

## ANDROGÊNESE: TÉCNICAS E SUAS PRINCIPAIS APLICAÇÕES

Aline de Assis LAGO<sup>1</sup>; Rilke Tadeu Fonseca de FREITAS<sup>2\*</sup>

### RESUMO

Os peixes oferecem vantagens técnicas em relação aos demais vertebrados por apresentarem um sistema biológico menos especializado, permitindo certas manipulações que são impraticáveis em outros. Algumas das facilidades são: fecundação externa, alta fecundidade e diferenciação sexual controlável. Desta forma o desenvolvimento de novas tecnologias com o domínio da técnica de androgênese possibilita sua aplicação na conservação de espécies ameaçadas de extinção, revitalização e no melhoramento genéticos de espécies de interesse econômico e ambiental.

**Palavras-chave:** conservação de germoplasma; manipulação gamética; efeito materno; reprodução; biotecnologia

### ANDROGENESIS: TECHNICAL AND MAIN APPLICATIONS

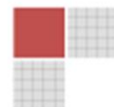
#### ABSTRACT

Fish offer technical advantages compared to other vertebrates because they have a less specialized biological system, allowing certain manipulations that are impractical in others. Some facilities are: external fertilization, high fertility and controllable sexual differentiation. Thus the development of new technologies in the field of androgenesis technique enables its application in conservation of endangered species, revitalization and genetic improvement of species of economic and environmental interests.

**Keywords:** germplasm conservation; gametic manipulation; maternal effect; reproduction; biotechnology

## 1 INTRODUÇÃO

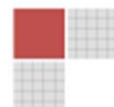
Atualmente a aquicultura encontra-se em fase de grande crescimento e desenvolvimento em todo mundo e o Brasil destaca-se devido às suas condições climáticas, geográficas e sua diversidade, demonstrando grande potencial. Porém, devido à construção de barragens hidroelétricas, desmatamento, poluição, destruição das lagoas marginais e a



pesca predatória, os estoques naturais de peixes vêm diminuindo, entre estes estão incluídos peixes ameaçados de extinção. Nesse quadro de degradação ambiental, a fauna ictiológica é rapidamente atingida. Especialistas em aqüicultura enfatizam a importância dessas espécies na pesca profissional, e a necessidade de serem criados mecanismos para a preservação em seu ambiente natural e seu cultivo em cativeiro. Entretanto, a falta de mão-de-obra especializada e tecnologia prejudicam seu cultivo. Tanto em espécies migratórias como em espécies de ambiente lântico, que não realizam a piracema, as perdas na larvicultura ainda são expressivas.

As empresas hidroelétricas, por mais que se esforcem em qualificar suas equipes, não conseguem aumentar as taxas de sobrevivência nos períodos iniciais de vida dos peixes, ameaçando a sobrevivência de algumas espécies. Para evitar esse fato, emprega-se a técnica de criopreservação de sêmen, que permite preservar o material genético da espécie por vários anos, inclusive com espécies ameaçadas de extinção. Protocolos para criopreservação de sêmen de espécies nativas foram estudadas e avaliadas com sucesso. No entanto a preservação criogênica de ovócitos e embriões permanece inviável. A androgênese é capaz de sanar tal limitação, pois é uma técnica que permite o desenvolvimento do embrião contendo apenas informação genética do pai, uma vez que, o material genético da mãe é inativado por meio de irradiação ultravioleta. Assim, é possível conservar uma espécie em extinção tendo somente seu sêmen criopreservado e multiplica-la fertilizando ovócitos, com o DNA nucleolar inativado, doados por outras espécies filogeneticamente próximas que ainda estão disponíveis na natureza.

Sabe-se que a célula animal possui dois tipos de DNA. O DNA nucleolar, proveniente da permuta genética entre os pais e o DNA mitocondrial, uma herança exclusivamente materna, salvo raras exceções, e não é destruído pelos raios UV. Diversos estudos mostram que o desempenho e características fenotípicas de indivíduos provenientes de cruzamentos recíprocos interespecíficos foram diferentes. Além de vários outros fatores, esse DNA mitocondrial poderia ser o responsável pela divergência entre indivíduos provenientes de cruzamentos recíprocos interespecíficos.



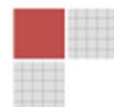
Neste contexto a técnica de Androgênese pode, também, ser uma ferramenta importante no estudo da contribuição das informações genéticas presentes no citoplasma do ovócito sobre a variação fenótipicas nas progênes produzidas, uma vez que torna possível isolar o efeito citoplasmático, comparando-se progênes normais (material genético nucleolar oriundo de ambos os pais) com progênes androgenéticas (material genético nucleolar procedente somente do pai).

## 2.1 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

O acesso ao patrimônio genético das espécies vem se tornando uma iniciativa preponderante no que e refere ao reconhecimento e preservação da diversidade biológica, à identificação de genomas com potencialidades de agregação de valor comercial aos estoques, bem como à conservação de espécies ameaçadas de extinção.

De acordo com Perez (2008) um total de 34 projetos genoma vinham sendo desenvolvidos no Brasil, com as mais variadas categorias de organismos: vírus, bactérias, fungos, plantas e animais. Tendo em vista tal panorama, acerca do reconhecimento do genoma das espécies, é sabido que num futuro em médio e longo prazos, tornar-se-ão potências aquelas nações que, ao longo da sua evolução ou revolução socioeconômica, destinaram a devida atenção a identificação, ao entendimento das inter-relações bem como a preservação de seus recursos biológicos (TORRES, 2003).

Atualmente existem diversos tipos de Bancos de Germoplasma (Bancos de Sementes, Bancos de Campo, Bancos *in vitro*, Bancos *in situ*, etc.) usados principalmente para espécies vegetais. Em relação a peixes, há dois exemplos mais comuns de Bancos de gens, um é preservação do próprio habitat de origem da espécie que se deseja conservar ou “Banco *in situ*”, outro exemplo é a criopreservação de gametas ou “Banco *in vitro*”, sendo que as duas maneiras de conservação apresentam problemas crônicos. Devido da grande demanda por energia e do descontrole da poluição, o crescimento e desenvolvimento da sociedade é uma grande ameaça aos locais de origens das espécies de peixes principalmente



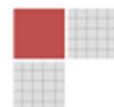
nativas, já as técnicas de criopreservação, apesar de bastantes avançadas para os gametas masculinos, ainda não estão dominadas para conservação de óvulos ou embriões de peixes.

## 2.2. CRIOPRESERVAÇÃO E RESFRIAMENTO DE SÊMEN

Existem poucas publicações sobre a estocagem de sêmen dos peixes brasileiros, mas algumas pesquisas têm obtido resultados promissores. A criopreservação espermática é uma importante técnica na aquacultura e tem produzido significativas contribuições na preservação a longo prazo do sêmen para reprodução artificial de muitas espécies de peixes, como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus*); a piracanjuba; o bagre africano; o matrinxã; o curimatá, e a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) (VIVEIROS & GODINHO, 2009).

O sêmen de peixe, ao ser congelado, necessita previamente de diluição em soluções contendo diluidor(es) e crioprotetor(es). Um diluente criopreservativo é projetado não somente para prevenir as crioinjúrias dos espermatozóides, mas também a iniciação da motilidade. As proporções de diluição do sêmen variam entre espécies e mesmo entre pesquisadores.

O sucesso da criopreservação depende não somente da escolha certa dos crioprotetores e diluidores, mas também do protocolo utilizado. Os crioprotetores e a taxa de congelamento simultaneamente determinam os danos causados aos espermatozóides devido à formação de cristais de gelo intracelular. Durante o processo de congelamento a suspensão de espermatozóides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozóide, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento. Em temperaturas em torno de 5°C a água intra e

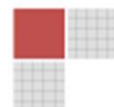


extracelular permanece super resfriada e não cristaliza. Entre  $-5$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular, que permanece super resfriado, ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MARIA et al., 2006).

### 2.3 ANDROGÊNESE

A androgênese consiste na produção de organismos a partir somente do genoma nucleolar paterno, sem a participação do material genético materno, e em peixes consiste basicamente em três passos: (i) eliminação ou inativação do material genético do óvulo; (ii) fertilização do óvulo inativado pelo gameta masculino haplóide do doador; (iii) restauração da diplodiploidia pela supressão da primeira clivagem da mitose no desenvolvimento embrionário (PANDIAN & KIRANKUMAR, 2003).

A inativação do genoma nuclear dos ovócitos, inicialmente era feita utilizando irradiação  $\gamma$  ou raio-X. No entanto, este tipo de irradiação não destruíam completamente o DNA do gameta e os fragmentos de DNA remanescentes eram expressos na progênie. Em contraste com a irradiação  $\gamma$ , a irradiação UV, é um método mais simples e barato (KOMEN & THORGAARD, 2007). Em muitos estudos utiliza-se lâmpadas Ultra-violetas – UV de 254nm, sendo que a inativação do DNA é otimizada variando a distância entre a lâmpada e o material a ser irradiado, ou seja variando a intensidade de radiação. Bongers et al. (1994) foram os primeiros a conseguirem 100% de inativação do genoma de ovos de *Cyprinus carpio*, usando uma dose de 250 mJ/cm<sup>2</sup> de UV. Shelton (2000), trabalhando com uma dose de 600 J/m<sup>2</sup>, descreve a irradiação ultravioleta, além de mais simples e segura, como a que melhor neutraliza o DNA nuclear e causa menos injúrias às demais moléculas nos ovócitos de tilápias (*Oreochromis niloticus*).

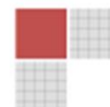


A fertilização do óvulo inativado pode ser feita com gametas masculinos previamente congelados ou resfriados, garantindo sua disponibilidade no momento exato da fertilização. Assim, é possível conservar uma espécie em extinção tendo somente seu sêmen criopreservado e multiplicá-la fertilizando ovócitos com o DNA nucleolar inativado, doados por outras espécies filogeneticamente próximas que ainda estão disponíveis na natureza. A utilização de gametas de espécies diferentes é possível, pois os espermatozóides de peixes teleósteos não têm acrossoma, fato que coincide com a presença da micrópila nos ovócitos (PANDIAN & KIRANKUMAR, 2003). Desde que a entrada do espermatozóide na micrópila se faz possível, a fertilização em peixes é um evento não espécie específico. Na tabela 1, são descritas espécies doadoras de sêmen e espécies receptoras para a inseminação interespecífica em peixes teleósteos. A inseminação interespecífica bem sucedida é a estratégia mais importante para clonagem ou androgênese interespecíficas (CÉSAR et al. 2006).

Na literatura, não há relatos sobre androgênese espécies de peixes nativos do Brasil, o que seria bastante interessante tanto para a conservação genética, como para o estudo de herança genética, principalmente materna.

Tabela 1 Espécies doadoras de sêmen e espécies receptoras de sêmen na inseminação interespecífica em peixes.

Sperm Donor	Sperm recipiente
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>
	<i>Carassius auratus</i>
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>
	<i>Cirrhinus mrigala</i>
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>
	<i>Cobitis biwae</i>
	<i>Tinca tinca</i>
	<i>Oreochromis niloticus</i>
	<i>O. mossambicus</i>



*C. auratus*

*C. idella*

*M. anguillicaudatus*

*O. niloticus*

*C. idella*

*C. carpio*

*P. gonionotus*

*C. carpio*

*C. biwae*

*M. anguillicaudatus*

*Barbus barbus*

*C. carpio*

*T. tinca*

*O. niloticus*

*Pangasius schwanenfeldii*

*P. gonionotus*

*P. sutchi*

*Clarius macrocephalus*

*Gnathopogon elongatus elongatus*

*M. anguillicaudatus*

*Acipenser ruthensis*

*Huso huso*

*A. baeri*

*A. ruthensis*

*Salmo salar*

*O. mykiss*

*Salmo trutta*

*Salvelinus fontinalis*

*O. kisutsch*

*O. tshwystcha*

*O. masou*

*S. trutta*

*S. salar*

*Thymallus thymallus*

*O. mykiss*

*Abramis brami*

*C. carpio*

*Poecilia velifera*

*P. sphenops*

*P. sphenops*

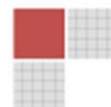
*P. velifera*

*Oreochromis aureus*

*O. niloticus*

*O. hornorum*

*O. niloticus*



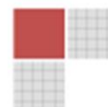
<i>O. hornorum</i>	<i>O. mossambicus</i>
<i>O. macrochir</i>	<i>O. niloticus</i>
<i>O. variabilis</i>	<i>O. niloticus</i>
<i>O. niloticus</i>	<i>O. spilurus niger</i>
<i>O. niloticus</i>	<i>O. mossambicus</i>
<i>O. mossambicus</i>	<i>O. spilurus niger</i>
<i>Prinotus paralatus</i>	<i>P. alatus</i>

---

Fonte: Adaptado de Pandian & Kirankumar (2003).

O terceiro passo para a androgênese é a manipulação genética, que trata-se basicamente da adição ou da subtração de um conjunto completo haplóide ou diplóide, na meiose ou mitose do desenvolvimento embrionário, tornando possível fenômenos como a poliploidização, ginogênese, androgênese e a clonagem. Os peixes oferecem vantagens técnicas em relação aos demais vertebrados por apresentarem um sistema biológico menos especializado, permitindo certas manipulações que são impraticáveis em outros. Algumas das facilidades são: fecundação externa, alta fecundidade e diferenciação sexual controlável.

Após a fertilização dos ovócitos inativados é torna-se necessária a restauração da diplodiploidia para sobrevivência das larvas. A duplicação do genoma é conseguida através da inibição da primeira divisão mitótica por meio de pressão ou de choque térmico. Se aplicado durante a prófase da mitose, o resultado será a duplicação do conjunto cromossômico haplóide, seguido de divisões celulares normais pela supressão da primeira clivagem da mitose no desenvolvimento embrionário (KOMEN & THORGAARD, 2007). Há duas divisões categóricas nas tecnologias de alteração no número de cromossomos: choques térmicos e choques de hiperbáricos. Choques de temperatura, geralmente, são choques precoces que variam de 5 a 30 minutos pós-fertilização, com a finalidade de atuar na meiose, bloqueando a eliminação do segundo corpúsculo polar do ovócito. Já os choques de pressão são aplicados aos ovos decorridos tempos maiores após a fertilização (de 30 a 90 minutos), sendo chamados choques tardios com o objetivo de interferir no início da mitose,





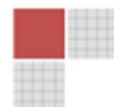
impedindo a primeira clivagem mitótica do zigoto que se tornaria um embrião com duas células (CYRINO et al. 2004).

Em algumas estações de piscicultura, utiliza-se o choque térmico tardio e não o hiperbárico, pois a aparelhagem para manutenção de temperaturas constantes oferece maior segurança para os operadores, além de possibilitar o trabalho com volumes maiores de ovos. Nos choques de pressão são usados cilindros hidráulicos de aço inoxidável, sendo bastante caros, comportando volumes reduzidos e operando por vários minutos em altas pressões que oscilam por volta de mil psi (psi = libra por polegada quadrada), ocorrendo muitas vezes riscos de rompimento (CÉSAR et al. 2006).

A temperatura, a duração, e o momento pós-fertilização adequado do choque térmico tardio são espécie específicos e variam de 27-36 ° C para salmonídeos para até 42 ° C para peixes tropicais, como a tilápia. Para a maioria das espécies de ciprinídeos, 40-41 ° C é considerada ideal. As temperaturas de choque eficazes estão perto do limite de tolerância, que atuam através da polimerização e de complexos protéicos. Encontrar a combinação certa de temperatura e tempo é, portanto, fundamental (KOMEN & THORGAARD, 2007). A viabilidade de indivíduos haplóides é extremamente baixa, deste modo, as taxas de eclosão e sobrevivência poderiam ser parâmetros usados para avaliar o sucesso do protocolo usado. No entanto, isto não garante totalmente a origem paterna do embrião, pois o método está sujeito a falhas, sendo necessária a aplicação de marcadores moleculares a fim de averiguar a origem do zigoto. Análises de RAPD, PCR e microsatélites, surgem como alternativas eficientes na determinação da origem do material genético de peixes gerados por androgênese (ARAI, 2001; KIRANKUMAR & PADIAN, 2003; NAGOYA, 2010).

## 2.4 EFEITO MATERNO

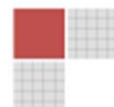
O efeito materno pode ser definido como a contribuição, a influência ou o impacto sobre o fenótipo de um indivíduo, atribuível diretamente ao fenótipo da mãe, que podem ser causas genéticas ou ambientais (WEIGENSBERG et al., 1998).



O efeito materno é o evento mais estudado entre os mamíferos, invertebrados e vertebrados, uma vez que a mãe influencia consideravelmente a vida da prole (nascimento, morte e mecanismos) e a dinâmica populacional. Ela pode ser expressa de duas formas: na primeira, o efeito materno é expresso por meio do fornecimento de recursos para a prole durante o período de desenvolvimento. A segunda forma diz respeito à possibilidade do efeito materno em influenciar na propagação de suas proles (ZEHNDER & HUNTER, 2007). As influências ambientais maternas sobre o fenótipo da progênie são uma possível causa do atraso no aumento da variabilidade populacional e, provavelmente, um fator agravante sobre o equilíbrio da dinâmica populacional (BENTON et al., 2001). Tradicionalmente, os efeitos maternos têm sido tratados como uma fonte de variância ambiental problemática que confunde nossa habilidade para estimar com acurácia a base genética da característica de interesse (KRIST, 2004).

Em peixes, as características reprodutivas mudam sistematicamente durante o ciclo de vida do indivíduo. O crescimento anual da fêmea e também as variações em condição ambientais induzem variações em cada fator importante, como qualidade e tamanho do ovo, a mortalidade do ovo, a flutuabilidade do ovo, a viabilidade larval e o período de desova (SOLEMDAL, 1997). Estes efeitos irão contribuir para a sobrevivência do embrião, que depende do estágio de maturação do ovo e da idade da fêmea via composição da matéria do ovo, resultando, estas relações progênie-ovo-parente na variabilidade da larva, em resistir a um período de fome e a predação (KAMLER, 2005).

As possíveis contribuições da fêmea para o desenvolvimento de sua progênie são mostradas na Figura 2.



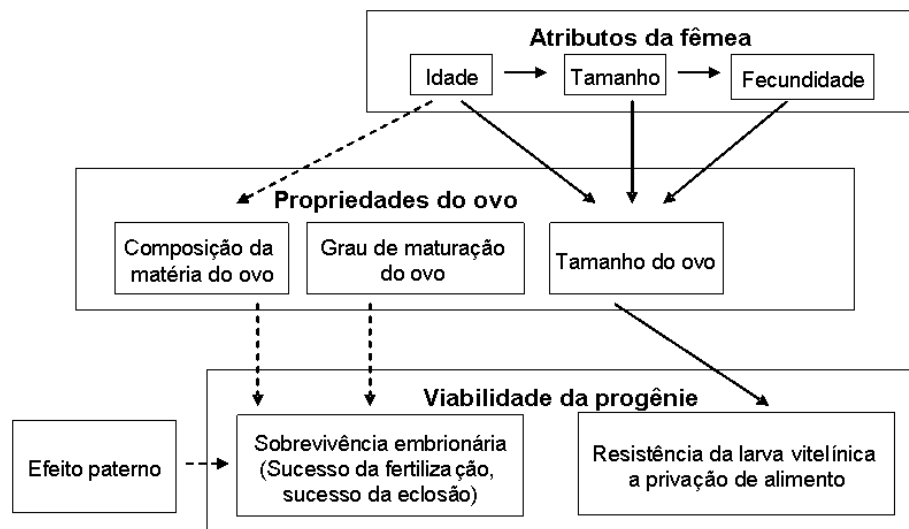


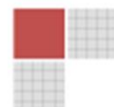
FIGURA 2 Dois grupos de fatores parentais que afetam a viabilidade da progênie em peixes. Seta pontilhada: efeitos manifestados durante a embriogênese; seta sólida: efeitos manifestados em larvas com saco vitelínico e após a absorção do saco vitelínico.

Fonte: Adaptado de Kamler (2005).

Efeito da qualidade do ovo é uma das principais razões que têm sido propostas para explicar baixos rendimentos da duplicação de larvas haploides. O efeito materno é significativo sobre a sensibilidade dos ovos aos choques de calor ou pressão. Com a aplicação da androgênese é possível distinguir os efeitos de ovo de qualidade dos efeitos da carga genética. A qualidade dos ovos é complexa e ainda pouco compreendida. Alguns fatores como a composição de ácidos graxos melhoram a fertilização e a sobrevivência das larvas, e também desempenham um papel na determinação da sobrevivência após choques de temperatura ou pressão (KOMEN & THORGAARD, 2007).

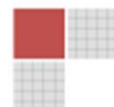
## 2.5 EFEITO CITOPLASMÁTICO

A mitocôndria, dentre as organelas presentes no citosol, além do núcleo, é a única que contém DNA próprio (DE ROBERTIS, 2003). O genoma do DNA mitocondrial



(mtDNA) é haplóide devido sua herança ser estritamente materna, por isso não está submetido a processos de recombinação. Mas este fato, não faz com que o DNA mitocondrial entre indivíduos da mesma espécie seja semelhante, pois esse possui uma região hipervariável chamada de D-Loop, o que permite uma taxa de evolução de 5 a 10 vezes maior do que o DNA nuclear. Dentre os vários fatores que permite essa hipervariabilidade, está a sensibilidade ao dano oxidativo causado principalmente por um grande número de radicais livres proporcionando um ambiente favorável a mutação do DNA; não possui histonas, que permite um papel protetor no DNA nuclear (YAKES & VAN OUTEN,1997) e a mtDNA polimerase possui uma pobre atividade reparadora se comparada a polimerase nuclear. Segundo Jarreta (1999) a alta taxa de substituição de bases possibilita que seja observada uma ou mais diferenças na seqüência nucleotídica das regiões hipervariáveis do mtDNA, quando indivíduos da linhagem materna de uma família são comparados. A teoria de Jarreta poderia explicar uma das causas da variação entre indivíduos provenientes de cruzamentos recíprocos. Reis Neto et al. (2012) encontraram em progênes de híbridos tambacu um peso médio significativamente ( $P<0,05$ ) maior quando comparado ao híbrido paqui. Embora o autor tenha atribuído essa diferença ao termo que os melhoristas costumam chamar de heterose, poderíamos atribuir as diferenças entre os híbridos ao mtDNA, que no caso das proles tambacu, herdaram o mtDNA da mãe tambaqui, espécie esta mais precoce do que a fêmea pacu, a qual transferiu o seu mtDNA mitocondrial a prole paqui.

Ambos raios  $\gamma$  e radiação UV podem ter efeitos graves sobre o desenvolvimento dos oócitos e embriões (KARAYÜCEL & KARAYÜCEL, 2003). Teoricamente, irradiação  $\gamma$  podem produzir mutações pontuais ou dentro do DNA mitocondrial ou mRNA citoplasmático (THORGAARD et al., 1990). Poucos estudos têm abordado a questão de saber se o DNA mitocondrial é danificado durante a irradiação. Nestes estudos, nenhuma evidência de dano mitocondrial foi encontrado (BROWN & THORGAARD, 2002). Na maior parte dos ovos de peixes, as mitocôndrias são concentradas no corpo Balbiani, que é incorporado na gema. Esta grande quantidade de gema, certamente, protege a mitocôndria de radiação UV. Além disso, o número da cópia grande de mitocôndrias no interior do



ovócito do peixe pode mascarar qualquer perda ou dano menor (KOMEN & THORGAARD, 2007).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture** [S.I.], v. 197, n. 1-4, p. 205-228, 2001.

BENTON, T.G. *et al.* Maternal effects and the stability of populations dynamics in noisy environments. **Journal of Animal Ecology**, v. 70, p. 590-599, 2001.

BONGERS, A. B. J. *et al.* Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. **Aquaculture**, v. 122, n. 2-3, p. 119-132, 1994.

BROWN, K. H.; THORGAARD, G. H. Mitochondrial and nuclear inheritance in an androgenetic line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** [S.I.], v. 204, n. 3-4, p. 323-335, 2002.

CÉSAR, M. P. *et al.* **Métodos para obtenção de populações monossexo na piscicultura.** Boletim Agropecuário/UFLA - n.º 69 - p.1-27 Lavras/MG. 2006.

CYRINO, J. E. P. *et al.* **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2004. 533 p.

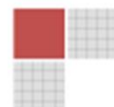
DE ROBERTIS(Jr.), H. P. **Biologia Celular e Molecular.** Guanabara-Koogan: RJ (2003) Endocrinol., 2003, 134, 62–71.

FUJIMOTO, T. *et al.* Developmental potential of embryonic cells in a nucleocytoplasmic hybrid formed using a goldfish haploid nucleus and loach egg cytoplasm. **International Journal of Developmental Biology** [S.I.], v. 54, n. 5, p. 827-835, 2010.

JARRETA, M.B.M. **La puebra Del ADN em Medicina Forense.** Masson, 1999.

KAMLER, E. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: an energetics perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** [S.I.], v. 15, n. 4, p. 399-421, 2005.

KARAYÜCEL, Ü., KARAYÜCEL, S. Optimisation of UV Treatment Duration to Induce Haploid Androgenesis in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) **Turk. Journal of Vet. Anim. Sci.** 27, 401-407, 2003.



KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T. J. Use of heterologous sperm for the dispermic induction of androgenesis in barbs. **Journal of Fish Biology** [S.I.], v. 64, n. 6, p. 1485-1497, 2004.

KOMEN, H.; THORGAARD, G. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. **Aquaculture** [S.I.], p. 150-173, SEP 14, 2007.

KRIST, M. Maternal effects and offspring performance: in search of the best method? **Oikos**, v. 2, n. 106, p. 422-426, 2004.

MARIA, A. N. *et al.* Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture** [S.I.], v. 260, n. 1-4, p. 298-306, 2006.

NAGOYA, H. *et al.* Production of androgenetic amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* with dispermy fertilization. **Fisheries Science** [S.I.], v. 76, n. 2, p. 305-313, 2010.

PANDIAN, T. J.; KIRANKUMAR, S. Androgenesis and conservation of fishes. **Current Science** [S.I.], v. 85, n. 7, p. 917-931, 2003.

PEREZ, J.F. **Genoma**: um balanço preliminar. Pesquisa Fapesp Especial. 20-23, 2008.

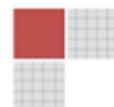
REIS NETO, R. V. *et al.* Performance and carcass traits in the diallel crossing of pacu and tambaqui. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 2390-2395, 2012.

SHELTON, W.L., 2000. **Nile tilapia gamete management for chromosome manipulation**. In: K. McElwee, D. Burke, M. Niles, and H. Egna (Editors), Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/ Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp. 69–72.

SOLEMDAL, P. Maternal effects - a link between the past and the future. **Journal of Sea Research** [S.I.], v. 37, n. 3-4, p. 213-227, 1997.

THORGAARD, G. H. **Chromosome set manipulation and sex control in fish**. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (eds.), *Fish Physiology*. Academic press, New York, 9B: 405-434, 1983.

TORRES, R.A. (2003). New frontiers in conservation biology: the era of the genome. **Braz. J. Nat. Conserv.** 1(2): 60-62.



VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry** [S.I.], v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009

WEIGENSBERG, I. *et al.* Effects of male genetic contribution and paternal investment to egg and hatchling size in the cricket, *Gryllus firmus*. **Journal of Evolutionary Biology** [S.I.], v. 11, n. 2, p. 135-146, 1998.

YAKES, M.F.; VAN HOUTEN, B. **Mitochondrial DNA damage in human cells following oxidative stress.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, p. 514-519, 1997.

ZEHNDER, C.B.; HUNTER, M.D.A Comparison of maternal effects and current environmental on vital rates of *Aphis nerii*, the milkweed-oleander aphid. **Ecological Entomology**, v. 32, p. 172-180, 2007.

