MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA CONTINENTAL

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade- PIBIC/ICMBio

Relatório de Final

(2014-2015)

BANCOS GENÉTICOS EM PEIXES AMEAÇADOS DE EXTINÇÃO: EMPREGO DE POPULAÇÕES MONOSSEXUAIS FEMININAS E QUIMERISMO

Bolsista: Paulo André de Andrade Santos

Orientador: José Augusto Senhorini

PIRASSUNUNGA - SP
AGOSTO/2015

1. RESUMO

Muitas espécies de peixes ameaçadas de extinção apresentam dificuldades para se reproduzir em cativeiro. Por isso, técnicas como quimerismo, transplante celular, ginogênese, masculinização por temperatura e androgênese possibilitam que espécies abundantes e de fácil reprodução em sistema laboratorial, passem a produzir gametas de espécies ameaçadas. Desta forma, uma espécie com biologia reprodutiva e manejo em laboratório já bem padronizados, como é o caso do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), por exemplo, podem atuar como receptores de células germinativas de diversas outras espécies nativas ameaçadas a partir do uso de tais técnicas. Contudo, para que haja a transmissão germinativa, é necessário que o transplante seja realizado para um indivíduo estéril. Em peixes, geralmente indivíduos triploides ou poliploides apresentam-se estéries por meio de métodos físicos ou químicos de indução. A partir daí, a produção de um lote monossexual feminino de *Astyanax altiparanae* por meio de masculinização por temperatura se torna uma ferramenta útil, visto que a partir desta técnica, torna-se possível a indução de machos XX (fêmeas genotípicas), pois essas fêmeas poderão atuar como receptoras de células germinativas primordiais (CGPs) de espécies ameaçadas, passando a produzir seus gametas. Desta forma, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de estabelecer um protocolo eficaz de masculinização em *Astyanax altiparanae* por temperatura, servindo como base para o desenvolvimento de técnicas de conservação e propagação mediada. Os animais foram obtidos a partir de um plantel existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA/ICMBio), em Pirassununga/SP. Três dias após a eclosão, as larvas foram cultivadas em um sistema de temperatura controlada. Foram utilizadas três faixas distintas de temperatura (34°C, 35°C e 36°C), para indução da masculinização nos peixes. Um outro grupo foi mantido a parte sob uma temperatura de 25°C, como controle. Também foram obtidas as taxas de crescimento e sobrevivência em cada faixa de temperatura analisada. O experimento foi realizado em

triplicata. Foi constatado através de sexagem, a partir de características morfológicas (fêmeas com nadadeira anal lisa e machos com nadadeira anal áspera), que a faixa com maior número de machos foi a de 35°C. Os machos desse tratamento foram utilizados para fertilizar ovócitos de fêmeas normais, para obtenção de 100% de fêmeas. Os resultados de crescimento foram superiores nas faixas de 25°C e 34°C, onde as larvas apresentaram cerca de 1 a 1,2 cm de comprimento. Quanto à sobrevivência, a faixa de temperatura mais efetiva foi a de 34°C (superior a 95%). Contudo, a faixa de temperatura na qual se obteve maior número de possíveis pseudo-machos (machos com herança genética de fêmea) foi de 35°C. No teste de progênie, utilizando os machos da temperatura de 35°C, evidenciou um número superior de machos e inferior de fêmeas, o que não deixa claro a eficácia do protocolo na indução de lotes monossexuais femininos, no entanto, essa pesquisa servirá como base para o aprimoramento e refinamento de técnicas e protocolos que visam estabelecer por meios de faixas de temperaturas, a produção de lotes monossexuais na espécie, e também poderá ser utilizado para trabalhos de conservação e produção das espécies nativas neotropicais, que por usa vez não há estudos detalhados sobre esses aspectos relacionados a indução de lotes monossexuais por temperatura.

Palavras – chave: Reversão sexual, monossexo, reprodução, conservação, lambari.

2. ABSTRACT

Many species of endangered fish find it difficult to breed in captivity. Therefore, techniques such as chimerism, cell transplantation, ginogênese, masculinization by temperature and androgenesis enable abundant species and easily reproduced in laboratory system to start generating gametes of endangered species. Thus, a species with reproductive biology and management are well-established in the laboratory, as is the case of the yellow tail tetra (altiparanae astyanax), for example, can act as germ cell receptors of several other native endangered species from the use such techniques. However, for there to germline transmission, it is necessary for transplantation is conducted in a sterile individual. In fish, triploid or polyploid individuals often have to estéries by physical or chemical methods of induction. Thereafter, production of a female monosexual lot astyanax altiparanae through masculinization by temperature becomes a useful tool since from this technique, it becomes possible induction XX males (genotypic females), as these females They may act as primordial germ cell receptor (CGPS) endangered species, starting to produce their gametes. Thus, this study was conducted in order to establish an effective masculinization protocol astyanax altiparanae by temperature, serving as basis for the development and maintenance mediated propagation techniques. The animals were obtained from an existing roster at the National Center for Research and Conservation of Fish Continental (CEPTA / ICMBio) in Pirassununga / SP. Three days after hatching, the larvae were cultured in a temperature controlled system. Three different temperature ranges were used (34 ° C, 35 ° C and 36 ° C) to induce masculinization in fish. A further group was kept under the part 25 ° C as a control. Also obtained was the growth and survival rates at each temperature range examined. The experiment was performed in triplicate. It has been found through sexing, from morphological characteristics (female with smooth anal fin and males with rough anal fin), the group with the highest number of males was 35 ° C. Males of this treatment were used to fertilize oocytes

with normal females to obtain 100% of females. The growth results were higher in the ranges of 25 ° C and 34 ° C, where the larvae showed about 1 to 1.2 cm in length. The survival, the most effective temperature range was 34 ° C (over 95%). However, the temperature range in which obtained the highest number of possible pseudo-males (males with genetic inheritance female) was 35 ° C. In the progeny test using males of 35 ° C, showed a higher number of male and lower female, which does not make clear the efficacy of the protocol in inducing female monosex lots, however, this research will be the basis for the improvement and refinement of techniques and protocols aimed at establishing by temperature ranges means, production of monosex lots in the species, and can also be used for conservation work and production of neotropical native species, which uses time there are no studies detailed on these aspects related to induction lots monosex by temperature.

Abstrat: Sex reverse, single sex, reproduction, conservation, lambari.

3. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espículas da nadadeira anal de um macho da espécie Astyanax altiparanae (Piva, a publicar).

Figura 2 - Crescimento das larvas de Astyanax altiparanae mantidas a 25°C, 34°C, 35°C e 36°C.

Figura 3 - Crescimento das pós-larvas de Astyanax altiparanae no período de 25 dias a 25°C, 34°C, 35°C e 36°C.

Figura 4 - Sobrevivência de pós larvas de Astyanax altiparanae a 25°C, 34°C, 35°C e 36°C.

Figura 5 - Proporção sexual após tratamentos a 25°C, 34°C, 35°C e 36°C.

Figura 6 - Índice de fertilização da fêmea 1.

Figura 7 - Índice de fertilização da fêmea 2.

Figura 8 - Proporção sexual verificada entre as larvas de cada parental (Peixe 1, P2, P3, P4, P5, P6, P7).

4. Sumário

1. Resumo..... 2

2. Abstract..... 4

3. Súmario..... 6

4. Introdução..... 7

5. Material e Métodos..... 9

6. Resultados..... 13

7. Discussão..... 15

8. Agradecimentos..... 18

9. Figuras..... 19

10. Referências bibliográficas.....27

5. Introdução

A diferenciação sexual em peixes representa um importante aspecto de estudo para a manipulação reprodutiva, com subsequente implementação de medidas conservacionistas. Conhecer os fatores que influenciam e modulam este processo, torna-se imprescindível para que possam ser utilizados em técnicas de propagação mediada em espécies ameaçadas, ou mesmo na produção aquícola, para cultivo de linhagens de sexo determinado.

Na maioria das espécies de peixes, o sexo genotípico é determinado após a fertilização do ovócito pelo espermatozoide, já a diferenciação do sexo fenotípico ocorre em etapas posteriores do desenvolvimento. Contudo, aspectos relacionados ao ambiente, como a temperatura da água, podem influenciar este processo de diferenciação (YAMAMOTO, 1999; CONOVER, 2004). Estudos clássicos apontam que esta influência é maior durante os estágios pós-larval, geralmente com a indução de indivíduos machos fenotípicos condicionados em temperaturas mais quentes, para a maioria das espécies (AIDA, 1936).

A influência da temperatura da água sobre a determinação do sexo fenotípico foram demonstrados para muitas espécies de peixes (STRUSSMANN & NAKAMURA, 2002). No entanto, protocolos específicos para cada espécie tornam-se necessários, principalmente entre as espécies nativas neotropicais, tendo em vista que a susceptibilidade à temperatura e masculinização pode variar entre as espécies (MYLONAS, *et al.*, 2005).

No Brasil, onde as informações e protocolos de manipulação da reprodução das espécies nativas são escassos, torna-se necessária a padronização de uma espécie modelo em laboratório para que se possa avançar no aprimoramento destas técnicas. A espécie *Astyanax altiparanae* apresenta-se como um interessante modelo neste sentido. Devido ao fato de apresentar desova intermitente, possibilitando a coleta de dados ao longo do ano todo, além de protocolo de indução e reprodução artificial padronizados, esta espécie apresenta grande

rusticidade e capacidade de adaptação aos mais variados sistemas de tratamento (PEREIRA-SANTOS, 2013).

Desta forma, as técnicas de padronização da masculinização por temperatura podem ser empregadas nesta espécie modelo, que futuramente poderá ser utilizada como receptor triploide estéril de células germinativas de outras espécies ameaçadas, na produção de quimeras germinativas, atuando como ferramenta de propagação mediada (YASUI; et al., 2014).

Desta forma, este trabalho foi conduzido com o objetivo de otimizar um protocolo eficaz de masculinização na espécie nativa *Astyanax altiparanae* por meio do incremento da temperatura de incubação, a fim de utilizar esta técnica como ferramenta na obtenção de lotes de fêmeas. Os animais decorrentes deste protocolo poderão ser utilizados futuramente na obtenção de fêmeas triploides estéreis, de acordo com estudo já estabelecido pelo presente grupo (NASCIMENTO, a publicar), para utilização como receptores de células germinativas primordiais de outras espécies ameaçadas, atuando, desta forma, como uma base no emprego de técnicas de propagação mediada.

6. Material e Métodos

Coleta, seleção e indução hormonal dos reprodutores

Lotes de *Astyanax altiparanae* foram coletados em tanques escavados no CEPTA-ICMBio, em Pirassununga/SP. Foram selecionados animais maduros aptos a reprodução (fêmeas com ventre abaulado e papila urogenital avermelhada). Os exemplares selecionados passaram por uma indução hormonal hipofisária, em dose única (5mg kg^{-1} para machos e fêmeas). O procedimento de fertilização in vitro seguiu nosso recente protocolo (YASUI; et al., 2014). Após a eclosão, as pós larvas de cada casal foram transferidas para ambientes de temperatura controlada, nas faixas estabelecidas para reversão sexual. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os animais foram devidamente anestesiados durante todo o procedimento de coleta, com solução de Mentol (~100 mg L-1, Êxodo Cientifica, Brasil).

Incubação das larvas em sistema de temperatura controlada

Foram coletadas 1.000 pós-larvas de cada casal. As amostras foram separadas em 4 grupos de 250 animais, sendo cada um cultivado em recipientes flutuantes, com fundo de tela de 100µm dentro de diferentes aquários de 40 litros em temperaturas de 25°C (controle), 34°C, 35°C e 36°C durante 25 dias. Todos os aquários apresentavam bomba realizando recirculação da água e controladores de temperatura, os quais foram programados para manter as faixas estabelecidas em cada tratamento.

Manutenção do sistema e alimentação das larvas

Com o uso de pipetas, foram realizadas limpezas diárias, retirando resíduos de comida, fezes e larvas mortas. A cada 7 dias foram realizadas trocas de água dos aquários. As larvas foram alimentadas com náuplios de artêmia duas vezes ao dia.

Biometria das larvas

A cada 5 dias foram coletadas 10 pós-larvas de cada tratamento para realização de biometria, com medição do comprimento total. As amostras foram analisadas em microscopia de luz e fotonmicrografadas, em estereomicroscópio Nikon SMZ 1500 (Nikon, Tokyo, Japão) dotado de uma câmera CCD (Nikon DS-Fi, Nikon, Japão). Imagens digitais foram então tomadas utilizando-se o software NIS – AR Elements (Nikon, Tokyo, Japão).

Crescimento dos animais após tratamento térmico

Após 25 dias da coleta, as larvas foram mantidas em aquários de 40 litros com recirculação de água. Neste ambiente, as amostras passarão 4 meses até atingirem a maturação sexual. A renovação de água esta sendo feita a cada 7 dias. Após o segundo mês de tratamento as larvas passam a comer ração juntamente com náuplios de artêmia.

Identificação do sexo a partir das características sexuais secundárias

Como observado na Figura 1, uma das técnicas de identificação mais eficaz para diferenciar machos de fêmeas em *Astyanax altiparanae,* é a análise das espículas na nadadeira anal. Machos apresentam espículas, capazes de serem sentidas ao tato quando tocadas, fêmeas não apresentam tais espículas, sendo assim um método eficaz para diferenciação sexual.

Foram analisados 10 peixes do grupo controle (25°C), 42 peixes da terceira repetição (34°C), 53 peixes da segunda repetição (35°C), 75 peixes da terceira repetição (35°C), 33 peixes da primeira repetição (35°C) e 27 peixes da terceira repetição (36°C), (Fig. 5).

Implante de transponders nos possíveis pseudo-machos

Transponders foram implantados nos peixes por inserção cirúrgica na região abdominal. Após serem anestesiados, a cavidade abdominal dos peixes foi aberta com o auxílio de um bisturi. O implante foi inserido visando controle e identificação dos peixes.

Utilização dos peixes masculinizados

Foram utilizados 8 peixes incubados sob a faixa de 35°C, para fertilizar fêmeas (2n) com proposito de alcançar a progênie de 100% de fêmeas (F1).

Coleta e fertilização dos gametas

Após a indução hormonal, foram coletados aproximadamente 250 µl de sêmen de cada um dos 8 pseudo-machos e 2 machos controle. As amostras foram diluídas em 500 µl de solução de Ringer (7,5g NaCl, 0,2g KCl, 0,2g $CaCl_2$, 0,2g $MgCl_2$ and 0,2g $NaHCO_3$). Esta solução de sais é capaz de manter a integridade do sêmen da espécie logo após a sua coleta, servindo como um meio eficaz de estocagem do material, uma vez que a motilidade espermática não é ativada e as células permanecem funcionais. Obteve-se também a desova de duas fêmeas, cada uma dividida em 5 placas de Petri contendo 70 µl de ovócitos em cada placa, onde foi feita a fertilização. Foram coletados 10 µl de sêmen de cada um dos 10 peixes (8 pseudo-machos e 2 controle) para fertilização dos ovócitos. Após a adição do sêmen aos ovócitos, foi inserido 5 mL de água na placa de Petri, para ativação da motilidade espermática e consequentemente, a fertilização.

Cultivo dos peixes após a eclosão

Após uma média de 15 horas de incubação, as larvas eclodidas foram separadas em alíquotas homogêneas e mantidas em 10 recipientes plásticos de 5 litros, devidamente etiquetados com a identificação dos paternais, e colocados dentro de uma incubadora B.O.D.

com temperatura controlada de 26°C durante o período de um mês, com o propósito de não sofrerem interferência da temperatura externa, que poderia causar alterações na proporção sexual da progênie. Após um mês na B.O.D., os peixes foram transferidos para aquários de 60 litros também etiquetados identificando os paternais.

7. Resultados

Incubação das larvas em sistema de temperatura controlada e biometria

Esta é uma etapa do projeto na qual se obteve maior parte dos resultados prévios. Durante esta etapa foi possível estabelecer a faixa ideal de temperatura para o crescimento das larvas, sobrevivência e qual faixa apresentou maior número de possíveis pseudo-machos (machos fenotípicos).

Como apresentado na Fig. 2, foi possível constatar que no dia 0 não houve diferença de tamanho entre todos os tratamentos; contudo, obteve-se como melhor crescimento, no tratamento controle de 25°C, como também apresentado na Fig. 3 ao final do período amostral, seguido dos tratamentos de 34°C, 35°C e 36°C. Conclui-se que entre essas temperaturas, a faixa ideal de crescimento para o *Astyanax altiparanae* foi de 25°C e 34°C, resultados satisfatórios para a espécie e que permitem sua utilização em laboratório.

Índices de sobrevivência

No tocante à sobrevivência, o tratamento que obteve um melhor resultado foi o de 34°C, como apresentado na Figura 4, seguido dos tratamentos de 25°C, 35°C e 36°C. Ao final do período experimental, as larvas incubadas a 36°C apresentaram resultados inferiores quando comparados aos demais tratamentos. A partir do décimo dia de incubação, a

sobrevivência decresceu consideravelmente, ficando inferior a 50% ao final dos 25 dias de incubação.

Proporção sexual

Apesar dos tratamentos de 25°C apresentarem melhor crescimento, e o de 34°C apresentar melhor sobrevivência, constatou-se que a faixa ideal de temperatura para a masculinização foi a de 35°C, pois como pode-se observar na Fig. 5, o tratamento de 35°C (repetição 2), foi o que melhor apresentou possíveis pseudo-machos (machos XX).

Índices de fertilização

Conforme apresentado na Fig. 6, foi possível destacar que a primeira fêmea apresentou os melhores índices de fertilização, com quase 100% das alíquotas fertilizadas entre os tratamentos. A desova proveniente da segunda (Fig. 7) fêmea também apresentou índices satisfatórios de fertilização (>50%), mesmo sendo inferiores em relação a desova da primeira fêmea. A desova fertilizada no grupo controle apresentou índice de fertilização de 73,53% e os quatro peixes submetidos à masculinização apresentaram índices de fertilização de 75,28%, 92,77%, 66,94% e 81,01%, respectivamente.

Análise do sexo das progênies

Na última etapa do trabalho, foi realizada a sexagem das progênies provenientes dos parentais que foram submetidos a faixa de incubação de 35°C (Fig. 8). A análise do sexo de cada indivíduo foi realizada seguindo padrões morfológicos da espécie (fêmeas com nadadeira anal lisa, sem espículas e machos com nadadeira anal com espículas, evidentes ao tato). O percentual de fêmeas verificado entre as progênies de cada peixe foi baixo (<50% nos sete cruzamentos). Ao observar a Fig. 8, nota-se também, a ausência das progênies dos

tratamentos controles, e do peixe 8 submetido à masculinização. Isso se dá pelo fato de perda de uma quantidade significativa dessas progênies durante o período de maturação sexual, mesmo assim tais perdas não comprometem os dados finais, pois os resultados das progênies não estavam relacionados a proporção sexual do controle.

8. Discussão

Os resultados preliminares desta pesquisa evidenciam um intervalo ideal de limites de faixas de temperatura de incubação das larvas de *Astyanax altiparanae* para indução fenotípica da reversão sexual, correlacionando os dados com os índices de sobrevivência obtidos em cada tratamento.

Estabelecer estes limites de temperatura de incubação é uma etapa imprescindível para o presente trabalho, tendo em vista que o protocolo de masculinização só será bem sucedido se, além de efetivamente promover a indução de machos fenotípico, não ser agressivo a ponto de comprometer drasticamente a sobrevivência da população submetida ao tratamento.

As faixas de temperatura mais eficazes no processo de indução à reversão sexual em peixes, podem ser muito variáveis de acordo com a espécie e com o estágio de desenvolvimento embrionário ou larval com a qual se pretende estabelecer o protocolo. No presente estudo, os animais foram submetidos aos tratamentos de temperatura durante o estágio pós-larval, com tempo de duração de 25 dias de exposição. No entanto, Zanardi (2008) destaca que o efeito masculinizante por exposição à altas temperaturas de incubação (> 34-35°C) pode ser realmente eficaz para espécies de tilápia do Nilo somente quando os animais são expostos por períodos mais prolongados de tempo, o que evidencia que os padrões de determinação sexual, faixa de temperatura e estágio do desenvolvimento são aspectos bem correlacionados e altamente variáveis entre as espécies.

Para a espécie estudada nesta pesquisa, a confirmação da eficácia do processo de reversão e produção de machos fenotípicos será obtida nas etapas posteriores, com as análises das progênies oriundas dos cruzamentos dos paternais submetidos aos tratamentos.

Koumoundouros *et al.* (2002) testaram a eficácia do processo de masculinização, considerando diferentes etapas que influenciam este processo na espécie *Dicentrarchus labrax:* a temperatura crítica de determinação sexual fenotípica durante os diferentes estágios de desenvolvimento e a correlação da determinação do sexo intrapopulacional com a taxa de crescimento até ao fim do período de exposição à temperatura de reversão. Os autores constataram que durante os estágios embrionário e larval, os diferentes grupos experimentais apresentaram taxas semelhantes de sobrevivência (37-47%, P> 0,05). Durante o período experimental seguinte, a taxa de sobrevivência foi alta para todos os grupos (92-96%), assim como pôde ser observado no presente estudo para a espécie *Astyanax altiparanae,* para as faixas de temperatura de 25°C e 34°C.

Correlacionando as informações de sobrevivência das amostras submetidas a cada tratamento, torna-se possível chegar a uma conclusão concreta de qual protocolo será mais eficaz posteriormente para implementação das técnicas de conservação, tendo em vista que não basta um relativo sucesso na indução de machos fenotípicos se grande parte da população submetida ao processo é perdida devido à agressividade do tratamento.

Outro parâmetro importante que deve ser levado em consideração nesta fase da pesquisa é o desenvolvimento e crescimento das amostras durante o período em que estão expostas aos tratamentos com temperatura. Conforme foi discutido no presente relatório, as larvas submetidas aos tratamentos com 25°C e 34°C apresentaram os melhores índices de crescimento ao longo dos 25 dias de tratamento. No entanto, a etapa seguinte desta pesquisa esclareceu que os mesmos não foram eficazes no processo de reversão.

Pavlidis *et al.* (2000) estabeleceram uma correlação satisfatória entre o crescimento e masculinização na espécie *Dicentrarchus labrax*, uma espécie de águas frias. Os autores relatam que, à uma faixa de temperatura de incubação do desenvolvimento larval de 13°C a 15°C, as amostras apresentaram índices de sobrevivência e crescimento satisfatórios, parâmetros que possibilitam estabelecer um intervalo ideal de temperatura de incubação para a espécie.

A masculinização por altas temperaturas é uma característica relatada para a maioria dos teleósteos por vários autores, sendo classificados como termossensíveis, que expressam uma tendência clara de indução de exemplares machos sob altas temperaturas de incubação (BAROILLER, *et al.*, 1999; STUSSMANN, *et al.*, 1997).

No presente estudo, o protocolo de indução de fêmeas com genótipo de machos na faixa de temperatura de incubação de 35°C não se mostrou eficaz, uma vez que o percentual de fêmeas fenotípicas encontradas em cada cruzamento foi muito baixo. Neste caso, um novo intervalo de faixas de temperatura poderia ser empregado com a finalidade de padronizar um protocolo eficaz neste sentido, tendo como base o levantamento realizado no presente estudo, que traz informações detalhadas sobre a sobrevivência e fertilização das progênies de animais submetidos a estes tratamentos, norteando a padronização de tratamentos mais eficazes de indução.

9. Agradecimentos

O autor expressa seus agradecimentos a unidade ICMBio/CEPTA em Pirassununga – SP, ao CNPq pela bolsa de auxílio a pesquisa PIBIC, ao meu orientador Dr. José Augusto Senhorini por me dar apoio e suporte sempre que precisei, ao Dr. George Shigueki Yasui, Msc. Matheus Pereira dos Santos e Msc. Nivaldo Ferreira do Nascimento pelas contribuições fundamentais a essa pesquisa e também aos amigos do laboratório.

10. Figuras

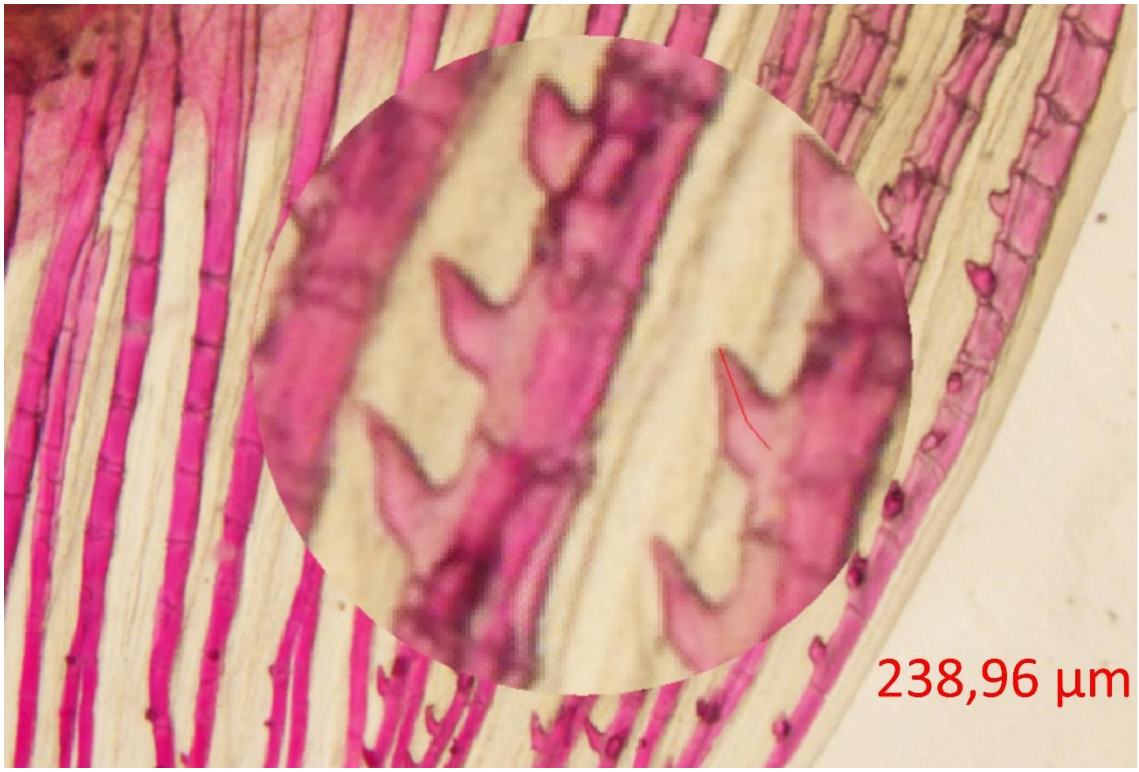

Figura 1 - Espículas na nadadeira anal de um macho da espécie *Astyanax altiparanae*: método de identificação do sexo através de características sexuais secundárias (PIVA, a publicar).

.

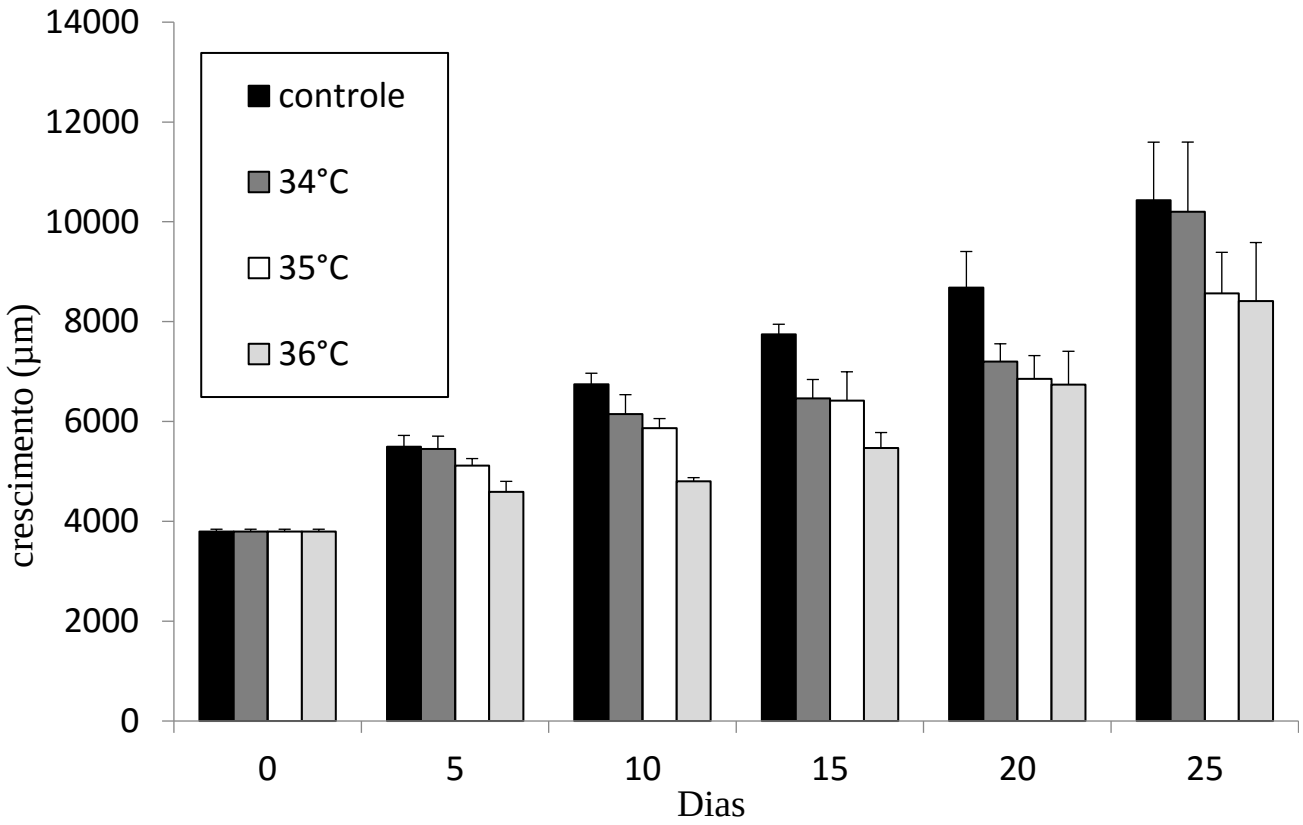

Figura 2 - Índice de crescimento das larvas de *Astyanax altiparanae* incubadas sob as temperaturas de 25°C, 34°C, 35°C e 36°C.

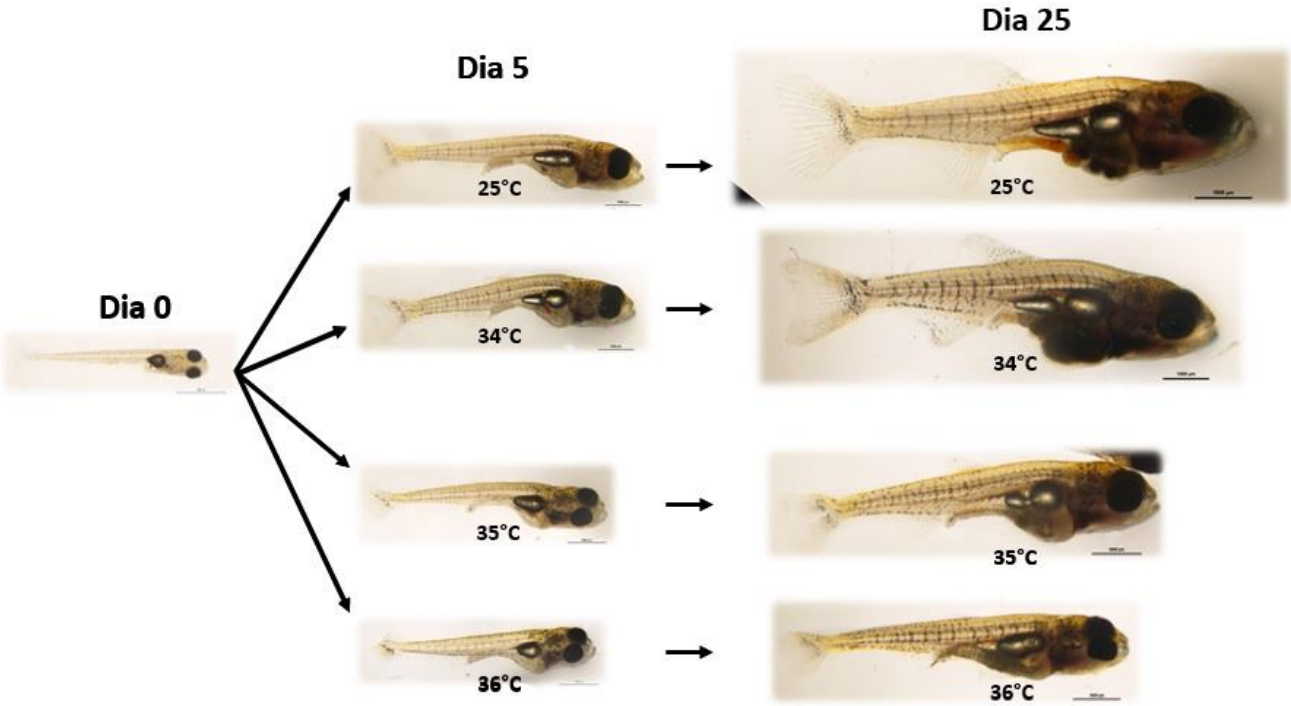

Figura 3 - Crescimento das larvas de *Astyanax altiparanae* no decorrer do período de 25 dias de incubação sob as temperaturas de 25°C, 34°C, 35°C e 36°C.

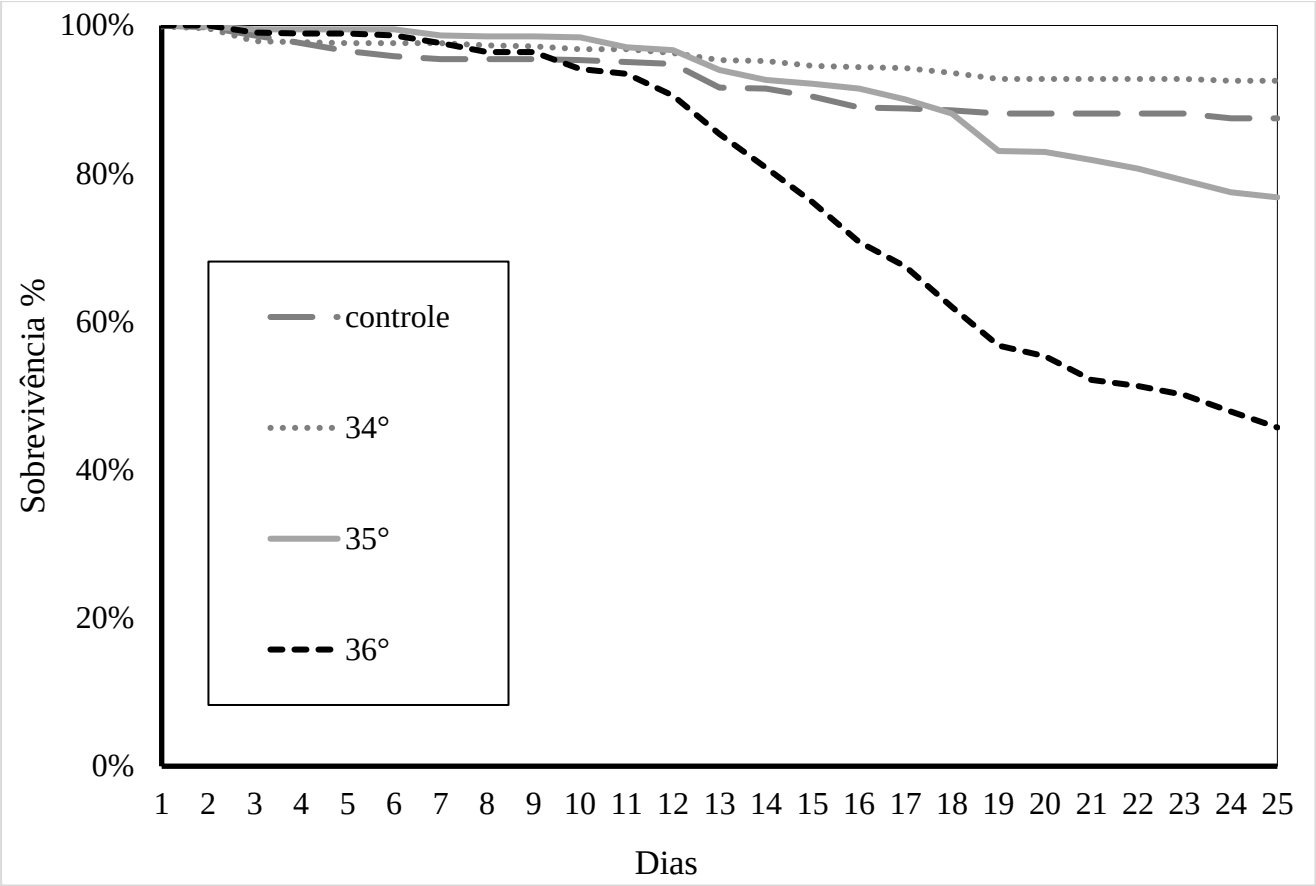

Figura 4 - Índice de sobrevivência entre as larvas de *Astyanax altiparanae* submetidas aos tratamentos de incubação sob as temperaturas de 25°C, 34°C, 35°C e 36°C.

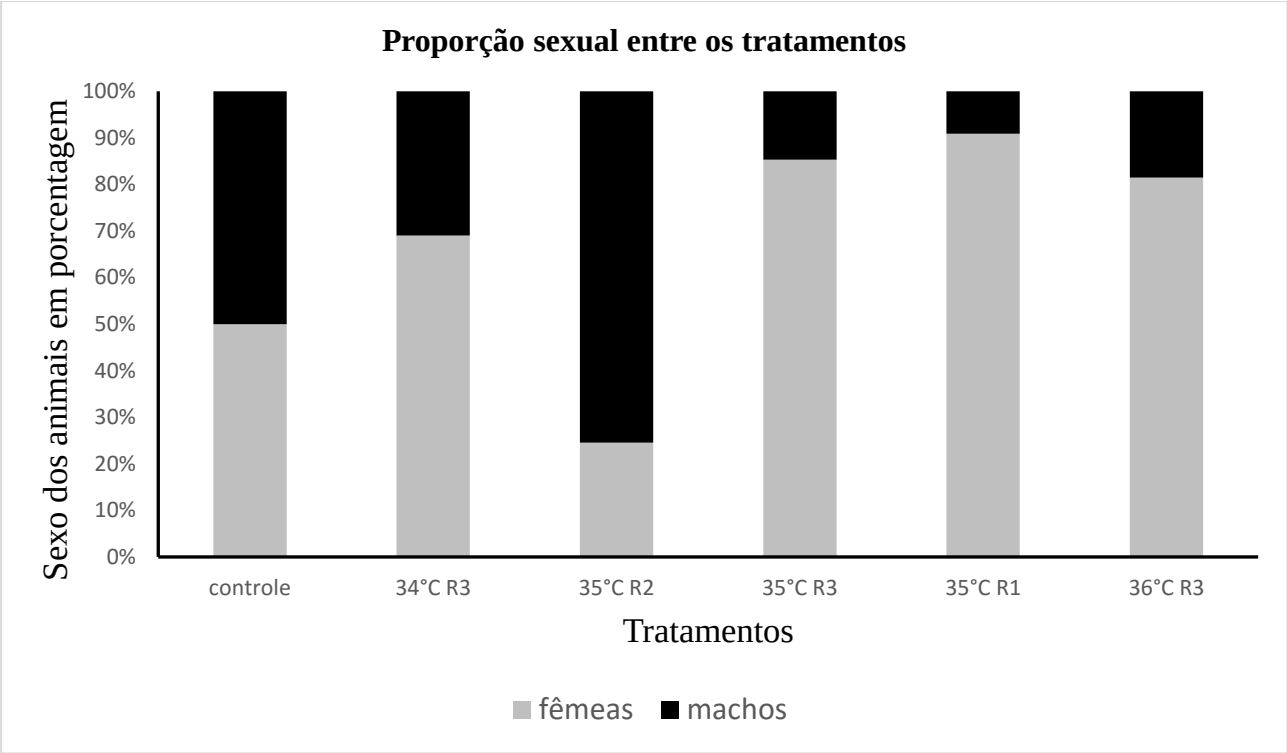

Figura 5 - Proporção sexual verificada entre as larvas de cada repetição (R1, R2, R3) submetidas aos tratamentos de incubação sob as temperaturas de 25°C, 34°C, 35°C e 36°C

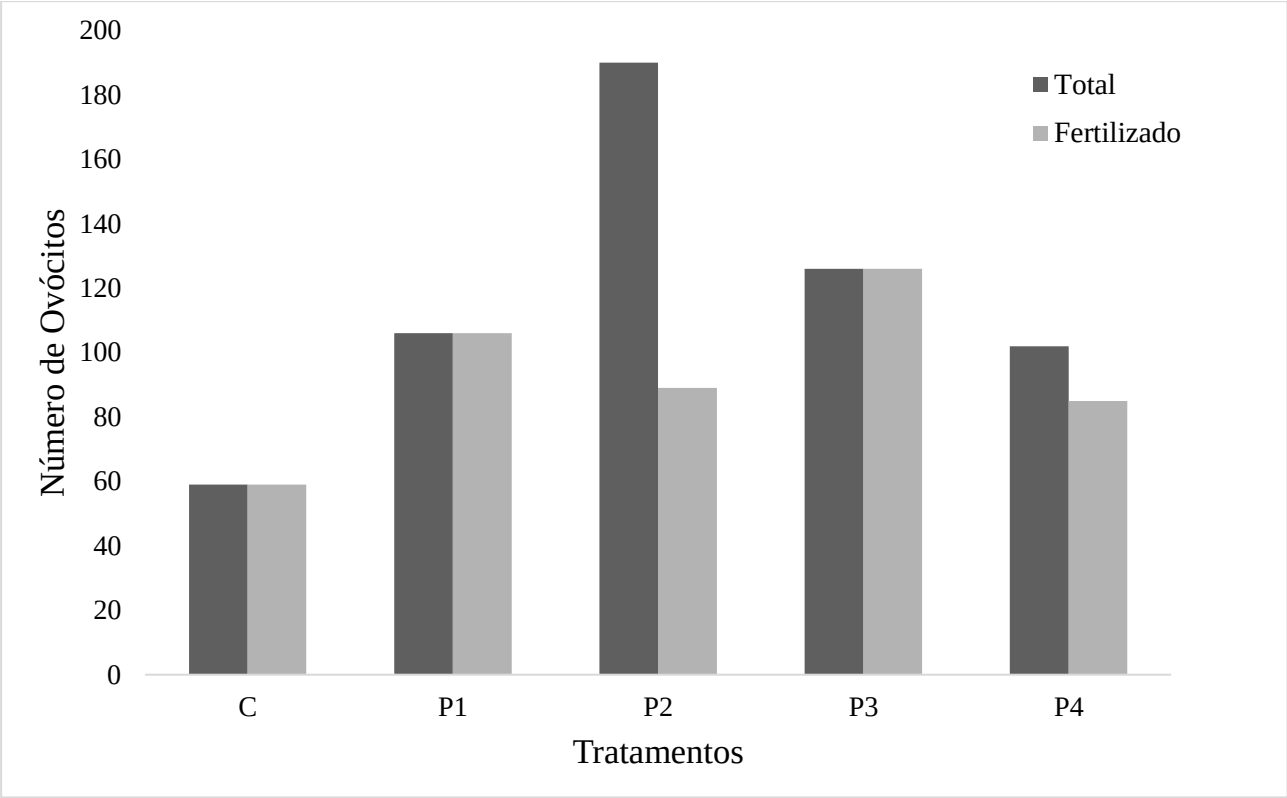

Figura 6 – Índice de fertilização da fêmea 1. Ovócitos fertilizados pelo sêmen de um macho controle e machos masculinizados da segunda repetição (35°C).

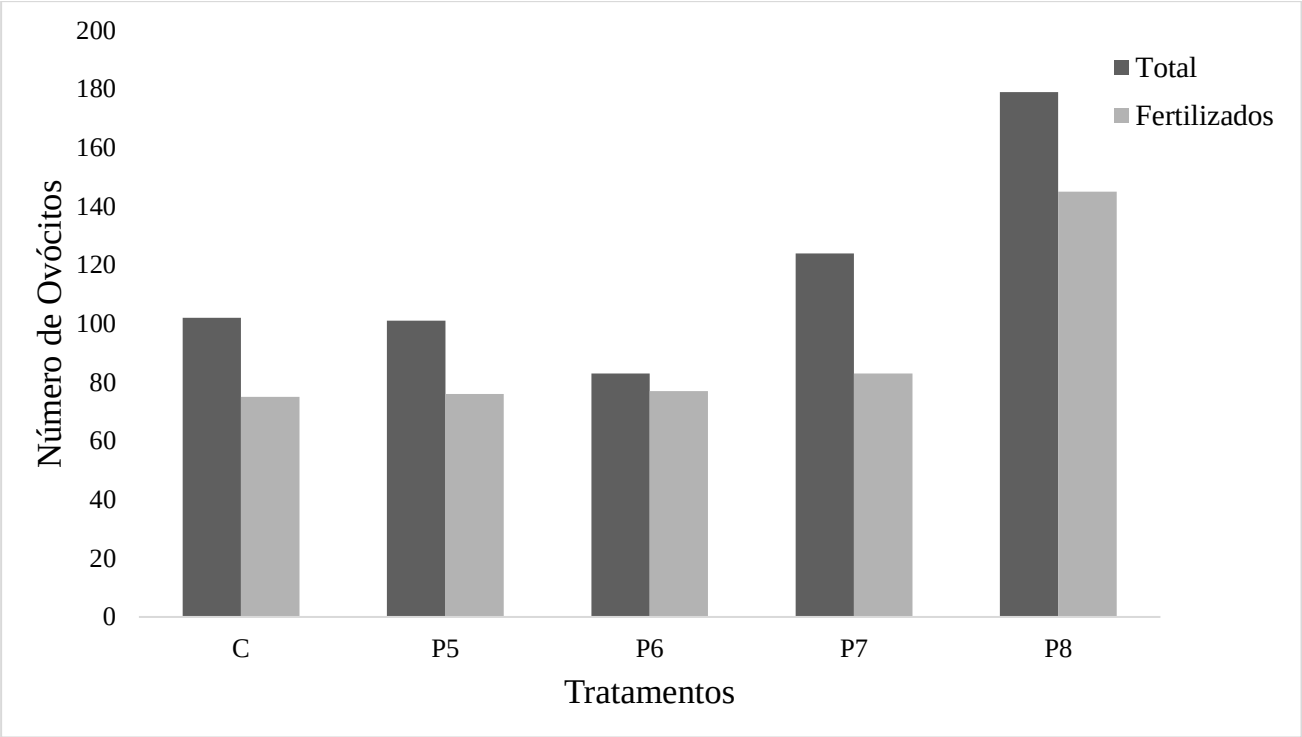

Figura 7 – Índice de fertilização da fêmea 2. Ovócitos fertilizados pelo sêmen de um macho controle e machos masculinizados da segunda repetição (35°C).

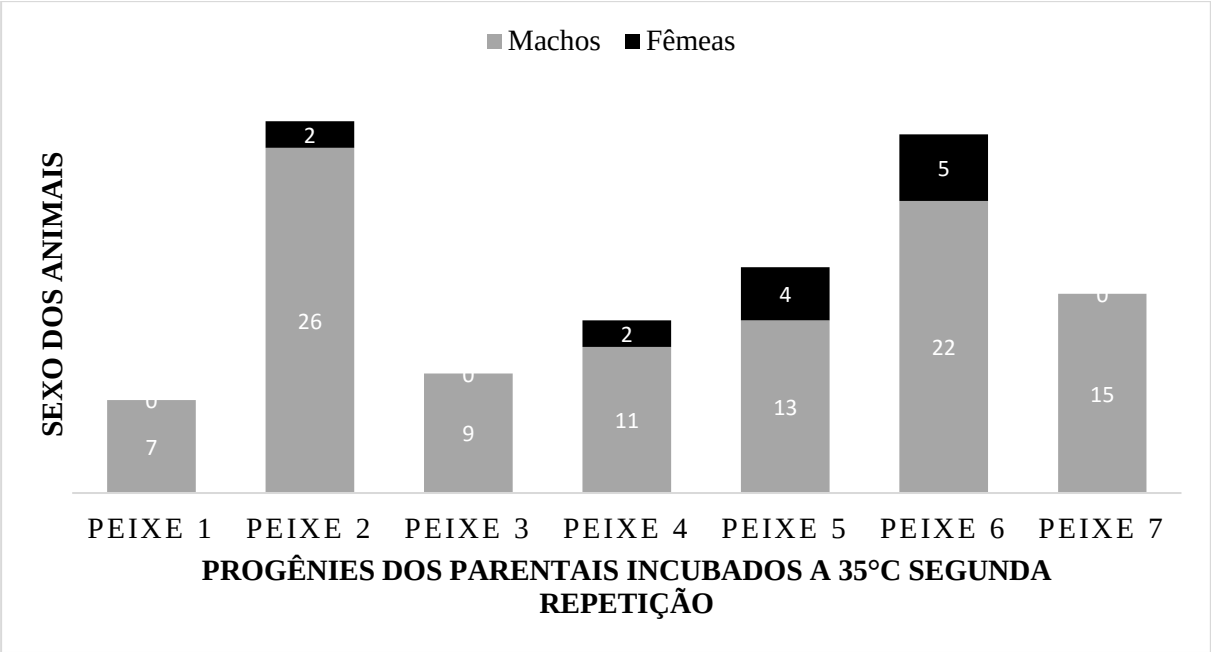

Figura 8 – - Proporção sexual verificada entre as larvas de cada parental (Peixe 1, P2, P3, P4, P5, P6, P7).

11. Referências Bibliográficas

AIDA, T. **Sex reversal in Aplocheilus latipes and a new explanation of sex determination**. Genetics 21: 136–153. 1936.

BAROILLER JF, GUIGUEN, Y, FOSTIER, A. **Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish.** Cell Mol Life Sci 55:910–931. 1999.

BAROILLER JF, GUIGUEN, Y, FOSTIER, A. **Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish.** Cell Mol Life Sci 55:910–931. 1999.

CONOVER, D.O**. Temperature-dependent sex determination in fishes.** In "Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates" Ed by N Valenzuela, VA Lance, Smithsonian Books, Washington, pp 11–20. 2004.

GUERRERO, R. D., SHELTON, W. L. **An acetocarmine squash method for sexing juvenile fishes.** *Progressive Fish Culturist.* **36:** 56. 1974.

KOUMOUNDOUROS, G., DIVANACH, P., ANEZAKI, L., KOKKARI, C., STERIOTI, A., DIVANACH, P. & KENTOURI, M. **Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenetic phase.** Journal of Experimental Zoology 292, 573—579. 2002.

MYLONAS, C. C.; ANEZAKI, L.; DIVANACH, P.; ZANUY, S.; PIFERRER, F.; RON, B.; PEDUEL, A.; ATIA, I. B.; GORSHKOV, S.; TANDLER, A. **Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*.** The Fisheries Society of the British Isles. Journal of Fish Biology, 67, 652-668. 2005.

NASCIMENTO, N. F. **Triploidização em *Astyanax altipranae.* Dissertação de mestrado (Centro de Aquicultura da UNESP), Jaboticabal, 2015.**

PAVLIDIS, M.; KOUMOUNDORUS, G.; STERIOTI, A.; SOMARAKIS, S.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. **Evidence of Temperature-Dependent Sex Determination in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.).** Journal of Experimental Zoology 287:225–232. 2000.

PEREIRA-SANTOS. **Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae*.** Dissertação de mestrado (Centro de Aquicultura da UNESP), Jaboticabal. 2014.

SAILLANT, E., FOSTIER, A., HAFFRAY, P., MENU, B., THIMONIER, J. & CHATAIN, B. **Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass**. Zoology 292, 494—505. 2002.

SATO, T.; ENDO, T.; YAMAHIRA, K.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. **Induction of female-to-male sex reversal by high temperature treatment in medaka*, Oryzias latipes.*** Zoological Science, 22: 985-988. 2005.

STRÜSSMANN CA, SAITO T, USUI M, YAMADA H, TAKASHIMA F. **Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two Atherinid fishes. *Odontesthes bonariensis* and *Patagonia hatcheri*.** J Exp Zool 278:167–177. 1997.

STRUSSMANN, C. A. & NAKAMURA, M. **Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes.** Fish Physiology and Biochemistry 26, 13—29. 2002.

YAMAMOTO, E. **Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame*, Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel).** Aquaculture 173: 235–246. 1999.

YASUI, G.S. ; SANTOS, M. P. ; NAKAGHI, L. S. O. ; SENHORINI, J. A. ; ARIAS-RODRIGUEZ, L. ; FUJIMOTO, T. ; SHIMODA, E. ; SILVA, L. A. . **Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish.** Animal (Cambridge. Print), p. 1-7, 2014.

ZANARDI, M. F. **Comparação entre métodos de reversão sexual de tilápias do nilo (*Oreo chromisniloticus*), variedade Chitralada**. Revista acadêmica ciências agrárias e ambientais, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 4647, 2008.