**IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES DIPLOIDES, TRIPLOIDES E TETRAPLOIDES DE LAMBARI *ASTYANAX LACUSTRIS* (LÜTKEN*,* 1875) POR ESFREGAÇO SANGUÍNEO UTILIZANDO SOFTWARE IMAGEJ®**

**CONCEIÇÃO, A. B.1; SILVA, G. S.2; SILVA, J. T. S3; GOMES, J. S4; YASUI, G.S5; NASCIMENTO, N. F6**

1anderson.conceicao@ufrpe.br, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), graduando em Engenharia de Pesca. 2gilmara.uast@gmail.com, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), graduanda em Engenharia de Pesca. 3jamirestahissouza@gmail.com, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), graduanda em Engenharia de Pesca. 4jayslangomes19@gmail.com, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), graduando em Engenharia de Pesca.

5yasui@usp.br, Universidade de São Paulo (USP), PhD em Marine Life Science.

6nivaldo.nascimento@ufrpe.br, (UFRPE/UAST), Doutor em Aquicultura e Biologia aquática

# Resumo

A produção de peixes triploides e tetraploides tem grande potencial de alavancar a piscicultura nacional. Após a indução de tais animais, é necessário a confirmação do resultado e dentre as técnicas empregadas, o esfregaço sanguíneo se destaca pela facilidade e baixo custo. No entanto, o processo de medir as células/ núcleos é trabalhoso demandando muito tempo. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o esfregaço sanguíneo para identificar peixes diploides, triploides e tetraploides de *Astyanax lacustris* utilizando o software livre imageJ®. Peixes diploides e tetraploides foram obtidos utilizando choque de temperatura (40°C; 2 minutos) com dois minutos e 26 minutos pós-fertilização, respectivamente. Com oito meses de idade, esfregaço sanguíneo dos animais foram confeccionados e as imagens obtidas foram analisadas no imageJ®. Os resultados mostraram que o uso do software foi eficiente, garantindo a medição automática de centenas de núcleos em poucos segundos. Peixes triploides e tetraploides apresentaram núcleo com área, perímetro, eixo maior e eixo menor significativamente maior do que os diploides (*P* < 0,05). Já o eixo maior foi o único parâmetro separou triploides e tetraploides (*P* = 0,0000). Estes resultados são interessantes, abrindo novas possibilidades para identificação de peixes poliploides como *A. lacustris* e outras espécies nativas.

**Palavras–chave:** Biotecnologia, manipulação cromossômica, poliploides.

# INTRODUÇÃO

A piscicultura nacional vem apresentando um crescimento contínuo ao longo das últimas décadas. Em 2021, a produção atingiu 841.005 mil toneladas, o que representa um aumento de 4,7% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2022). No entanto, o potencial de produção do Brasil ainda é imenso e as instituições de pesquisa tem um importante papel neste processo, pois através delas é possível melhorar a qualidade genética dos animais produzidos, propiciando maior resistência a doenças, crescimento, qualidade da carne, etc.

Neste aspecto, o emprego da Biotecnologia aplicada, como a manipulação cromossômica, é um passo imprescindível para alcançar esses objetivos e suprir a crescente demanda. Em especial, vale citar a produção de peixes triploides. Como apresentam três conjuntos de cromossomos, tais animais geralmente são estéreis, o que propicia várias vantagens como maior crescimento, qualidade da carne, redução na agressividade e menor risco de impactos ambientais quando escapes ocorrem no ambiente (PIFERRER et al., 2009). Para indução de peixes triploides, são geralmente aplicados choques de temperatura, químico ou de pressão com o objetivo de inibir a liberação do segundo corpúsculo polar. No entanto, os protocolos nem sempre são 100% eficazes e muitas vezes ocorre queda na sobrevivência.

Como alternativa, uma estratégia interessante é utilizar peixes tetraploides, indivíduos que possuem quatro conjuntos de cromossomos (NASCIMENTO et al., 2020). Assim, caso produzam gametas diploides, tetraploides podem ser utilizados para produção em massa de triploides (NASCIMENTO et al., 2020). Tais animais também são induzidos utilizado choques de temperatura, químico ou pressão (PIFERRER et al., 2009). No entanto, o objetivo agora é inibir a primeira divisão celular ou clivagem, gerando zigotos com quatro conjunto de cromossomos (DUNHAM, 2004)

Após a indução, é necessário a identificação dos peixes poliploides e várias técnicas podem ser empregadas, como esfregaço sanguíneo, citogenética e citometria de fluxo (PIFERRER et al., 2009). Destas, o esfregaço apresenta vantagens como facilidade e baixo custo. Como animais triploides ou tetraploides apresentam núcleos maiores (devido a maior quantidade de DNA) basta medi-los para separar as diferentes ploidias (DUNHAM, 2004). No entanto, uma desvantagem do esfregaço sanguíneo é grande tempo dispensado nas medidas dos eritrócitos, assim, ferramentas que facilitam esse processo são necessárias.

Dentre os peixes mais utilizados para produção de poliploides está o lambari (*Astyanax lacustris*) também conhecido como piaba, uma espécie que vem ganhando destaque em biologia básica e aplicada, além de ter grande potencial para aquicultura, seja seu uso em petisco ou isca-viva (YASUI et al., 2020). Nesta espécie, choque de temperatura foi utilizado para induzir peixes triploides (ADAMOV et al., 2017), sendo depois observado que as fêmeas são estéreis e apresentam maior rendimento de carcaça (NASCIMENTO et al., 2017). Tetraploides também foram obtidos, os quais foram capazes de produzir gametas diploides e originar lotes 100% triploides (NASCIMENTO et al., 2020).

Portanto, este trabalho teve como objetivo utilizar o esfregaço sanguíneo e o software imageJ ® como melhor alternativa para medição automática dos núcleos e identificação de peixes diploides, triploides e tetraploides de lambari (*A. lacustris*).

# MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), Pirassununga, São Paulo. Os procedimentos foram executados após aprovação do comitê de ética (CEUA// CEPTA#0231.000070/2018-63). Os peixes poliploides foram induzidos de acordo com Adamov et al (2017) e Nascimento et al (2020). Brevemente, triploides e tetraploides foram obtidos utilizando choque de temperatura (40°C; 2 minutos) com dois minutos e 26 minutos pós-fertilização, respectivamente. Foram utilizados 10 peixes diploides, 10 peixes triploides e 3 peixes tetraploides com oito meses de idade. Para coleta de sangue, os animais foram anestesiados em solução de Eugenol (1 g.L-1) e o sangue coletado da região caudal com o auxílio de uma seringa (1 mL) contendo uma gota de EDTA (5%). Posteriormente, esfregaços sanguíneos foram confeccionados, corados com o Kit PANÓTIPO (apenas para coloração dos núcleos) e observados em microscópio óptico (Nikon, Japão) em aumento de 400x. Figuras foram então obtidas e analisadas no software imageJ ® (National Institutes of Health, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/). Após a padronização das variáveis medição, praticamente todos os núcleos de cada imagem foram mensurados. Foram medidos a área, perímetro, eixo maior e eixo menor. Para confirmar os resultados de ploidia, uma amostra de nadadeira de cada animal foi analisada em citometria de fluxo utilizado o corante fluorescente DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) e analisado em citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer,Partec, GMBh, Alemanha). Portanto, somente peixes confirmados como diploides, triploides e tetraploides foram utilizados. Ao final, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (5%). O software STATISTICA (v. 10, StatSoft) foi utilizado.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

#  O uso do imageJ ® para medição automática dos núcleos dos eritrócitos foi eficiente, garantindo um grande número de dados em pouco tempo. Os resultados mostraram que os eritrócitos de peixes triploides e tetraplodies de *A. lacustris* apresentaram núcleo com área perímetro, eixo maior e eixo menor, significativamente maior do que os diploides (Tabela 1; P < 0,05). O eixo maior foi o único parâmetro que apresentou diferença entre triploides e tetraploides (*P* = 0,0000). Peixes poliploides apresentam células e núcleos maiores e vários autores (FUKUSHIMA et al., 2012) já utilizaram essa técnica para identificar tais animais (PIFERRER et al., 2009). No entanto, como a maioria dos estudos utiliza-se análise manual, a qual é trabalhosa e demanda muito tempo, o método utilizado neste trabalho foi eficiente, permitindo medir centenas de núcleos em poucos segundos.

**Tabela 1.** Medidas nucleares dos eritrócitos de peixes diploides, triploides e tetraploides de *Astyanax lacustres.*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Parâmetro** |  **2n** |  **3n** |  **4n** | **Incremento** **3n (%)** |  **Incremento** **4n (%)** |
| **Area (µm²)** | 16,15 ± 0,89a | 20,84 ± 0.83b | 23,82 ± 0.09b | 29,04 | 47,49 |
| **Perímetro (µm)** | 15,46 ± 0,39a | 17,95 ± 0.37b | 19,41 ± 0.57b | 16,10 | 25,55 |
| **Eixo maior (µm)** | 5,42 ± 0,13a | 6,29 ± 0,10b | 7,71 ± 0.03c | 16,05 | 42,25 |
| **Eixo menor (µm)** | 3,78 ± 0,12a | 4,2 ± 0,11b | 3.95 ± 0.01b | 9,89 | 4,49 |

 Dados são mostrados como média ± erro padrão. Letras distintas indicam diferença significativa nas colunas (ANOVA; *P* < 0.05).

# CONCLUSÕES

O uso do esfregaço sanguíneo juntamente com a medição automática no imageJ ® foram as melhores técnicas para melhor identificar peixes diploides, triploides e tetraploides de lambari (*Astyanax lacustres)*.

# REFERÊNCIAS

ADAMOV, N. S. et al. Triploid induction in the Yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*, using temperature shock: tools for conservation and aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society, v. 48, n. 5, p. 741-750, 2017. ISSN 0893-8849.

DUNHAM, R. A. Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches. Oxford: GABI Publishing, 2004.

FUKUSHIMA, et al. Triploidy in the hematology of jundia juveniles (Siluriformes: Heptapteridae). Brazilian Journal of Biology 72, 147-151, 2012.

NASCIMENTO, N. F. et al.; Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. Aquaculture, v. 471, p. 163-171, 2017. ISSN 0044-8486.

NASCIMENTO, N. F. et al. High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock: The first case in Neotropical characins. Aquaculture, v. 520, 2020.

PIFERRER, F. et al. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture, v. 293, n. 3-4, p. 125-156, Aug 16 2009.

YASUI, G. S. et al. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Espécies nativas para piscicultura no Brasil, v. 3, p. 101–116, 2020.