelhos específicos e procedimentos apurados (VOZZI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007).

Peixes triploides também podem ser obtidos de forma indireta pelo cruzamento de fêmeas tetraploides e machos diploides, originando triploides interploides. Esse procedimento evita os efeitos deletérios dos choques físicos aplicados diretamente sobre os ovos e, além disso, os animais tetraploides poderão ser usados em vários ciclos reprodutivos (LOZANO *et al.*, 1987; CHOURROUT, 1987; CESAR *et al.*, 2004; PIFERRER *et al.*, 2009;

TEBALDI e AMARAL-JUNIOR, 2009).

Sendo assim, a tetraploidia é uma alternativa para superar as dificuldades observadas na produção de peixes triploides. Indivíduos tetraploides podem ser originados pelo choque aplicado em um zigoto diploide no momento da primeira clivagem. O choque deve acontecer no momento exato em que o cromossomo for duplicado e o núcleo do zigoto estiver próximo a se dividir. O choque aplicado nesse momento impede a divisão celular e a nuclear, o que resulta, portanto, em núcleos zigóticos com quatro conjuntos de cromossomos (HONG, 1990; DITER *et al.*, 1993; LE COMBER e SMITH, 2004).

Poucos casais de peixes tetraploides maduros e férteis são suficientes para iniciar uma produção de triploides (GUI *et al.*, 1991; ÁVILA, 2004). Geração de linhagens tetraploides funcionais é um pré-requisito para a produção em massa de progênes triploides (CHOURROUT *et al.*, 1986). Ocorrência natural de exemplares tetraploides foi relatada por pesquisadores em algumas espécies, tais como: *Barbus* sp. (AGNESE *et al.*, 1990), *Clarias batrachus* (PANDEY e LAKRA, 1997) e *Fossilis heteropneustes* (PANDIAN e KOTEESWARAN, 1998).

Desde a década de 1980, várias tentativas foram feitas para induzir tetraploidia em peixes, tais como: salmonídeos, ciprinídeos e ciclídeos. Tetraploides viáveis foram obtidos em algumas espécies, como, por exemplo: *Misgurnus anguillicaudatus* (ARAI, 1991), *Cobitis biwae* (KUSUNOKI *et al.*, 1994) e *Carassius auratus gibelio* x *Cyprinus carpio* (KOBAYASHI, 1971; CHERFAS *et al.*, 1994). Salmonídeos tetraploides foram produzidos por CHOURROUT *et al.* (1986), BLANC *et al.* (1987) e HORSTGEN-SCHWARK (1993). Destes tetraploides, progênes com diferentes ploidias foram geradas apenas em *Misgurnus anguillicaudatus*.

Houve inúmeras tentativas de usar choque térmico único (THORGAARD *et al.*, 1981; DITER *et al.*, 1993) para bloquear a primeira clivagem mitótica em peixes. No entanto, salvo raras exceções, o rendimento larval tem se mostrado bastante baixo ou inexistente (FLAJSHANS *et al.*, 1993; WEBER e HOSTUTTLER, 2012).

Um protocolo para a indução da tetraploidia, bloqueando a primeira divisão mitótica com a aplicação de choque térmico quente de curta duração seguido por choque térmico frio de longa duração, foi desenvolvido por NAM *et al.* (2004). Considerando o bom desempenho do protocolo de duplo choque térmico para induzir a tetraploidia obtido em

outras espécies de peixes, o presente estudo teve como objetivo testar esse protocolo e determinar o momento exato da aplicação do choque térmico duplo (quente seguido de frio) para produção de larvas tetraploides de jundiá.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú, da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (CEPC-EPAGRI), e no Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais (CEPTA), conveniado com a Universidade de São Paulo (USP).

Reprodução

Para o experimento foram empregados peixes maduros e aptos à reprodução. Dentre as fêmeas, utilizaram-se aquelas que apresentavam região peritoneal avolumada e papila entumescida e, dentre os machos, os que liberavam sêmen sob leve pressão abdominal (GOMES *et al.*, 2000; AMARAL-JUNIOR, 2007). Foram selecionadas 15 fêmeas (730 ± 68 g = peso médio \pm desvio padrão) e 8 machos (614 ± 49 g), os quais foram distribuídos em hapas de $0,5 \text{ m}^3$ (3 hapas com 5 fêmeas em cada uma e 8 machos em uma única hapa). As hapas foram colocadas em tanque de concreto de $2,5 \text{ m}^3$, com aeração constante (oxigênio dissolvido superior a 6 mg.L^{-1}) e temperatura da água de $25,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$. Somente as fêmeas foram induzidas à desova, utilizando a aplicação 5 mg.kg^{-1} de glândula pituitária de carpa em dose única (WOYNAROVICH E HORVATH, 1983; AMARAL-JUNIOR, 2007).

Para viabilizar os procedimentos necessários para o manejo dos gametas durante o experimento, as fêmeas foram induzidas à desova com um intervalo de 90 min entre cada lote de cinco fêmeas (hapas). Os ovócitos foram coletados por extrusão a seco, realizada cerca de 10 h após a indução hormonal, sendo recolhidos em um recipiente para análise visual e posterior fertilização. Selecionaram-se as desovas cujos ovócitos aparentavam boa qualidade, ou seja, se apresentavam túrgidos e translúcidos, assim como com coloração e tamanho homogêneos.

O sêmen, coletado por meio de uma leve pressão abdominal, foi depositado diretamente sobre os ovócitos e misturado a estes; em seguida, os gametas foram ativados utilizando-se água oriunda do tanque de incubação. Para estimar a quantidade de ovócitos,

uma alíquota (0,5 g) de cada desova foi coletada antes da adição do sêmen e da água, fixada em formalina a 4%, e posteriormente analisada de acordo com WIRTZ e STEINMANN (2006), sendo obtido o valor médio de 1.356 ± 78 ovócitos.g⁻¹. Após a condução dos trabalhos, uma parte do lote de reprodutores foi depositada no Museu de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, resultando nos vouchers UFRGS 18258, UFRGS 18259, UFRGS 18260.

Delineamento e Procedimentos de tetraploidização

O experimento consistiu em submeter ovos fertilizados de *Rhamdia quelen* [aos 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos pós-fertilização (mpf)] a um choque térmico quente ($39 \pm 0,2^\circ\text{C}$) durante 3 min (NAM *et al.*, 2004) seguido por choque térmico frio ($1,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) durante 30 min (VOZZI *et al.*, 2003). Dessa forma foram testados seis tratamentos que consistiram na variação do tempo pós-fertilização em que foi iniciado o choque térmico, além de um tratamento controle, em que os ovos não foram submetidos a choque de temperatura. O choque térmico quente foi aplicado submergindo os ovos dos peixes em recipientes contidos em caixa de isopor com 120 L de água na temperatura prevista, de modo que o grande volume de água impedisse a variação da temperatura durante o procedimento, e o choque térmico frio, em caixa de isopor de 100 L contendo água e gelo. A temperatura da água das caixas para ambos os choques foi estabilizada momentos antes dos procedimentos. A cada desova e posterior fecundação, os ovos foram misturados e divididos ao acaso em sete porções iguais (seis tratamentos e um controle). O grupo controle foi incubado num tanque com água mantida a cerca de 25°C .

Em cada tratamento e no grupo controle, 20 mL de ovócitos fertilizados ($1392,35 \pm 22,17$) foram distribuídos em unidades experimentais constituídas por peneiras cônicas de plástico (15,0 cm de diâmetro, malha de 0,4 mm e volume útil de 900 mL) fixadas em um sistema de incubação composto por placas de isopor. Esse sistema de incubação foi colocado na superfície de um tanque de concreto com 2.500 L de água e aeração constante, visando manter os ovos em movimento lento dentro das peneiras. A temperatura foi mantida em $25,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$, o oxigênio dissolvido, em $6,8 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e o pH, em $7,8 \pm 0,5$, sendo os valores mensurados diariamente com utilização de sonda multiparâmetro (YSI 556®). O experimento foi repetido três vezes no tempo, com a utilização de três desovas obtidas com intervalos

de aproximando 90 min.

A taxa de fertilização dos ovos de cada unidade experimental foi avaliada na fase de gástrula tardia 12 h pós-fertilização (hpf) em uma amostra contendo 260 embriões (ZANIBONI-FILHO, 1992; RIZZO *et al.*, 2003).

A taxa de eclosão foi estimada 30 horas após a fertilização. Decorridas 60 hpf, 25 larvas de cada unidade experimental foram fixadas em solução de 3 partes de metanol : 1 parte ácido acético, para a confirmação da ploidia por citometria de fluxo. Para a análise por citometria de fluxo, utilizou-se o kit Cystain (Partec GmbH, Alemanha). Nesse procedimento, cada larva é lisada em 120 mL de solução para isolar os núcleos, os quais são, em

seguida, corados com 1,5 mL de solução DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole). A suspensão resultante é então filtrada em malha de 30 µm (Celltrics, Partec GmbH, Alemanha), e o filtrado, que mantém o conteúdo de DNA, é analisado em citômetro de fluxo (Partec Cy Flow Ploidy Analyzer, Partec GmbH, Alemanha).

O citômetro foi calibrado com um padrão contendo células diploides de jundiá, sendo utilizadas, ainda, células somáticas de lambari *Astyanax altiparanae* como controle durante as análises de citometria de fluxo. A tetraploidia foi validada para indivíduos que apresentaram conteúdo de DNA 100% superior ao dos diploides (LAMATSCH *et al.*, 2000) e o conteúdo de DNA correspondente foi expresso em histogramas

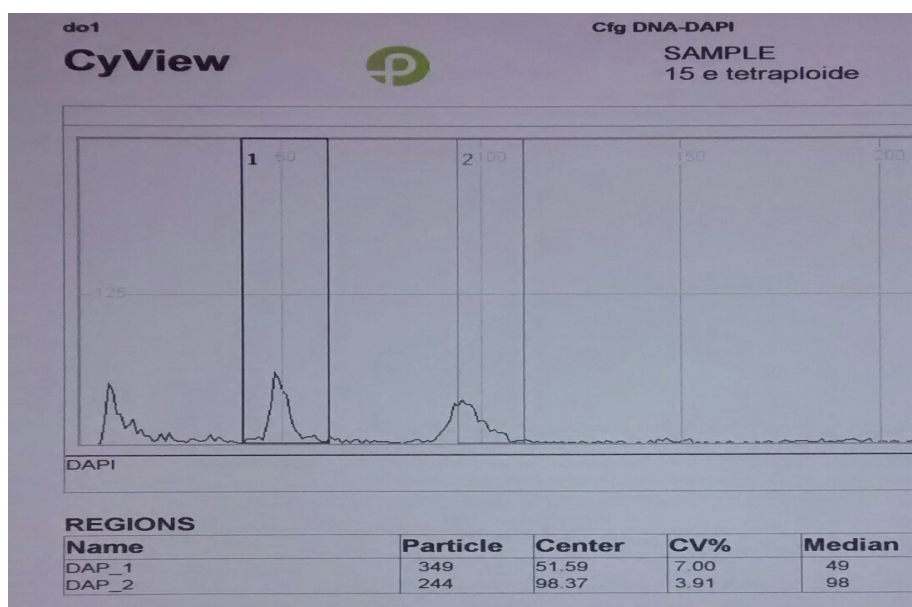


Figura 1. Histograma de citometria de fluxo de larva de jundiá *Rhamdia quelen* submetida a choques térmicos (quente e frio) sequenciais para induzir a tetraploidia.

Análise estatística

Os dados da taxa de fertilização e de eclosão larval foram submetidos ao teste de Levene para avaliar a homocedasticidade dos mesmos. Posteriormente foi realizada análise de variância unifatorial e, quando necessária, a separação de média pelo teste SNK. Em todas as análises utilizou-se nível de significância de 5% (ZAR, 2010).

RESULTADOS

Quando comparados os sete tratamentos, verifica-

se que as taxas de fertilização e de eclosão larval foram maiores nos embriões do tratamento controle. Dentre os grupos de ovos submetidos aos choques térmicos duplos, os que apresentaram maiores taxas de eclosão foram os que receberam choque 35 mpf (minutos pós-fertilização) (Figuras 2A e 2B).

A sobrevivência das larvas 60 horas após a eclosão foi semelhante entre os tratamentos, com valor inferior ao verificado no tratamento controle. O valor médio da taxa de sobrevivência das larvas entre todos os tratamentos representa apenas 2,71% do valor obtido no tratamento controle, confirmando que a aplicação de choques térmicos é nociva à sobrevivência das larvas.

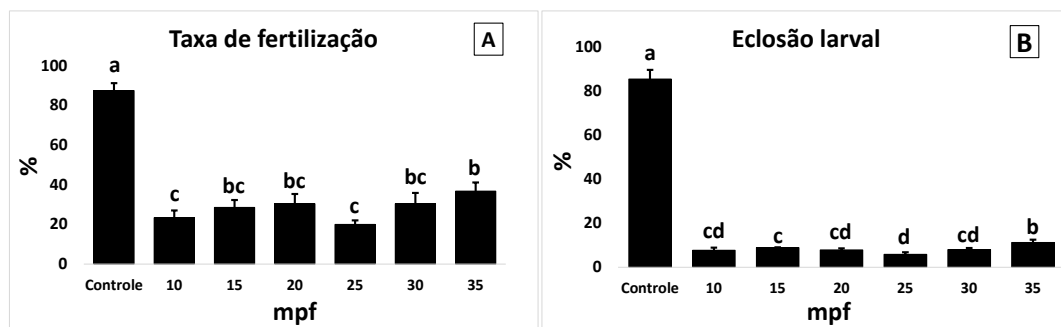


Figura 2. Valores médios das taxas de fertilização (A) e de eclosão (B) dos tratamentos com choque térmico duplo, aplicado em diferentes períodos de tempo depois da fertilização (em minutos pós-fertilização - mpf), e do grupo controle.

A quase totalidade das larvas sobreviventes dos seis tratamentos e algumas do grupo controle foram submetidas à análise de verificação de ploidia por citometria de fluxo. Apesar disso houve dificuldade para extração do DNA das larvas, talvez em razão de a fixação ter sido feita em solução de

metanol com ácido acético, ocasionando perda de aproximadamente 15% das larvas processadas. Dentre as larvas analisadas, apenas nos grupos submetidos ao choque térmico aplicado 15 mpf e 20 mpf foram encontrados exemplares tetraploides (Tabela 1).

Tabela 1. Números de larvas sobreviventes, larvas analisadas, larvas diploides e larvas tetraploides registrados nos diferentes tratamentos (tempo para indução do choque térmico frio em minutos pós-fertilização).

Tratamento	Sobrevivência (n)	Larvas Analisadas (n)	Diploides (n)	Tetraploides (n)
10	55	46	46	0
15	67	62	59	3
20	68	54	52	2
25	61	48	48	0
30	55	44	44	0
35	56	51	51	0
Controle	2357	73	73	0

DISCUSSÃO

Os valores da taxa de fertilização foram fortemente afetados pelos tratamentos com choques térmicos sequenciais, independentemente de o tratamento ter sido iniciado entre 10 e 30 minutos pós-fertilização (mpf). Quanto à eclosão de larvas, somente quando esse tempo foi de 35 mpf houve aumento da taxa de eclosão. Os efeitos deletérios dos choques físicos aplicados sobre os ovos são amplamente conhecidos para diferentes espécies, sendo atribuídos à deformação dos microtúbulos do citoesqueleto na formação do fuso mitótico (TABATA *et al.*, 1999),

por desencadarem vários processos fisiológicos em ovos recém-fertilizados e que são totalmente desconhecidos, sendo determinados por reações no período compreendido entre a fertilização e a primeira clivagem (ALMEIDA, 2007).

NAM *et al.* (2004) afirmam que a redução da produção de larvas em tratamentos com choques térmicos sequenciais (quente e frio), quando comparada com a resultante de ovos tratados com choque térmico único, é compensada pelo aumento do número de larvas tetraploides geradas pelo tratamento. Apesar de ainda desconhecidas as razões que impedem a primeira clivagem através da

combinação de choques térmicos (NAM *et al.*, 2004), os trabalhos que utilizaram choques térmicos únicos para induzir a tetraploidia de *Misgurnus mizolepis* (NAM *et al.*, 1999; DITER *et al.*, 1993; MALISON *et al.*, 1993; YAMAZAKI e GOODIER, 1993) sempre produziram quantidades inferiores de tetraploides em relação àquelas resultantes de testes feitos com choques térmicos sequenciais (NAM *et al.*, 2004).

Para induzir a tetraploidia, o choque térmico deve ser aplicado pouco antes do momento em que ocorre a primeira clivagem, sendo observado neste trabalho que, para jundiá, o processo deve ser iniciado entre 15 mpf e 20 mpf quando os ovos estiverem mantidos numa temperatura de água de $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Esses tratamentos foram os únicos que produziram larvas tetraploides. Considerando que a taxa metabólica dos peixes é fortemente influenciada pela temperatura da água, pode-se supor que a manutenção de ovos incubados em temperatura mais baixa deve ampliar o período de tempo (aumenta a janela de viabilidade) em que a aplicação do choque térmico deve ser iniciada para induzir a tetraploidia do jundiá, o que pode favorecer o manejo produtivo. Para isso há necessidade de conhecer a amplitude térmica tolerável para a incubação dos ovos da espécie investigada, assim como, detalhadamente, a cronologia do desenvolvimento embrionário em cada valor de temperatura. Ovos de jundiá incubados a 24°C eclodiram 26 horas pós-fertilização (hpf), enquanto aqueles incubados a 21°C , apenas depois de 43 hpf (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009). Nesse caso houve uma ampliação de 65% do tempo necessário para concluir o desenvolvimento embrionário do jundiá desde a fertilização até a eclosão. Essa informação pode ser utilizada na realização de novos estudos que objetivem a produção de tetraploides de jundiá em distintos valores de temperatura.

As taxas de indução de tetraploidia variam muito, dependendo da espécie, da qualidade dos ovócitos e da técnica aplicada (NAM *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2007; WEBER e HOSTUTTLER, 2012). Neste trabalho foi possível estabelecer um protocolo para produzir larvas tetraploides de jundiá. A obtenção de alguns poucos tetraploides já pode ser suficiente para garantir a produção em massa de progênes triploides (CHOURROUT *et al.*, 1986).

Este é o primeiro trabalho bem sucedido na produção de jundiás tetraploides através de choques quente e frio sequenciais, abrindo possibilidades para o aperfeiçoamento dessa técnica e a posterior

produção em larga escala.

CONCLUSÃO

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho, pode-se concluir que é possível obter larvas tetraploides por meio de tratamentos térmicos iniciados somente depois de 15 ou antes de 25 mpf, quando os ovos são mantidos em uma temperatura de $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Outras condições de temperatura e de tempo para iniciar o choque térmico poderão ser testadas para verificar combinações desses fatores que sejam mais eficientes no processo de obtenção de larvas tetraploides de jundiá.

REFERÊNCIAS

- AGNESE, J.F.; BERRESI, P.; LEVEQUE, C.; GUEGAN, J.F. 1990 Two lineages, 2n and 4n, demonstrated in African species *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae): on the coding of differential gene expression. *Aquatic Living Resources*, 3(4): 305-311.
- ALMEIDA, R.B.C. 2007 *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação. Botucatu. 119f. (Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista – UNESP).
- AMARAL-JUNIOR, H. 2007 *Manual de reprodução de peixes de água doce com cultivo comercial na região Sul do Brasil*. Florianópolis: Epagri, Boletim Técnico 136, 53p.
- ARAI, K. 1991 Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197(1-4): 205-228.
- ÁVILA, M.C. 2004 *Indução à tetraploidia em tilápia nilótica *Oreochromis niloticus*, utilizando-se choque térmico*. Jaboticabal: Mauricio Carrillo Ávila. 59p.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ-NETO, J. 2004 *Criação de jundiá*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 232p.

- BLANC, J.M.; CHOURROUT, D.; KRIEG, F. 1987 Evaluation of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires. *Aquaculture*, 65(3-4): 215- 220.
- CESAR, M.P.; MURGAS, L.D.S.; ARAÚJO, R.V.; DRUMMOND, C.D. 2004 *Método para obtenção de população monosexo na piscicultura*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Boletim Agropecuário, 69, 27p.
- CHERFAS, N.B.; GOMELSKY, B.I.; EMELYANOVA, O.V.; RECOUBRATSKY, A.V. 1994 Induced diploid gynogenesis and polyploidy in the crucian carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) x common carp *Cyprinus carpio*, L. Hybrids. *Aquaculture Fish Management*, 25(9): 943- 954.
- CHOURROUT, D. 1987 Genetic manipulations in fish: review of methods, *In*: K. Tiews (Ed.). *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Schriften der Bundesforschungsanstalt für Fischerei*, Heenemann, Berlin p. 111-126.
- CHOURROUT, D.; CHECASSUS, B.; KRIEG, F.; HAPPE, A.; BURGER, G.; RENARD, P. 1986 Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females potential of tetraploid fish. *Theriogenology Applicade Genetic*, 72(2): 193- 206.
- DITER A.; QUILLET E.; CHOURROUT D. 1993 Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *Journal Fish Biology*, 42(5): 777-86.
- FANJUL, L.C.; TORO, M.A. 1991 *Mejora genética de peces y moluscos*. Madrid: Mundi Prensa. 110p.
- FLAJSHANS M.; LINHART O.; KVASNICKA P. 1993 Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. *Aquaculture*, 113(4): 301-312.
- FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. 2004 Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 26(3): 43-49.
- GARCIA, S.; AMARAL-JUNIOR, H.; SOUTO, L.I.M.; WARMILING, P.F.; BERNARDES JUNIOR, J.J. 2013 Cultivo mono sexo de jundiá *Rhamdia quelen*. *In*: S. Garcia & H. Amaral Junior (Eds.). *O Jundiá Rhamdia quelen: Relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce nativo mais promissor da região sul do Brasil*. Camboriú, EPAGRI, Gráfica Delta.p.32-41.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C. 2000 Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*, 30(1):179-185.
- GUI, J.; SUN, J.; LIAN, G.S.; HUANG, W.; JIANG, Y. 1991 Studies on genome manipulation in fish: II. Tetraploidy induced by hydrostatic pressure treatment and a combination of hydrostatic pressure and cold treatments in transparent colored crucian carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 15(4): 333- 342.
- HONG, Y. 1990 Tetraploidy induced by heat shock in bighead carp, *Aristichthys nobilis*. *Acta Zoologica Sinica*, 36(1): 70-75.
- HORSTGEN-SCHWARK, G. 1993 Initiation of tetraploid breeding line development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Fish Management*, 24(5): 641- 652.
- HUERGO, G.M.; ZANIBONI-FILHO, E. 2006 Triploidy Induction in Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard 1824) through hydrostatic pressure shock. *Journal of Applied Aquaculture*, 18(4): 45-57.
- KOBAYASHI, H. 1971 A cytological study on gynogenesis on triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 80(4), 316-322.
- KUSUNOKI, T.; ARAI, K.; SUZUKI, R. 1994 Production of viable gynogens without chromosome duplication in the spinous loach *Cobitis biwae*. *Aquaculture*, 119(1): 11-23
- LAMATSCH, D.K.; STEINLEIN, C.; SCHMID M.; SCHARTL, M. 2000 Non invasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow

- cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry*, 39(2): 91-95.
- LE COMBER, S.C.; SMITH, C. 2004 Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4): 431-442.
- LOZANO, R.; RUIZ, C.; RUIZ, M. 1987 Manipulación cromosómica en organismos acuáticos. p. 215-246. In: Espinosa De Los Monteros, J. & Labarta, U. (Eds.). *Genética en acuicultura*. Madrid: Caycit. 274 p.
- MALISON, J.A.; PROCARIONE, L.S.; HELD, J.A., KAYES, T.B.; AMUNDSON, C.H. 1993 The influence of triploidy and heat and hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture*, 116(2-3): 121-133.
- MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; SOUSA, A.B.; CARVALHO, D.C.; SEERIG, A. S.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; FARIA, P.M.C. 2006 Manipulação cromossômica: aplicações práticas na aquicultura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 30(2): 105-112.
- NAM, Y.K.; CHOI, G.C.; KIM D.S. 1999 Blocking of the first cleavage in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture*, 12(3): 167-73.
- NAM, Y.K.; CHO, G.C.; KIM, D.S. 2004 An efficient method for blocking the 1st mitotic cleavage of fish zygote using combined thermal treatment, exemplified by mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Theriogenology*, 61(5): 933-945.
- PANDEY, N.; LAKRA, W.S. 1997 Evidence of Female Heterogamety, B-Chromosome and Natural Tetraploidy in the Asian catfish, *Clarias batrachus*, used in Aquaculture. *Aquaculture*, 149(1-2): 31-37.
- PANDIAN, T.J.; KOTEESWARAN, R. 1998 Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384(1): 167- 243
- PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIERE, J.C. 2009 Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3-4): 125-156.
- PRESTON A.C.; TAYLOR J.F.; CRAIG B., BOZZOLLA P.; PENMA N.D.J.; MIGAUD H. 2013 Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, 415-416: 160-166.
- RIZZO, E.; GODINHO, H.P.; SATO, Y. 2003 Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. *Theriogenology*, 60(6): 1059-1070.
- RODRIGUES-GALDINO, A.M.; MAIOLINO C.V.; FORGATI M., DONATTI L.; MIKOS J.D.; CARNEIRO P.C. F.; SANT'ANNA F.R. 2009 Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. *Zygote*, 18(2): 131-144.
- SILVA, F.S.D.; MOREIRA, R.G.; OROZCO-ZAPATA, C.R.; HILSDORF, A.W.S. 2007 Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes) (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture*, 272(Supplement 1): 110-114.
- TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G.; TSUKAMOTO, R.Y. 1999 Production of all female triploid rainbow-trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). III - Growth up to first sexual maturation. *Boletim do Instituto de Pesca*, 25(único): 67-76.
- TEBALDI, P.C.; AMARAL-JUNIOR, H. 2009 Production of tetraploid Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the application of thermal shock. *Revista eletrônica de Veterinaria*, 10. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009/100908.pdf>> Acesso em: 14 ago. 2014.
- THORGAARD, G.; JAZWIN, M.E.; STIER, A.R. 1981 Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 110(4), 546-550.
- TURRA, E.M.; OLIVEIRA, D.A.A.; VALENTE, B.D. 2012 Estimation of genetic parameters for body weights of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

using random regression models. *Aquaculture*, 354-355: 31-37.

VOZZI, P.A.; SANCHEZ, S; PERMINGEAT, E.D. 2003 Inducción de triploidia em *Rhamdia quelen*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 29(1):87-94.

WEBER G.M.; HOSTUTTTLER M.A. 2012 Factors affecting the first cleavage interval and effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture*, 344-349: 231-238.

WIRTZ, S.; STEINMANN P. 2006 Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis*. *Journal of Fish Biology*, 68(6): 1896-1902.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L.A. 1983 *A propagação artificial de peixes de águas tropicais: Manual de extensão*. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, Documento Técnico sobre Pesca 201. 225p.

YAMAZAKI, F.; GOODIER, J. 1993 Cytogenetic effects of hydrostatic pressure treatment to suppress the first cleavage of salmon embryos. *Aquaculture*, 110(1): 51-59.

ZANIBONI-FILHO, E. 1992 *Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (Colossoma macropomum Cuvier 1818)*. São Carlos. 202p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos).

ZAR, J.H. 2010 *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 944p.