



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E RECURSOS
PESQUEIROS

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DE TRIPLOIDIA EM
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A
PUBERDADE, BEM ESTAR E RECRUA

ALDESSANDRO DA COSTA AMARAL

Manaus - Amazonas
Novembro, 2025

ALDESSANDRO DA COSTA AMARAL

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DE TRIPLOIDIA EM
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A
PUBERDADE, BEM ESTAR E RECRIA

Orientador: Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

Co-orientadora: Dra. Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração Produção Animal/Biotecnologia Aplicada à Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

Manaus – Amazonas
Novembro, 2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

- A485d Amaral, Aldessandro da Costa
Desenvolvimento de protocolo para indução de triploidia em tambaqui
(*Colossoma macropomum*) e avaliação dos efeitos sobre a puberdade, bem
estar e recria / Aldessandro da Costa Amaral. - 2025.
107 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Wallice Luiz Paxiúba Duncan.
Coorientador(a): Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Manaus, 2025.
1. hydrostatic pressure treatment. 2. triploidization. 3. *Colossoma*
macropomum. 4. aquaculture. I. Duncan, Wallice Luiz Paxiúba. II.
O'Sullivan, Fernanda Loureiro de Almeida. III. Universidade Federal do
Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos
Pesqueiros. IV. Título
-

ALDESSANDRO DA COSTA AMARAL

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DE TRIPLOIDIA
EM TAMBQUI (*Colossoma macropomum*) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
SOBRE A PUBERDADE, BEM ESTAR E RECRIA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros.

Aprovado em 25 de Novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **WALLICE LUIZ PAXIUBA DUNCAN**
Data: 26/11/2025 07:28:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan – Presidente
Universidade do Federal do Amazonas

Documento assinado digitalmente
 **PEDRO DE QUEIROZ COSTA NETO**
Data: 27/11/2025 11:03:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto - Membro
Universidade do Federal do Amazonas

Documento assinado digitalmente
 **THIAGO MENDES DE FREITAS**
Data: 25/11/2025 21:35:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Thiago Mendes de Freitas - Membro
Universidade Nilton Lins

Documento assinado digitalmente
 **NIVALDO FERREIRA DO NASCIMENTO**
Data: 26/11/2025 09:00:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nivaldo Ferreira do Nascimento - Membro
Universidade do Federal Rural de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 **ERIKA RAMOS DE ALVARENGA**
Data: 26/11/2025 08:28:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Érika Ramos de Alvarenga - Membro
Universidade Federal de Minas Gerais

DEDICATÓRIA

Estamos no ano de 2025, ***mas esta história não começou agora...*** A chegada até aqui foi sem dúvida longa e árdua, fazendo parte do meu processo de amadurecimento pessoal e profissional. Narrar essa trajetória é como navegar pelos meandros dos rios e seus afluentes, cheios de curvas sinuosas e caminhos duvidosos que surgem ao longo do rio principal. Viajar pelo rio desconhecido chamado DESTINO, nos causa medo e incerteza, mas são as pessoas que viajam ao nosso lado que nos fazem ter força e coragem para continuar durante as tempestades. A cada destino, pessoas embarcaram e desembarcaram, novas trajetórias são conhecidas e escritas, e em cada raiar do sol, surge a esperança que dias melhores estão por vir. Portanto, esta é a parte mais difícil de escrever, a parte em que mais temo cometer falhas, esquecer de algo ou alguém, pois ao longo do percurso, cardumes de pessoas (amigos e familiares) fizeram parte desta história.

Dedicar o resultado desta viagem (tese) para as pessoas que amo, me deixa impotente, pois me faz viajar, não pelos meandros dos rios, mas agora numa linha chamada TEMPO. **E como já dito, essa história não começou agora.** Controlar as emoções não será fácil e nem poderia, se tornando até mesmo impossível, foram tantos gestos de amor e sacrifícios durante estes anos, que agradecer se torna pouco, deixando essa dedicatória pequena diante de tudo o que fizeram e fazem por mim. Mencionar tudo o que fizeram seria injusto, aliás, foram tantas coisas, que em uma lista não caberia. Desta forma, dedicar este trabalho a vocês, é apenas uma forma singela que encontrei para agradecer a tudo que fizeram por mim, pois sem vocês nada seria possível e nem teria sentido.

O ato de dedicar é um gesto que demonstra GRATIDÃO, portanto dedico aos meus familiares, aos meus amigos e a todos que fizeram parte desta viagem, mas principalmente a minha família – ASA²S. Pertencer a esta família é um privilégio, nada mais justo do que dedicar este trabalho ao meu PAI - Aldenor Andrade do Amaral, à minha MÃE - Sandra Helena Reis da Costa e minhas irmãs: Sandrelly da Costa Amaral e Ana Gabrielly da Costa do Amaral, aos meus irmãos de criação Keliton Santarém da Silva e Elias Emanuel Oleriano da Silva Reis. Pode parecer clichê, mas "de dez vidas, onze daria por vocês".

“Das muitas coisas
Do meu tempo de criança
Guardo vivo na lembrança
O aconchego de meu lar”

Utopia- Canção de Padre Zezinho-1990

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal do Amazonas - UFAM, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiras PPG-CARP, a FioCruz Amazônia (Instituto Leônidas & Maria Deane), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Amazônia Ocidental e a EMBRAPA Pesca e Aquicultura por todas as estruturas disponibilizadas para a realização desta pesquisa.

Ao meu orientador Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan por todo suporte durante esta trajetória. À minha coorientadora, pesquisadora Dra. Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan pela oportunidade e disposição para me orientar nessa jornada. Foram quatro anos de muito aprendizado, ou melhor, foram oito anos de muito aprendizado, não apenas para vida acadêmica, mas para a vida pessoal; Fernanda não é apenas uma coorientadora, é uma amiga, que com sua energia contagia por onde passa. Dentro dos laboratórios todos sabem quando ela está chegando, pois, sua risada pode ser ouvida de longe. Fernanda é um modelo a ser seguido: boa mãe, boa pesquisadora, boa professora, boa profissional, boa amiga, sem dúvida Fernanda é uma inspiração para todos.

Aos técnicos de laboratórios, aos amigos do Doutorado e à todos que me ajudaram durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos do município de Parintins e de Manaus, que me proporcionaram momentos memoráveis ao longo destes anos.

Ao Keliton Pereira Bentes, por toda paciência, amor e carinho, sempre caminhando ao meu lado.

À minha irmã Sandrelly da Costa Amaral, por toda paciência e zelo que teve com nossos pais durante esse período. Sempre suportando, relevando e entendendo que as dificuldades enfrentadas em casa, era devido a difícil missão de me manter em outra cidade e dentro de uma Universidade Pública, privando-a e retirando-a muitas vezes do seu conforto e adiando até mesmo alguns de seus sonhos.

Aos meus pais que sempre confiaram e acreditaram em mim, incentivando e dando força nos momentos mais difíceis da vida acadêmica e pessoal. Agradeço desde já e sempre o seu amor incondicional, sem vocês, nada seria possível.

Gostaria também de agradecer a Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades e por seu amor incondicional, que mesmo nos momentos em que perdi a fé, sempre me deu a mão para erguer a cabeça e continuar.

EPIGRAFE

Que um dia o Deus da crença desses homens maus
Perdoe o genocídio feito a fogo e cruz
Regaram esse solo com o sangue dos meus
O caos e a matança em nome de Deus
Eu, ainda curumim, sem nada entender
Levado a força dos braços de minha mãe
A dor é o pavor, o kariwa invasor
É isso que propaga o seu Deus de amor?
Ô, ô, ô, ô, ô

Erguemos nossos punhos, lutamos pela terra
Os rios e a floresta, sou dono desse chão
Não vamos sucumbir, a ordem é resistir
Marchamos de mãos dadas, temei nossa união

Por curumins e cunhantãs iremos resistir
O garantido é a bandeira do povo a lutar
É a memória e a história que não vai morrer
É a essência dos meus ancestrais

Ô, ê, hei, hei, há, hei, ô, é, hei, hei
Garantido é a vontade de um povo que clama por paz
Ô, é, hei, hei, há, hei, ô, ê, hei, hei
Por justiça, liberdade grito: Escravidão nunca mais!

Composição:
Igor Serrão
Pedro Nogueira
Michael Trindade
Paulo Almeida.

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie nativa da aquicultura amazônica e brasileira, destacando-se pelo elevado valor econômico e pelo potencial de inserção no mercado internacional. No entanto, sua produção ainda se baseia predominantemente em práticas convencionais, com redução da oferta de linhagens puras e limitação de tecnologias específicas, o que evidencia a necessidade de estratégias inovadoras e sustentáveis. Nesse contexto, a indução à triploidia surge como uma alternativa promissora para o controle reprodutivo, a biossegurança ambiental e a intensificação produtiva. O presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente de indução à triploidia em *C. macropomum* por meio de choque de pressão hidrostática, bem como avaliar seus efeitos sobre o crescimento inicial, a maturação gonadal, o bem-estar e a condição fisiológica dos peixes. Foram conduzidos dois ensaios experimentais utilizando choque de pressão de 8000 psi. No primeiro ensaio, ovos recém-fertilizados foram submetidos ao choque em diferentes tempos pós-fertilização, visando identificar o período mais eficiente para a indução da triploidia. No segundo ensaio, diferentes durações de choque foram testadas nos tempos previamente selecionados. Os tratamentos resultaram em elevadas taxas de triploidização (>93%), com maiores índices de sobrevivência embrionária e de gástrula final nos choques aplicados entre 65 e 95 segundos pós-fertilização. Avaliações mensais de crescimento, realizadas durante os primeiros seis meses de vida, indicaram desempenho superior dos triploides em relação aos diploides, considerando peso corporal, altura corporal e comprimentos total e padrão. Análises histológicas das gônadas aos 20 meses de idade demonstraram infertilidade nos peixes triploides, enquanto os diploides apresentaram desenvolvimento gonadal avançado. A condição fisiológica e o estado de saúde foram avaliados por meio de parâmetros hematológicos e bioquímicos, evidenciando que os triploides apresentaram eritrócitos maiores, menor contagem eritrocitária e valores elevados de volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média, sem comprometimento da concentração de hemoglobina corpuscular média ou da homeostase bioquímica plasmática. Esses resultados indicam a ocorrência de ajustes fisiológicos compensatórios associados ao aumento do conteúdo genético, assegurando transporte eficiente de oxigênio e manutenção das funções metabólicas. Conclui-se que a triploidia representa uma ferramenta viável e sustentável para a produção aquícola do tambaqui, contribuindo para o fortalecimento da aquicultura de espécies nativas no Brasil.

Palavras-chave: aquicultura; peixe nativo; triploidia; choque de pressão; fisiologia de peixes.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the most important native species in Amazonian and Brazilian aquaculture, standing out for its high economic value and potential for insertion into international markets. However, its production still relies predominantly on conventional practices, with a reduction in the availability of pure stocks and a lack of species-specific technologies, highlighting the need for innovative and sustainable strategies. In this context, triploidy induction emerges as a promising alternative for reproductive control, environmental biosafety, and production intensification. The present study aimed to establish an efficient protocol for triploidy induction in *C. macropomum* using hydrostatic pressure shock and to evaluate its effects on early growth, gonadal maturation, welfare, and physiological condition. Two experimental trials were conducted using a hydrostatic pressure shock of 8000 psi. In the first trial, newly fertilized eggs were subjected to pressure shock at different post-fertilization times to identify the most efficient window for triploidy induction. In the second trial, different shock durations were tested at the previously selected times. All treatments resulted in high triploidization rates (>93%), with higher embryonic survival and final gastrula survival observed when shocks were applied between 65 and 95 seconds post-fertilization. Monthly growth assessments performed during the first six months of life indicated superior performance of triploid fish compared to diploids in terms of body weight, body height, and total and standard lengths. Histological analyses of gonads at 20 months of age demonstrated infertility in triploid fish, whereas diploid individuals exhibited advanced gonadal development. Physiological condition and health status were assessed through hematological and biochemical parameters, showing that triploids presented larger erythrocytes, lower erythrocyte counts, and higher mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin values, without impairment of mean corpuscular hemoglobin concentration or plasma biochemical homeostasis. These results indicate the occurrence of compensatory physiological adjustments associated with increased genomic content, ensuring efficient oxygen transport and maintenance of metabolic functions. In conclusion, triploidy represents a viable and sustainable tool for tambaqui aquaculture, contributing to the strengthening of native fish farming in Brazil.

Keywords: aquaculture; native fish; triploidy; hydrostatic pressure shock; fish physiology.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Exemplar de tambaqui *Colossoma macropomum* adulto

Figura 2. Representação da expulsão dos corpos polares, fertilização e momento de aplicação do choque para induzir a triploidia em peixes

Capítulo 2

Figure 1. Schematic representation of both trials set-up to induce triploidy in tambaqui (*Colossoma macropomum*). Each line represents one treatment and shows the time post fertilization (sec) when fertilized eggs were subjected to pressure shock (8000 psi) and the duration of shock (above each line).

Figure 2. Flow cytometry histograms (from trial 1) for the nuclei DNA relative content of tambaqui (*Colossoma macropomum*) larvae. a) In diploid fish (from unshocked egg) used as standard, b) triploid fish (eggs treated with hydrostatic pressure) and c) merged data from 2n and 3n fish.

Figure 3. Triploidy induction (a), final gastrula survival (FGS), embryo survival index (ESI) and triploid yield (c) in tambaqui (*Colossoma macropomum*) treated and non-treated with pressure shock in trial 1. Data are presented as mean $\pm$ SD. Treatment groups labelled with the same letter do not differ significantly ($P < 0.05$), lower case refers to FI and upper case to ESI.

Figure 4. Triploidy induction (a), final gastrula survival (FGS), embryo survival index (ESI) and triploid yield (c) in tambaqui (*Colossoma macropomum*) treated and non-treated with pressure shock in trial 2. Data are presented as mean $\pm$ SD. Treatment groups labelled with the same letter do not differ significantly ($P < 0.05$), lower case refer to FI and upper case to ESI.

Figure 5. Monthly biometrics of tambaqui (*Colossoma macropomum*) from 2 to 6 months of age. Black bars represent the control (unshocked; 2n) group; white bars represent the treated group, mostly composed of 3n fish. Data are presented as mean $\pm$ SD ($p < 0.001$).

Figure 6. Erythrocytes and karyotype of diploid (a and b) and triploid (c and d) tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Figure 7. Gonads of tambaqui (*Colossoma macropomum*). a) 2n immature ovary containing mainly primary oocytes (PO) and oogonia (circled in black) allocated in lamellae (circled in

red); b) 2n primary growth ovary containing primary, previtellogenic (PVO) and atretic (AO) oocytes; c) 3n ovary without lamella structure, with germinal epithelium (circled in red) devoid of CG germ cells; d) 3n ovary without lamella structure, containing only oogonia (black arrows) in the germinal epithelium, which also presented large areas of apoptotic cells (red arrows); e) resting 2n testis containing residual spermatozoa (asterisks) and thick interstitium; f) mature 2n testis containing free spermatozoa (SZ) and few spermatogonial cysts (SG); g) 3n testis presenting spermatogenic cyst in apoptosis (red arrows), and isolated type A spermatogonia (black arrow).

Figure 8. Ovary of three year old (a) diploid and (b) triploid tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Capítulo 3

Figure 1. Fertilization index (FI) and embryonic survival index (ESI) in tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy: diploid (2n, control) and triploid (3n, pressure-treated).

Figure 2. Erythrocyte size of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Triploid individuals showed higher median values and a distribution shifted toward larger cell diameters compared to diploids, indicating increased erythrocyte size associated with ploidy level.

Figure 3. Weight, total length, and standard length of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Diploid individuals tended to show higher median values for all morphometric variables, while triploids exhibited greater within-group variability. Points represent outliers.

Figure 4. Biochemical parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. In general, diploid individuals showed slightly higher medians for most biochemical parameters, except for glucose, while triploid individuals showed greater intragroup variation in some variables. Points represent outliers.

Figure 5. Hematological parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Diploid individuals tended to present higher median values for all hematological parameters, whereas triploids showed wider variability in some measurements. Points represent outliers.

Figure 6. Hematimetric indices of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Comparison of VCM, HCM, and CHCM between diploid (2n) and triploid (3n) fish. Triploids showed higher values of mean corpuscular volume (VCM) and mean corpuscular

hemoglobin (HCM), whereas mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) remained relatively similar between ploidy groups. Points represent outliers.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Classificação taxonômica do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Tabela 2. Espécies de peixes em que a triploidia foi confirmada por citometria de fluxo.

Tabela 3. Espécies de peixes em que a triploidia foi confirmada ou indicada por esfregaço sanguíneo (morfometria eritrocitária).

Tabela 4. Espécies de peixes em que a triploidia foi confirmada por cariótipo.

Tabela 5. Marcadores moleculares utilizados na confirmação da triploidia em diferentes espécies de peixes.

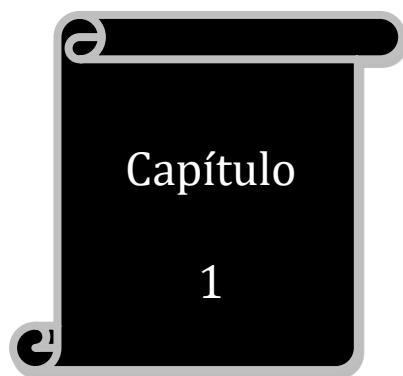
Tabela 6. Espécies de peixes triploides estéreis de água marinha e água doce, identificados através de análises histológicas das gônadas.

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	157
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. AQUICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO.....	20
2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS E TAXONOMIA DO TAMBAQUI.....	22
2.3. TRIPLOIDIA	24
2.3.1. Confirmação da triploidia por citometria de fluxo	29
2.3.2. Confirmação da triploidia por esfregaço sanguíneo	30
2.3.3. Confirmação da triploidia por cariótipo	31
2.3.4. Confirmação da triploidia por Marcadores moleculares	33
2.3.5. Esterilidade em peixes triploides	34
2.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICAS EM PEIXES	37
2.5. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM PEIXES	38
3. JUSTIFICATIVA	40
4. OBJETIVOS	40
4.1. OBJETIVO GERAL	40
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5. REFERÊNCIAS	41
Development of a pressure-induced triploidy protocol and its effects on growth performance and fertility in tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1816).....	54
Abstract	55
1. Introduction	56
2. Material and methods	58
2.1. Trial 1: Identification of the best time post-fertilization for pressure-shock application	59
2.1.1. Artificial reproduction and experimental design	59
2.1.2. Survival at final gastrula stage and embryo survival (hatching) indices.....	60
2.1.3. Flow cytometry determination of larval ploidy	61
2.2. Trial 2: optimization of pressure shock duration	63
2.2.1. Experimental design.....	63
2.2.2. Rearing conditions, feeding regime and biometrics	63
2.2.3. Flow cytometry analysis for triploidization	64
2.3. Blood smear and karyotype.....	64

2.4 Histology analysis of the gonads.....	65
2.5 Data and statistical analysis.....	65
3. Results.....	65
3.1. Trial 1: Triploidization, final gastrula survival (FGS) and embryo survival (ES) (hatching) indices	65
3.2. Trial 2: Optimization of pressure shock duration.....	67
3.2.1. Triploidization, final gastrula survival (FGS) and embryo survival (ES) (hatching) indices	67
3.2.2. Growth performance of triploid vs diploid fish	68
3.3. Blood smear and karyotype	69
3.4 Histology analysis of the gonads.....	70
4. Discussion	74
Acknowledgments.....	77
Disclosure statement.....	77
Funding.....	78
Author Contributions.....	78
References	78
Hematological and Physiological Indicators of Health in Triploid Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	89
Abstract	90
Introduction	91
2. Material and methods	92
2.1 Artificial reproduction and experimental design.....	92
2.2 Fertilization Index (FI) and Embryo Survival (hatching) Index (ESI).....	93
2.3 Rearing conditions and feeding regime.....	93
2.4 Blood smear.....	94
2.5 Sampling.....	94
2.6 Biochemical parameters	94
2.7 Hematological parameters.....	94
2.8 Statistical analysis	95
3. Results.....	95
3.1 Fertilization Index (FI) and Embryo Survival (hatching; ESI) indices	95
3.2 Blood smear.....	96

3.3 Biometrics	97
3.4 Biochemical parameters	98
3.5 Hematological parameters.....	99
4. Discussion	101
Conclusion	103
Author Contributions.....	103
Funding.....	104
Institutional Review Board Statement.....	104
Declaration of competing interest	104
References	104
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

A produção de organismos aquáticos representa a indústria de alimentos com maior potencial para atender ao crescimento contínuo da população mundial, contribuindo de forma significativa para a segurança alimentar. Nesse contexto, a aquicultura vem se expandindo e intensificando globalmente, especialmente com a produção de peixes em cativeiro. Entretanto, para que a aquicultura seja eficiente e economicamente viável, diversos fatores devem ser cuidadosamente avaliados, dentre os quais se destaca a escolha da espécie a ser cultivada. Essa escolha depende de aspectos regionais (rendimento zootécnico, demanda e escoamento da produção), aptidão ao cultivo, disponibilidade hídrica, disponibilidade de tecnologias, e tamanho da propriedade. Em síntese, a espécie ideal deve estar adaptada ao clima (local de produção), apresentar rusticidade, rápido crescimento, boa conversão alimentar em cativeiro, capacidade de reprodução controlada e aceitação pelo mercado consumidor.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), um caracídeo nativo da bacia Amazônica, apresenta características importantes que sustentam seu potencial de cultivo, incluindo rápido crescimento, adaptação fisiológica e anatômica a ambientes com baixas concentrações de oxigênio (Marcos et al., 2016; Sousa et al., 2018), tolerância a altas densidades (Brandão et al., 2004; Gomes et al., 2006; Costa et al., 2016) e um grande mercado, principalmente na região Norte do Brasil. Apesar dessas características favoráveis, os sistemas de cultivo e o desenvolvimento tecnológico do tambaqui ainda estão consideravelmente atrasados em relação aos estabelecidos para outras espécies de peixes que dominam a aquicultura brasileira e servem como referência em contextos nacionais e internacionais, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (IBGE, 2024). Essa disparidade ressalta a necessidade de intensificar os esforços de pesquisa voltados para o avanço e a inovação de tecnologias para espécies nativas como o tambaqui, com foco em estratégias que confirmem vantagens competitivas ao setor.

Considerando as técnicas para aumentar a produtividade, o cultivo de peixes triploides é amplamente praticado em países onde a aquicultura já é uma indústria consolidada, como a Austrália (salmão *Salmo salar*) (Benfey et al., 2016) e a Escócia (truta *Oncorhynchus mykiss*) (Berrill et al., 2012). Em outros países, algumas espécies de peixes também demonstraram 100% de eficiência na obtenção de triploides, entre elas o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) (EUA) (Perera et al., 2016), o salmão-prateado (*Oncorhynchus kisutch*) (Croácia - Teskeredzic et al., 1993; e na Noruega - Christensen et al., 2019), o bagre-europeu (*Silurus glanis*) (República Tcheca) (Linhart et al., 2001), e as espécies neotropicais jundiá (*Rhamdia quelen*)

(Brasil) (Huergo e Zamboni Filho, 2006; Fukushima et al., 2012) e matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Brasil) (do Nascimento et al., 2021).

A produção de peixes triploides é muito vantajosa no processo de aquicultura, gerando lucros econômicos, principalmente por se tratarem de indivíduos estéreis. Para o tambaqui, houve algumas tentativas de induzir triploidia por meio de choque térmico com indução de 17 a 59% (Sato et al., 2020; Silva Júnior et al., 2021; Pereira et al., 2022). Esses fatores positivos da triploidia, somados às características econômicas vantajosas do tambaqui, podem agregar mais valor à produção da espécie, permitindo um alto rendimento em um período de tempo mais curto.

Na maioria das espécies, os indivíduos triploides são inférteis, devido à divisão meiótica irregular que resulta na formação de aneuplóides (Tiwary et al., 2004). Na piscicultura, a produção de indivíduos estéreis é vantajosa para peixes de corte, evitando problemas associados à maturação sexual, como redução do crescimento, maior suscetibilidade a doenças, agressividade e queda na qualidade da carne (Arai, 2001; Peruzzi et al., 2004; Taranger et al., 2010). Além disso, peixes triploides podem apresentar melhores taxas de sobrevivência, conversão alimentar e resistência a doenças (Kerby et al., 2002). Indivíduos estéreis também podem servir como receptores para transplante de células germinativas primordiais (PGCs), permitindo a geração de quimeras germinativas por xenogênese (Yamaha et al., 2003, 2007; Saito et al., 2008; Yasui et al., 2011).

Esses benefícios da triploidia, aliados às vantagens produtivas e demanda do tambaqui, podem agregar valor à produção da espécie, permitindo maior rendimento em menor tempo. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo desenvolver um protocolo eficiente para a produção de tambaquis triploides e avaliar seus efeitos sobre fertilidade, bem-estar e desempenho na recria, contribuindo para o avanço científico e tecnológico da piscicultura nativa brasileira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AQUICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO

A crescente busca mundial por alimentos saudáveis, somado ao constante aumento populacional, tem elevado significativamente a demanda por proteína advinda do pescado. Em 1961, o consumo mundial de pescados era de 9,1 kg *per capita*. De 2004 a 2009, o aumento do consumo foi de 13% no acumulado (Fao, 2010), tornando o pescado um dos itens alimentares mais consumidos do mundo. Em 2022, o consumo foi de 20,7 kg *per capita* por ano e estima-se que até 2032 o consumo aumente 10% atingindo 21,3 kg *per capita* (Fao, 2024). A Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda que o consumo de pescado seja de 12 kg/hab./ano. No Brasil, o levantamento preliminar do consumo médio *per capita* de pescado era de 14,5 kg/hab./ano (Brasil, 2014), o que ultrapassou o recomendado pela OMS. No entanto, dados da Peixe Br de 2018 mostraram queda no consumo do brasileiro, baixando para 9,5 kg/hab./ano e em 2023 a queda foi ainda maior, com o consumo de 4,35 kg/hab./ano (Peixe Br, 2024). Vale ressaltar que no Brasil, o consumo do pescado varia de acordo com o Estado. Por exemplo, no Amazonas, as populações ribeirinhas chegam a consumir mais 30 kg de peixe por ano (Brasil, 2010), enquanto na maioria dos outros Estados do Brasil o consumo fica abaixo do recomendado.

Nesse contexto, uma das estratégias para alcançar os índices de consumo recomendados em todo o globo, é aumentar a produção e, consequentemente, a oferta de pescado. Em 2022, a produção aquícola no mundo alcançou um marco histórico de 223,2 milhões de toneladas, sendo 185,4 milhões de toneladas de animais aquáticos e 37,8 milhões de toneladas de algas, dos quais 89% foi destinado para consumo humano. Isso demonstra a importância da produção pesqueira no combate à insegurança alimentar e à má nutrição. A América Latina e o Caribe produziram 17,7 milhões de toneladas da produção pesqueira mundial, crescendo para 9% quando considerado apenas a produção de animais aquáticos (FAO, 2024).

No Brasil, a produção de pescado tem aumentado ao longo dos últimos anos. Em 2024, a produção atingiu 968.745 toneladas de pescado, com um crescimento de 9,2% em relação ao ano anterior. No entanto, a principal espécie responsável por este crescimento é a tilápia, espécie africana, que respondeu por 662.230 toneladas da produção total de peixes cultivados naquele ano. Apesar deste crescimento na produção aquícola nacional, as espécies nativas tiveram um recuo na produção. Por conta da menor produção na região Amazônica, essas espécies fecharam 2024 com 258.705 toneladas, queda de 1,81% em relação a 2023 (263.479 t) (Peixe Br, 2025).

Apesar do grande potencial do Brasil para a aquicultura, a produção aquícola nacional ainda está aquém do esperado, não conseguindo suprir plenamente a demanda interna. Esse cenário reflete a escassez de pacotes tecnológicos específicos voltados às espécies nativas de alto desempenho zootécnico, o que limita o avanço produtivo e tecnológico do setor e contribui para o desequilíbrio da balança comercial do pescado brasileiro.

De acordo com dados da COMEXSTAT/Ministério da Economia, compilados pela Embrapa Pesca e Aquicultura (2025), as exportações de produtos da piscicultura brasileira alcançaram 13.792 toneladas em 2024, representando um aumento de 58% em volume e 82% em valor, totalizando US\$ 59 milhões em receitas. Esse desempenho expressa um crescimento consistente das exportações, embora o país ainda apresente um déficit comercial significativo, uma vez que as importações atingiram aproximadamente US\$1 bilhão. Assim, o saldo negativo da balança comercial da piscicultura foi de cerca de US\$ 992 milhões em 2024, sendo o salmão a principal espécie importada pelo Brasil, com valor de US\$ 909 milhões, correspondendo a cerca de 87% das importações totais do setor (Embrapa e Peixe BR, 2025). Esses dados reforçam a necessidade de investimentos em pesquisa, inovação e estruturação de cadeias produtivas voltadas às espécies nativas, para que o Brasil possa reduzir sua dependência de importações e consolidar-se como um exportador relevante de pescado de cultivo.

A tilápia continua sendo a principal espécie de peixe cultivado exportada pelo Brasil, consolidando sua liderança nos mercados internacionais. Em 2024, de acordo com dados da COMEXSTAT/Ministério da Economia, compilados pela Embrapa Pesca e Aquicultura (2024), os Estados Unidos foram o principal destino da tilápia brasileira, com um faturamento de US\$12,9 milhões.

Outras espécies nativas também tiveram participação nas exportações, embora em volumes menores. O tambaqui registrou exportações de aproximadamente US\$ 11 mil, enquanto para o Peru, as principais espécies exportadas foram o pacu (US\$ 525 mil) e o curimatá (US\$ 480 mil), representando praticamente toda a exportação dessas espécies no segundo trimestre de 2024.

O Brasil apresenta um padrão de consumo de proteínas de origem animal que difere do padrão mundial. Enquanto no contexto global as carnes suínas e os pescados figuram entre as proteínas mais produzidas e consumidas, o cenário brasileiro é dominado pelas carnes de frango e bovina (FAO, 2024; OECD e FAO, 2024).

Essa discrepância reflete fatores históricos e culturais, como a ampla disponibilidade de áreas de pastagem e a forte estrutura produtiva das cadeias avícola e bovina no país (Baltieri et al., 2025). Provavelmente, esse cenário irá se alterar nos próximos anos, devido ao aumento do consumo de carne de peixe por parte da população. Isso porque existe uma crescente demanda por proteína do pescado por sua alta qualidade.

Portanto, é necessário identificar os principais gargalos que atrasam o crescimento do setor e principalmente buscar alternativas eficazes que alavanquem a atividade. A indústria da piscicultura tem um mercado promissor no Brasil, porém, seus principais entraves ainda se dão devido à falta de estudos básicos sobre a fisiologia das espécies de alto potencial produtivo e o pouco investimento para aplicação de novas tecnologias.

2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS E TAXONOMIA DO TAMBAQUI

O tambaqui é o segundo maior peixe de escama da bacia Amazônica (Goulding, 1981; Isaac e Ruffino, 2000), podendo ser encontrado nas bacias dos rios Solimões/Amazonas e Orinoco e seus afluentes (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Sua taxonomia (tabela 1) foi descrita pela primeira vez por Barão George Von Cuvier em 1998, sendo pertencente à ordem dos Characiformes, família Characidae, Gênero *Colossoma* e espécie *C. macropomum*.

Tabela 1. Classificação taxonômica do tambaqui.

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Characiformes
Família	Characidae
Subfamília	Serrasalminae
Gênero	Colossoma
Espécie	<i>C. macropomum</i>
Nomes populares	Brasil: Tambaqui Peru: Gamitana Venezuela: Canhama

Colômbia: Cachama negra

Estados Unidos: Black-pacu

A espécie é caracterizada por não apresentar espinho pré-dorsal, apresentar nadadeira adiposa raiada e aproximadamente 76 escamas na sua linha lateral (Araújo-Lima e Goulding, 1998) (Figura 1). Na fase juvenil apresenta uma mancha escura arredondada próxima da nadadeira dorsal, que some na fase adulta. A coloração nos adultos varia de acordo com a cor da água em que vivem, em águas pretas ficam mais escuros e em águas barrentas, mais claros (Araújo-Lima e Goulding, 1998; Santos et al., 2006; Soares et al., 2008). O dimorfismo sexual no tambaqui pode ser notado na fase adulta, quando diferenças morfométricas no padrão de crescimento ficam evidentes, com a fêmea maior e mais pesada que o macho, após atingirem a fase reprodutiva, tanto na natureza quanto em cultivo (Villacorta-Correa e Saint-Paul, 1999; Vieira et al., 1999; Almeida et al., 2016).

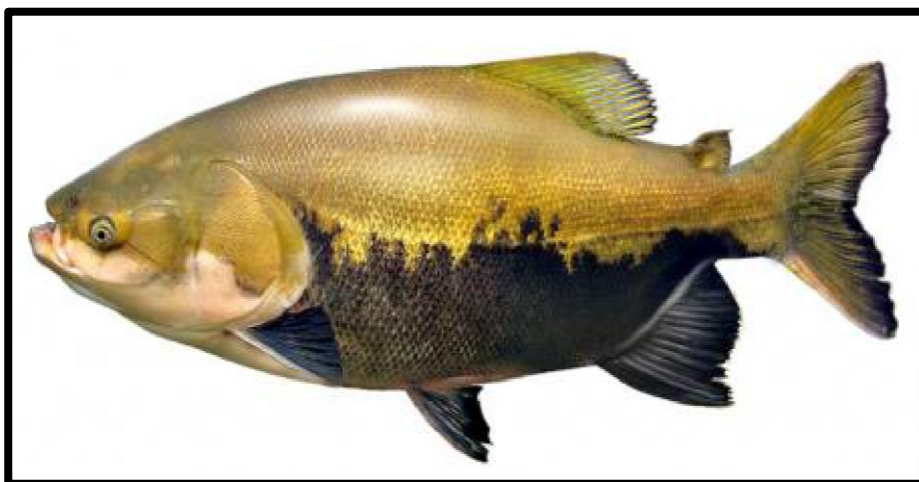


Figura 1: Exemplar de tambaqui *Colossoma macropomum* adulto

O tambaqui é uma espécie de hábito diurno, reofílico, com desova total, fecundação externa e não possui cuidados parentais. Os primeiros sinais de diferenciação sexual ocorrem com 40 mm de comprimento em ambos os gêneros (Lobo et al., 2020). No entanto, as fêmeas só iniciam o processo de maturação sexual entre 55 e 61 cm, com idade média entre 3,5 e 5 anos (Araújo-Lima e Goulding, 1998) e os machos com o comprimento variando entre 62 e 95 cm (Vieira et al., 1999).

O tambaqui em ambiente natural, realiza migrações reprodutivas para áreas de desova, sendo influenciado por estímulos ambientais como temperatura, fotoperíodo e variações de

nível de água. Esses fatores são essenciais para a maturação gonadal e a liberação dos gametas (Vieira et al., 1999; Borges, 2022). Em sistemas de confinamento, a ausência desses estímulos naturais pode comprometer a reprodução do tambaqui, resultando na regressão gonadal e inviabilizando a desova (Carvalho, 2016). Para contornar essa limitação, é necessário o uso de indução hormonal. O método tradicionalmente utilizado é a aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), que contém hormônios gonadotróficos responsáveis pela indução da maturação final e da liberação dos gametas. Estudos demonstram que a indução com EBHC pode resultar em taxas de fertilização superiores a 80% e sobrevivência embrionária próxima a 80% (Harvey e Carolsfeld, 1993; Amaral et al., 2020).

Além do EBHC, hormônios sintéticos, como gonadorelina, buserelina e o análogo do hormônio liberador de gonadotrofina de Salmão (sGnRHa), têm sido testados como alternativas para a indução hormonal no tambaqui. Pesquisas indicam que esses compostos podem ser eficazes na indução da desova, oferecendo vantagens como maior controle sobre as doses e menor risco de contaminação (Souza et al., 2018; Oliveira et al., 2020). É importante ressaltar que a eficácia dos hormônios sintéticos pode variar conforme a espécie e as condições ambientais. Portanto, é fundamental realizar estudos específicos para cada situação, visando otimizar os protocolos de indução hormonal e garantir o sucesso reprodutivo em sistemas de confinamento (Reis, 2016; Borges, 2022).

2.3. TRIPLOIDIA

A triploidia em peixes refere-se à condição genética na qual o indivíduo possui três conjuntos completos de cromossomos ($3n$), em vez dos dois conjuntos normais ($2n$). Essa condição pode ocorrer naturalmente em algumas espécies de peixes devido a erros na meiose, mas também pode ser induzida artificialmente durante a reprodução por métodos físicos ou químicos que impedem a expulsão do segundo corpúsculo polar do oócito (Thorgaard, 1983; Benfey, 1999). A ocorrência da triploidia é resultado da retenção de um conjunto extra de cromossomos, presentes no segundo corpúsculo polar, que em condições normais é expelido durante o processo de fertilização. Desta forma, origina-se um zigoto com três conjuntos cromossômicos (Figura 2). A retenção do segundo corpúsculo polar pode ocorrer de modo natural e sem a intervenção humana (Le Comber e Smith, 2004; Tiwary et al., 2004; Piferrer et al., 2009; Silva et al., 2011) ou através da aplicação de choques físicos ou químicos em ovos recém fertilizados. Os choques físicos podem ser por alteração brusca da temperatura da água

ou alteração da pressão hidrostática (Tiwary et al., 2004; Piferrer et al., 2009), que são mais difíceis de serem executadas, por exigirem equipamentos específicos (Turra et al., 2012).

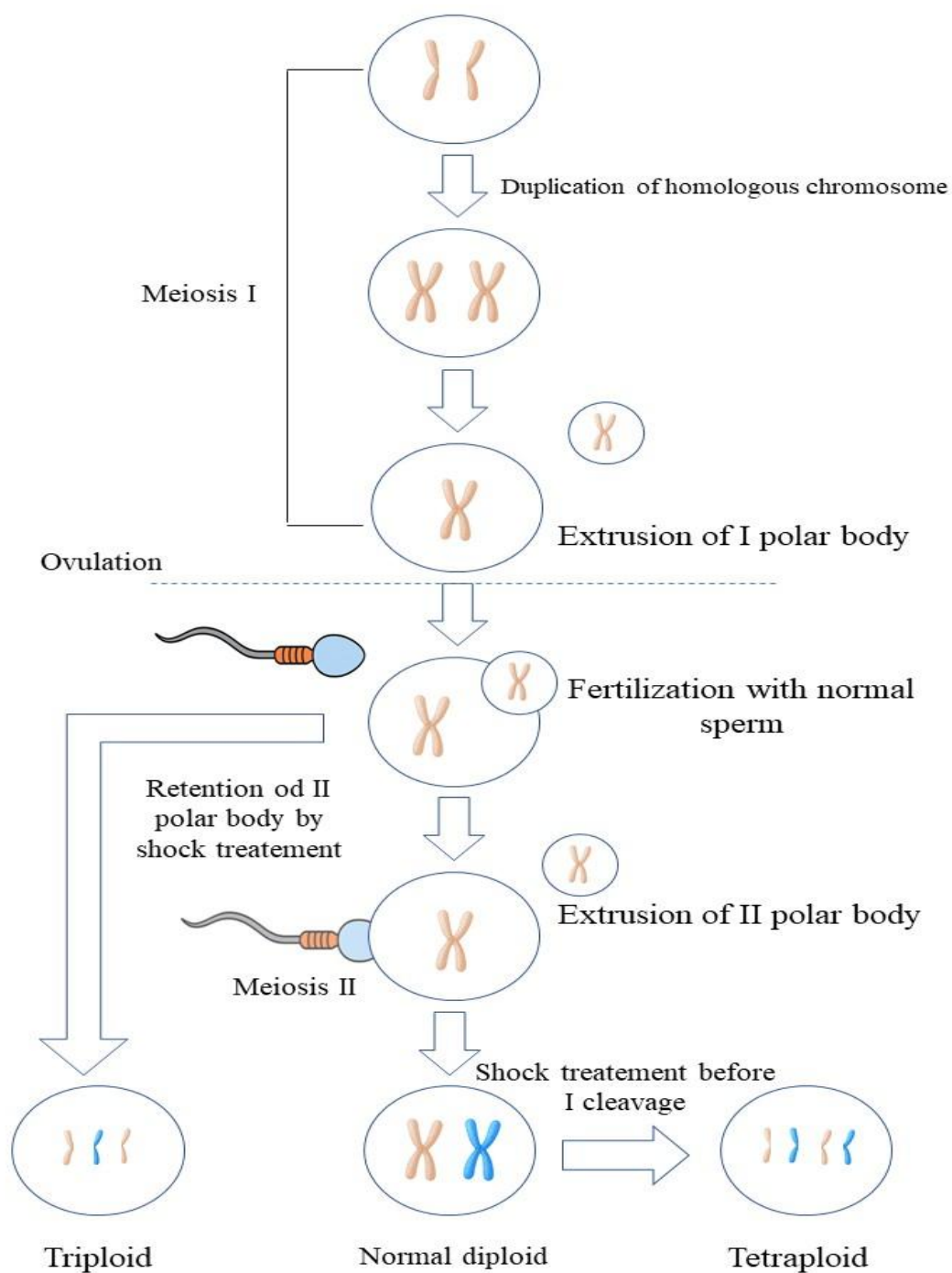


Figura 2. Representação da expulsão dos corpos polares, fertilização e momento de aplicação do choque para induzir a triploidia em peixes

Uma outra alternativa para obter um zigoto diploide é através do cruzamento de indivíduos tetraploides com indivíduos diploides. Os animais oriundos deste cruzamento são chamados de triploides interploides (Piferrer et al., 2009). Entretanto, o cruzamento de machos tetraploides com fêmeas diploides tem pouca eficiência, com baixas taxas de fertilização, devido à dificuldade dos espermatozoides de penetrarem a micrópila dos oócitos pela diferença de tamanho entre ambos os gametas (Cesar et al., 2004; Tebaldi e Amaral Júnior, 2009).

Morfológicamente, um peixe triploide pouco ou nada difere de um diploide, a principal diferença está relacionada à redução do desenvolvimento gonadal, maior índice de heterozigose devido incremento de material genético presente nos núcleos, e o tamanho e quantidade de células (Benfey, 1999).

Em ambiente natural, foram encontradas diversas espécies de peixes com triploidia natural como *Astyanax scabripinnis* (Luis Maistro et al., 1994), *Trichomycterus davisi* (Borin et al., 2002) e loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Zhang e Arai, 1999). Em algumas espécies, triploides naturais podem ocorrer pela retenção espontânea do segundo corpúsculo polar (Piferrer et al., 2009), ou pela produção de gametas não reduzidos (Zhang e Arai, 1999; Piferrer et al., 2009).

Peixes triploides são amplamente utilizados na aquicultura devido aos benefícios, principalmente esterilidade, que não somente previne a reprodução indesejada nos lotes de corte e a poluição genética de estoques de peixes selvagens (Mahmoudi et al., 2025), mas também direciona energia para o crescimento somático, em vez da reprodução, promovendo maior rendimento e produtividade (Benfey, 2001; Nandeesh et al., 2018). Além disso, peixes triploides normalmente apresentam melhor desempenho de crescimento, melhores taxas de conversão alimentar, rendimento de carcaça, qualidade da carne e melhores taxas de sobrevivência em comparação com peixes diploides (Schafhauser-Smith e Benfey, 2001; Glover et al., 2013; Yilmaz et al., 2017).

Portanto, o principal objetivo da técnica de triploidia é produzir esterilidade gonadal. O sucesso da esterilidade se justifica pelas vantagens adquiridas como: maior taxa de crescimento (Feindel et al., 2011) e de sobrevivência, melhor conversão alimentar e maior resistência a doenças quando comparados com seus progenitores diploides (Kerby, 2002). As vantagens da triploidia em relação ao crescimento são facilmente percebidas durante o cultivo dos animais devido ao crescimento contínuo no decorrer do cultivo, uma vez que, os triploides não deslocam energia para a produção de gametas e compartimentos reprodutivos.

Esse rápido crescimento possibilita que o peixe chegue ao peso comercial mais rápido, garantindo que a oferta do pescado ocorra ao longo de todo o ano (Arai, 2001; Peruzzi et al.,

2004). Pelo fato do processo de desenvolvimento gonadal nos triploides ser reduzido, espera-se o crescimento mais acelerado e consequentemente um rendimento de carcaça maior, podendo aumentar consideravelmente a rentabilidade da produção (Dunham, 2004).

A triploidia pode ainda influenciar diretamente em algumas características de carcaça, como rendimento e composição de ácidos graxos (Buchtova et al., 2004; Manor et al., 2012; Ribeiro et al., 2012). O pescado em geral são fontes ricas de ácidos graxos, principalmente de ômega 3, sendo altamente recomendado seu consumo como forma de prevenir doenças cardíacas (Turner et al., 2003).

O método de indução da triploidia varia conforme a espécie, sendo os mais utilizados o choque térmico a frio, o choque de pressão hidrostática e, em alguns casos, combinações de estímulos físicos, dependendo do ciclo reprodutivo e da resistência do gameta (Cherfas e Gomelsky, 1994; Linhart et al., 2001; Rehulka et al., 2004).

A triploidia possui um grande potencial para melhorar o desempenho dos organismos aquáticos, entretanto, existem alguns entraves e particularidades que limitam sua aplicação em todas as espécies cultivadas. Um deles é a fertilidade em algumas espécies, que elimina as vantagens da esterilidade, que é o melhor direcionamento da energia metabólica para o crescimento somático, o que contribui para o aumento do desempenho produtivo e para eficiência zootécnica. Além disso, peixes estéreis têm sido utilizados como receptores de transplantes xenogênicos de células germinativas, principalmente de espécies ameaçadas ou de difícil reprodução. Ademais, a poliploidia, dependendo das condições submetidas, pode reduzir o desempenho dos animais, e tornar o cultivo de triploides de algumas espécies inviável economicamente (Dunham, 2004).

O tamanho e a quantidade de células em organismos triploides é outro fator que pode causar transtornos e diminuir o desempenho dos animais. As células dos triploides são até 50% maiores em relação aos diploides, sendo este aumento desproporcional nos três eixos (altura, largura e comprimento), e que pode gerar consequências como a redução da relação entre área superficial e volume celular, afetando o desempenho dos processos dependentes desta relação, tais como as trocas de nutrientes, metabólitos, íons, hormônios, oxigênio entre outros (Hyndman et al., 2003), além de afetar o equilíbrio enzimático da membrana celular (Sadler et al., 2000). Devido a esses fatores, para se obter as vantagens com os organismos triploides é necessário que as condições de cultivo sejam ideais para a espécie, a fim de evitar problemas que afetam as células e suas funções (Benfey, 1999; Tiwary et al., 2004; Benfey, 2016; Fazio, 2019; Madaro et al., 2021).

2.3.1. Confirmação da triploidia por citometria de fluxo

Após a indução de um organismo à triploidia, é necessário realizar a confirmação da ploidia. Para tanto, várias técnicas podem ser empregadas, como: citometria de fluxo, esfregaço sanguíneo, cariótipo, marcadores moleculares e análises histológicas (Lutz, 2003; Dunham, 2004).

A citometria de fluxo é uma técnica moderna e uma das ferramentas mais confiáveis para a confirmação da triploidia em peixes. Essa técnica baseia-se na quantificação relativa do conteúdo de DNA nuclear em células isoladas, geralmente eritrócitos nucleados, comparando-se indivíduos presumivelmente triploides com diploides de referência (Benfey, 1999; do Nascimento et al., 2024).

Para tal, a amostra, composta por suspensões nucleares, é corada com fluorocromos específicos para DNA (como iodeto de propídeo, DAPI ou hoechst 33342), e o conteúdo genético presente nos núcleos celulares isolados são quantificados individualmente em um citômetro de fluxo, que mede a intensidade da fluorescência emitida. Em indivíduos triploides, observa-se um aumento de aproximadamente 1,5 vezes na intensidade média de fluorescência em relação aos diploides, refletindo a presença de três conjuntos cromossômicos ($3n$) em vez de dois ($2n$) (Benfey, 2016).

Essa metodologia apresenta várias vantagens: é rápida, reprodutível, requer pequena quantidade de amostra, e permite a análise de um grande número de células, fornecendo evidência estatística robusta. Além disso, pode ser aplicada em diferentes tecidos (sangue, brânquias, fígado, rins, etc.), inclusive em amostras de larvas inteiras e juvenis, nos quais o cariótipo, técnica de citogenética clássica, descrita abaixo, seria impraticável devido ao tamanho dos animais (Huergo e Zaniboni-Filho, 2006; Linhart et al., 2001). Com isso, a citometria se torna imprescindível na detecção precoce da ploidia dos animais.

Estudos realizados com espécies como salmão-do-atlântico (*Salmo salar*), truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), jundiá (*Rhamdia quelen*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e matrinxã (*Brycon amazonicus*) demonstram a eficiência da citometria de fluxo para confirmar a triploidia induzida por choques térmicos, de pressão ou químicos (Teskeredzic et al., 1993; do Nascimento et al., 2024) (Tabela 2). Em muitos casos, a técnica é utilizada em conjunto com análises morfométricas de eritrócitos e cariotipagem, reforçando a confiabilidade dos resultados. Assim, a citometria de fluxo consolidou-se como método padrão para a verificação

da ploidia em programas de pesquisa, melhoramento genético e biossegurança em aquicultura (Benfey, 1999; do Nascimento et al., 2024).

Tabela 2. Espécies de peixes em que a triploidia foi confirmada por citometria de fluxo.

Espécie	Nome comum	Método de indução	Método de confirmação	Referência
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmão coho	Choque térmico e pressão	Citometria de fluxo	Teskeredzic et al., 1993
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta-arco-íris	Choque térmico e pressão	Citometria de fluxo	Benfey, 1999
<i>Silurus glanis</i>	Bagre-europeu	Choque térmico e pressão	Citometria de fluxo+ Contagem cromossômica + esfregaço sanguíneo	Linhart et al., 2001
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa comum	Choque térmico	Citometria de fluxo	Tiwary et al., 2004
<i>Rhamdia quelen</i>	Jundiá	Pressão hidrostática	Citometria de fluxo e contagem cromossômica	Huergo e Zaniboni-Filho, 2006
<i>Salmo salar</i>	Salmão-do-Atlântico	Choque de pressão	Citometria de fluxo + morfometria de eritrócitos	Benfey, 2016
<i>Brycon amazonicus</i> ; <i>Astyanax altiparanae</i> ; <i>Prochilodus lineatus</i> ; <i>Pimelodus maculatus</i>	Matrinxã; Lambari-tambuí; Curimbatá Mandi-amarelo	Choque térmico	Citometria de fluxo + esfregaço sanguíneo	do Nascimento et al., 2021 e 2024
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia-do-Nilo	Choque térmico	Citometria de fluxo e histologia gonadal	Menezes et al., 2024.

2.3.2. Confirmação da triploidia por esfregaço sanguíneo

A identificação de peixes triploides é realizada principalmente por método citogenético. Entretanto, a morfometria de eritrócitos obtida por meio de esfregaços sanguíneos representa uma abordagem confiável, de baixo custo e não letal para triagem (Benfey, 1984; Garcia-Abiado et al., 1999; Espinosa et al., 2005; Cal et al., 2010; Fukushima et al., 2012). Peixes triploides geralmente apresentam eritrócitos de maior tamanho em comparação aos diploides, devido ao aumento do conteúdo genômico. Em muitos estudos, o esfregaço sanguíneo é utilizado isoladamente ou em conjunto com técnicas complementares, como a citometria de fluxo, a contagem cromossômica (análise de cariótipo), para aumentar a precisão da confirmação da triploidia (Benfey et al., 1984; Fukushima et al., 2012).

A avaliação da triploidia por medição do tamanho das células sanguíneas vermelhas tem sido aplicada em várias espécies de teleósteos. Por exemplo, *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-

íris) e *Salmo salar* (salmão-do-Atlântico) foram analisados por morfometria de eritrócitos e citometria de fluxo após indução de triploidia por choque térmico ou pressão hidrostática (Benfey e Sutterlin, 1984; Johnson e Utter, 1986; Benfey, 1999). No Brasil, espécies nativas e exóticas também têm sido alvo de estudos: *Rhamdia quelen* (jundiá), *Pimelodus maculatus* (mandi-amarelo), *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), *Brycon amazonicus* (matrinxã) e *Colossoma macropomum* (tambaqui) tiveram a triploidia confirmada por esfregaço sanguíneo, frequentemente combinada com citometria de fluxo ou análise citogenética (Huergo e Zamboni Filho, 2006; Fukushima et al., 2012; do Nascimento et al., 2017, 2021).

Esse método tem sido aplicado com sucesso em diversas espécies como ferramenta auxiliar ou confirmatória para o diagnóstico da triploidia, conforme resumido na tabela 3.

Tabela 3. Espécies de peixes cuja triploidia foi confirmada ou indicada por esfregaço sanguíneo (morfometria eritrocitária).

Espécie	Nome comum	Método de confirmação	Método de indução da triploidia	Referência
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	Esfregaço sanguíneo	Choque térmico a frio	Benfey e Sutterlin, 1984
<i>Salmo salar</i>	Salmão-do-Atlântico	Esfregaço sanguíneo + citometria de fluxo	Choque de pressão hidrostática	Johnson e Utter, 1986
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa comum	Esfregaço sanguíneo	Choque térmico	Cherfas e Gomelsky, 1994
<i>Salmo salar</i>	Salmão-do-Atlântico	Esfregaço sanguíneo	Choque de pressão	Benfey, 1999
<i>Silurus glanis</i>	Bagre-europeu	Esfregaço sanguíneo + citometria de fluxo	Choque térmico e pressão	Linhart et al., 2001
<i>Rhamdia quelen</i>	Jundiá	Esfregaço sanguíneo	Choque térmico	Fukushima et al., 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	Esfregaço sanguíneo	Choque de pressão	Berrill et al., 2012
<i>Pimelodus maculatus</i>	Mandi-amarelo	Esfregaço sanguíneo + citogenética	Choque térmico a frio	do Nascimento et al., 2017
<i>Brycon amazonicus</i>	Matrinxã	Esfregaço sanguíneo + citometria de fluxo	Choque térmico	do Nascimento et al., 2021 e 2024
<i>Thymallus thymallus</i>	Grayling europeu	Esfregaço sanguíneo +	Pressão hidrostática	Rożyński et al., 2025.

2.3.3. Confirmação da triploidia por cariótipo

A confirmação da triploidia em peixes tem sido amplamente documentada na literatura, utilizando principalmente métodos citogenéticos e citométricos associados à morfometria de

eritrócitos (Benfey, 1984; Garcia-Abiado et al., 1999; Tiwary et al., 2004; Cal et al., 2010; Fukushima et al., 2012). Esses procedimentos permitem distinguir de forma confiável indivíduos diploides e triploides, uma vez que a presença de um conjunto cromossômico adicional (3n) resulta em alterações celulares e nucleares facilmente detectáveis (Benfey, 1999; Linhart et al., 2001). No jundiá (*Rhamdia quelen*), a indução por pressão hidrostática gerou indivíduos triploides confirmados por contagem cromossômica (Huergo e Zaniboni-Filho, 2006). Resultados semelhantes foram observados em *Brycon amazonicus* (matrinxã), submetido a choque térmico e confirmado por cariotipagem (do Nascimento et al., 2021), e no tambaqui (*Colossoma macropomum*), no qual tanto choques térmicos quanto de pressão hidrostática resultaram em sucesso na indução (Sato et al., 2020).

Outras espécies de interesse aquícola incluem a carpa comum (*Cyprinus carpio*), o bagre europeu (*Silurus glanis*), o salmão coho (*Oncorhynchus kisutch*) e o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), todas com triploidia confirmada por cariótipo após indução térmica ou por pressão (Teskeredzic et al., 1993; Linhart et al., 2001; Rehulka et al., 2004; Perera et al., 2016).

A cariotipagem permanece o método clássico para confirmação da triploidia (Tabela 4), embora análises complementares, como a morfometria de eritrócitos e a citometria de fluxo, sejam amplamente utilizadas como ferramentas preliminares ou confirmatórias.

Tabela 4. Espécies de peixes em que a triploidia foi confirmada por cariótipo.

Espécie	Método de Indução	Método de Confirmação (Cariótipo)	Referência
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (salmão coho)	Choque térmico e pressão	Cariótipo (2n=60, 3n=90)	Teskeredzic et al., 1993
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truta arco-íris)	Choque térmico e pressão	Cariótipo (2n=60, 3n=90)	Benfey, 1999; Berrill et al., 2012
<i>Silurus glanis</i> (bagre europeu)	Pressão hidrostática e choque térmico	Cariótipo (2n=64, 3n=96)	Linhart et al., 2001
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa comum)	Choque térmico	Cariótipo (2n=100, 3n=150)	Rehulka et al., 2004
<i>Rhamdia quelen</i> (jundiá)	Pressão hidrostática	Cariótipo (2n=58, 3n=87)	Huergo e Zaniboni-Filho, 2006
<i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia-do-Nilo)	Choque térmico	Cariótipo (2n=44, 3n=66)	Martins et al., 2008
<i>Ictalurus punctatus</i> (bagre-do-canal)	Transplante celular e pressão	Cariótipo (2n=58, 3n=87)	Perera et al., 2016
<i>Salmo salar</i> (salmão-do-atlântico)	Choque de pressão	Cariótipo (2n=58, 3n=87)	Benfey, 2016
<i>Pimelodus maculatus</i> (mandi-amarelo)	Pressão hidrostática	Cariótipo (2n=56, 3n=84)	do Nascimento et al., 2017

<i>Brycon amazonicus</i> (matrinxã)	Choque térmico (calor)	Cariótipo (2n=50, 3n=75)	do Nascimento et al., 2021
<i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui)	Choque térmico e pressão hidrostática	Cariótipo (2n=54, 3n=81)	Sato et al., 2020;

2.3.4. Confirmação da triploidia por Marcadores moleculares

A confirmação molecular da triploidia em peixes representa um avanço significativo nas ferramentas de diagnóstico genético disponíveis para a aquicultura moderna. Conforme descrito anteriormente, diferentes métodos morfológicos e citogenéticos, como a contagem cromossômica, citometria de fluxo e morfometria de eritrócitos, têm sido amplamente utilizados. No entanto, o uso de marcadores moleculares vem ganhando destaque por sua precisão, rapidez e aplicabilidade em grandes amostras.

Entre os principais marcadores empregados destacam-se os microssatélites (SSR), que permitem detectar o trialelismo (presença de três alelos em um mesmo loco), considerado um forte indicador genético de triploidia. Essa abordagem foi aplicada com sucesso em espécies como *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo salar* (Benfey et al., 2010; Franěk et al., 2016).

Outros métodos, como AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado), RAPD (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico) e SNPs (Polimorfismo de Nucleotídico Único), também têm sido utilizados para identificar padrões genômicos compatíveis com a triploidia, mostrando variações no número de cópias gênicas e maior diversidade alélica (Tiway et al., 2004; Christensen et al., 2019). Além disso, técnicas citogenômicas, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), permitem a visualização direta do número de cromossomos, oferecendo uma confirmação inequívoca da condição triploide (Fujimoto et al., 2017). Assim, os marcadores moleculares se consolidam como ferramentas essenciais na validação genética da triploidia. Essas abordagens moleculares vêm sendo amplamente aplicadas em espécies de importância aquícola, como truta (*Oncorhynchus mykiss*), salmão (*Salmo salar*), carpa (*Cyprinus carpio*), tilápia (*Oreochromis niloticus*), e matrinxã (*Brycon amazonicus*), consolidando seu papel na validação genética da triploidia e no controle da esterilidade reprodutiva em programas de melhoramento genético (Teskeredzic et al., 1993; do Nascimento et al., 2021). (Tabela 5).

Tabela 5. Marcadores moleculares utilizados na confirmação da triploidia em diferentes espécies de peixes.

Espécie	Nome comum	Marcador molecular utilizado	Evidência molecular observada	Referência
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa comum	RAPD e AFLP	Perfis genéticos com fragmentos adicionais indicativos de genoma triploide	Tiwary et al., 2004
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	Microsatélites (SSR)	Presença de três alelos por loco (trialelismo) confirmando triploidia	Benfey et al., 2010
<i>Rhamdia quelen</i>	Jundiá	Microsatélites e RAPD	Marcadores revelaram alta heterozigosidade e presença de três alelos	Fukushima et al., 2012
<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre-do-canal	AFLP	Perfis moleculares consistentes com três cópias genômicas	Perera et al., 2016
<i>Pimephales promelas</i>	Peixinho-gordo	FISH (Fluorescent in situ hybridization)	Visualização direta de três conjuntos cromossômicos	Fujimoto et al., 2017
<i>Salmo salar</i>	Salmão-do-Atlântico	SNPs e microsatélites	Padrões de trialelismo e variação alélica compatíveis com três conjuntos cromossômicos	Christensen et al., 2019
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmão coho	SNPs	Três alelos detectados em loci específicos	Christensen et al., 2019
<i>Brycon amazonicus</i>	Matrinxã	Microsatélites (SSR)	Alelos múltiplos por loco compatíveis com triploidia induzida por choque térmico	do Nascimento et al., 2021

2.3.5. Esterilidade em peixes triploides

A triploidia em peixes, caracterizada pela presença de três conjuntos de cromossomos (3n) e é amplamente estudada na aquicultura como uma estratégia para controle reprodutivo e para a melhoria do desempenho zootécnico. Sua principal consequência é a esterilidade, resultante da incapacidade dos cromossomos triploides formarem pares homólogos durante a meiose, o que inviabiliza a produção de gametas funcionais (Felip et al., 2001; Carman et al., 2023). A verificação dessa condição é frequentemente realizada por meio da análise histológica das gônadas, que permite observar as alterações morfofuncionais associadas à triploidia.

Em peixes marinhos, como o robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), estudos clássicos demonstraram que machos triploides apresentam espermatogênese severamente comprometida, com interrupção da meiose e ausência de espermatozoides maduros, enquanto fêmeas exibem ovários rudimentares contendo apenas oogônias em prófase I (Felip et al., 2001). Na trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), achados semelhantes foram descritos, nas quais as gônadas

triploides são delgadas e pouco desenvolvidas, com ovócitos imaturos e ausência de gametas funcionais (Panasiak et al., 2023).

Em espécies de peixes de água doce, estudos recentes reforçam esses padrões. Por exemplo, em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a análise histológica mostrou que a triploidia leva à completa inibição da gametogênese, resultando em gônadas pequenas, com ausência de espermátócitos e oócitos maduros (Carman et al., 2023; Menezes et al., 2024). Outro exemplo semelhante foi observado em lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), espécie neotropical utilizada como modelo laboratorial, na qual gônadas triploides apresentaram oogônias e espermátócitos primários, mas sem formação de gametas (do Nascimento et al., 2017).

Nos peixes-gato siameses (*Pangasianodon hypophthalmus*), a triploidia resultou em testículos com predominância de espermátócitos e ausência de espermatozóides, enquanto as fêmeas exibiram ovários compostos majoritariamente por oócitos pré-vitelogênicos (Ibrahim et al., 2017).

Peixes de regiões temperadas, como trutas-marrons (*Salmo trutta*) e graylings europeus (*Thymallus thymallus*), também apresentam alterações gonadais típicas, com bloqueio na espermátogênese e na ovogênese (Rożyński et al., 2025). Entretanto, há registros de esterilidade parcial ou reversão tardia, visto que alguns indivíduos triploides de *Salmo trutta* desenvolveram gônadas funcionais e produziram gametas após três a cinco anos de idade (Lahnsteiner e Dünser, 2024).

Em espécies tropicais nativas, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), a triploidia pode ser induzida por choques térmicos e identificada por citogenética, mas os efeitos histológicos ainda são pouco documentados, sendo observada apenas a fase inicial da diferenciação gonadal (Sato et al., 2020).

Além de seu valor científico, a produção de peixes triploides estéreis apresenta importância prática para a aquicultura moderna, pois impede a reprodução indesejada em cativeiro e reduz o risco de impacto genético sobre populações selvagens, sem comprometer o desempenho produtivo (Derayat et al., 2013; Przybył et al., 2022). Assim, a integração entre indução controlada de triploidia e verificação histológica constitui uma abordagem essencial para o manejo reprodutivo sustentável de espécies aquícolas. A tabela 6 apresenta os trabalhos analisados com foco na histologia gonadal de diversas espécies marinhas e de água doce.

Tabela 6. Espécies de peixes em que a triploidia afetou o desenvolvimento gonadal.

Espécie (Nome científico)	Tipo de ploidia / comparação	Técnica(s) utilizada(s)	Principais achados histológicos nos indivíduos triploides	Referência
<i>Dicentrarchus labrax</i> (robalo-europeu)	Diploide × Triploide	Histologia gonadal + dosagem hormonal	Espermatogênese severamente comprometida; Ovários rudimentares, oogônias em prófase I bloqueadas.	Felip et al., 2001.
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa comum – Índia)	Triploide induzido	Histologia gonadal + IGS	O desenvolvimento das gônadas em fêmeas (3N) é menor do que em machos (3N), invertendo a situação geral em diploides, onde os valores de IGS são mais altos em fêmeas maduras.	Basavaraju et al., 2002.
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa comum)	Triploide (GH-transgênica)	Histologia gonadal	Gônadas estéreis em machos e fêmeas, sem gametas maduros; crescimento acelerado.	Yu et al., 2011.
<i>Gadus morhua</i> (bacalhau do Atlântico)	Diploide × Triploide	Desenvolvimento gonadal e crescimento	Machos e fêmeas triploides apresentaram atraso e subdesenvolvimento gonadal.	Derayat et al., 2013.
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truta arco-íris)	Diploide × Triploide	Histologia de ovários + citogenética	Gônadas finas e imaturas em fêmeas triploides; ausência de oócitos maduros.	Panasiak et al., 2023.
<i>Astyanax altiparanae</i> (lambari-amarelo)	Diploide × Triploide	Histologia gonadal + Estereologia	Ausência de gametas maduros em machos e fêmeas adultos.	do Nascimento et al., 2017.
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (peixe-gato siamês)	Diploide × Triploide	Histologia gonadal + GSI	Fêmeas triploides com ovários rudimentares; machos sem espermatogênese completa.	Ibrahim et al., 2017.
<i>Carassius gibelio</i> (carpa gibel)	Diploide × Triploide	Histologia gonadal + dosagem de esteroides	Gametogênese em machos e fêmeas anormal e níveis hormonais reduzidos em triploides.	Przybył et al., 2022.
<i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia-do-Nilo)	Diploide × Triploide	Histologia gonadal + GSI	Machos e fêmeas triploides apresentaram gônadas pequenas e imaturas; ausência de gametas funcionais.	Carman et al., 2023.
<i>Salmo trutta</i> (truta marrom)	Diploide × Triploide	Histologia gonadal	Triploides machos e fêmeas são parcialmente férteis; 10–17% produziram gametas aos 3–5 anos. Triploides introduzidos em águas naturais ou que escapam podem cruzar com seus equivalentes diploides. Isso não apenas altera os genótipos das populações locais, mas também modifica os níveis de ploidia.	Lahnsteiner e Dünser, 2024.

<i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia-do-Nilo)	Triploide	Histologia gonadal	Observada instabilidade cromossômica e desenvolvimento parcial de gametas em machos e fêmeas.	Menezes et al., 2024.
<i>Thymallus thymallus</i> (grayling europeu)	Diploide × Triploide	Histologia gônadal + hematologia	Fêmeas triploides: ausência de oócitos desenvolvidos; testículos sem espermição.	Rożyński et al., 2025.

2.4. PARÂMETROS HEMATOLÓGICAS EM PEIXES

As análises hematológicas têm sido amplamente utilizadas como ferramentas fundamentais para a avaliação do estado fisiológico e sanitário dos peixes (Tavares-Dias e Moraes, 2004; Hrubec e Smith, 2010; Ranzani-Paiva et al., 2013; Fazio, 2019). Esses parâmetros fornecem informações detalhadas sobre a saúde, o metabolismo e a capacidade adaptativa dos organismos frente a condições ambientais e de manejo. A composição do sangue reflete respostas fisiológicas a fatores como temperatura, oxigênio dissolvido, densidade de estocagem, alimentação e presença de patógenos, sendo, portanto, um indicador sensível de estresse e bem-estar em peixes cultivados (Tavares-Dias e Moraes, 2004; Fazio, 2019).

De modo geral, as variáveis hematológicas mais comumente avaliadas incluem a concentração de hemoglobina (Hb), o hematócrito (Ht), a contagem de eritrócitos (RBC) e leucócitos (WBC), além de parâmetros bioquímicos associados, como glicose, albumina, globulina, proteínas plasmáticas e colesterol (Hrubec e Smith, 2010). Alterações nesses índices podem indicar distúrbios fisiológicos, infecciosos ou metabólicos, sendo ferramentas de diagnóstico complementares na aquicultura intensiva.

Diversas espécies de peixes já tiveram seus perfis hematológicos descritos em condições naturais ou experimentais. Entre as espécies neotropicais de interesse aquícola, destacam-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o jundiá (*Rhamdia quelen*), que apresentam valores hematológicos de referência amplamente utilizados em estudos fisiológicos e toxicológicos (Tavares-Dias, 2015; Santos et al., 2022). O tambaqui, por exemplo, apresenta características hematológicas compatíveis com alta resistência à hipóxia, exibindo aumento no hematócrito e na concentração de hemoglobina quando submetido a baixos níveis de oxigênio (Ribeiro et al., 2020).

Em espécies exóticas amplamente cultivadas, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), as análises hematológicas têm sido aplicadas para monitorar o impacto do estresse térmico, qualidade da água e densidade de estocagem (Akinrotimi et al., 2021). Em salmonídeos

(*Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*), parâmetros como o hematócrito, a glicemia e o leucograma são amplamente utilizados como indicadores de desempenho fisiológico e resposta imune em sistemas de cultivo intensivo (Sandnes et al., 1988; Fazio, 2019).

Além disso, peixes marinhos e estuarinos, como a dourada (*Sparus aurata*) e o barramundi (*Lates calcarifer*), têm sido alvo de estudos hematológicos para a compreensão das respostas fisiológicas ao transporte, salinidade e manipulação, contribuindo para o aprimoramento das práticas de manejo (Faggio et al., 2014; Abdullah et al., 2020).

Portanto, o estudo dos parâmetros hematológicos em diferentes espécies de peixes é uma ferramenta que permite a compreensão das respostas fisiológicas, diagnóstico de distúrbios e otimização das condições de cultivo. A padronização e ampliação dessas análises em espécies nativas brasileiras representam um avanço significativo para a consolidação da aquicultura sustentável no país.

2.5. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM PEIXES

As análises bioquímicas sanguíneas representam uma das ferramentas importantes na avaliação do estado fisiológico, metabólico e sanitário dos peixes (Tavares-Dias e Moraes, 2004; Hrubec e Smith, 2010; Fazio, 2019; Abdullah et al., 2020). Esses parâmetros fornecem informações detalhadas sobre o funcionamento de órgãos vitais, como fígado, rins e músculos, além de refletirem as respostas do organismo frente a fatores de estresse ambiental, nutricional e de manejo (Tavares-Dias, 2015; Fazio, 2019). Assim como os exames hematológicos, as análises bioquímicas têm sido amplamente utilizadas na aquicultura como indicadores de bem-estar e saúde dos peixes cultivados.

Os principais parâmetros bioquímicos avaliados incluem a glicose plasmática, utilizada como marcador de estresse agudo; as proteínas totais, relacionadas à capacidade imunológica e estado nutricional; e os lipídios sanguíneos, como colesterol e triglicerídeos, associados ao metabolismo energético e à nutrição (Hrubec e Smith, 2010; Abdullah et al., 2020). Além disso, as enzimas hepáticas — principalmente a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) — são amplamente empregadas como indicadores de integridade hepática e de alterações metabólicas causadas por agentes tóxicos ou condições ambientais adversas (Ghiraldelli et al., 2006; Faggio et al., 2014).

Em espécies nativas da América do Sul, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o pirarucu (*Arapaima gigas*), estudos bioquímicos têm sido

fundamentais para estabelecer valores de referência e compreender as respostas fisiológicas a variações ambientais, como temperatura, oxigênio dissolvido e densidade de estocagem (Ribeiro et al., 2020; Santos et al., 2021). O tambaqui, por exemplo, apresenta aumento significativo na glicose e nas enzimas hepáticas (AST e ALT) quando exposto a situações de hipóxia ou manuseio intenso, indicando ativação da glicogenólise e do metabolismo anaeróbico como resposta compensatória (Santos et al., 2022).

Em peixes de cultivo global, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), as análises bioquímicas têm sido utilizadas para avaliar o efeito de variações de temperatura, qualidade da água e salinidade sobre o metabolismo energético e osmótico. A elevação da glicose e a redução das proteínas totais são frequentemente associadas a respostas de estresse agudo, enquanto o aumento de íons plasmáticos (Na^+ , K^+ e Cl^-) pode indicar distúrbios osmóticos (Akinrotimi et al., 2021).

Em espécies de clima temperado, como o salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) e a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a avaliação bioquímica é uma prática rotineira no monitoramento sanitário, sendo parâmetros como glicose, colesterol, triglicerídeos e cortisol amplamente empregados para diagnosticar respostas ao estresse, eficiência metabólica e desempenho produtivo (Sandnes et al., 1988; Fazio, 2019). De forma semelhante, em peixes marinhos e estuarinos, como a dourada (*Sparus aurata*) e o barra mundi (*Lates calcarifer*), o perfil bioquímico tem sido utilizado para investigar a adaptação osmótica e a resposta fisiológica ao confinamento e transporte (Faggio et al., 2014; Abdullah et al., 2020).

A importância das análises bioquímicas na aquicultura moderna reside na sua capacidade de fornecer informações rápidas e precisas sobre a condição fisiológica dos peixes, permitindo a detecção precoce de distúrbios antes que ocorram manifestações clínicas ou perdas zootécnicas. Além disso, esses parâmetros têm papel central em estudos que envolvem biotecnologias aplicadas, como indução de triploidia, manipulação genética e avaliação de contaminantes ambientais, pois auxiliam na verificação de possíveis efeitos sub letais sobre o metabolismo e a função hepática (Santos et al., 2022).

Dessa forma, o conhecimento dos valores bioquímicos de referência e de suas variações interespecies constitui um passo essencial para o desenvolvimento sustentável da aquicultura. A padronização desses parâmetros em espécies nativas brasileiras, ainda escassamente estudadas, representa uma contribuição significativa para a fisiologia comparada de peixes tropicais e para o aprimoramento das práticas de manejo e bem-estar animal.

3. JUSTIFICATIVA

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi a primeira espécie de peixe nativo amazônico a atrair atenção significativa de pesquisadores (ecólogos, biólogos pesqueiros, fisiologistas) e aquicultores, devido ao seu elevado valor econômico e ecológico (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Atualmente, é a espécie nativa de maior destaque na piscicultura nacional (Peixe Br, 2025). No entanto, a cadeia produtiva ainda se baseia em práticas convencionais de cultivo, o que evidencia a necessidade de pesquisas aplicadas voltadas ao desenvolvimento de tecnologias inovadoras adaptadas especificamente para a espécie. Além disso, a produção de tambaqui puro vem apresentando declínio anual, resultado da escassez de soluções tecnológicas que permitam ampliar a produtividade de forma eficiente.

Dessa forma, o desenvolvimento, validação e aplicação de novas tecnologias no cultivo do tambaqui constituem elementos estratégicos, considerando que seus estoques naturais estão ameaçados, a produção atual não supre a demanda interna e que a espécie apresenta elevado potencial de inserção no mercado internacional.

A presente tese teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente para a obtenção de tambaqui triploide, avaliando de forma integrada os impactos da triploidia sobre a puberdade e o bem-estar animal. Nesse contexto, a caracterização detalhada do desempenho reprodutivo, fisiológico e produtivo dos tambaquis triploides ($3n$) representa um avanço científico e tecnológico, fornecendo subsídios para estratégias de manejo e aplicação da tecnologia na consolidação da piscicultura nativa brasileira.

A escolha do tema justifica-se pela relevância econômica e social da espécie e pela necessidade de soluções biotecnológicas que permitam aumentar a produtividade de forma sustentável. O aproveitamento das características naturais do tambaqui, aliado a programas de melhoramento genético e à aplicação da triploidia, pode favorecer a intensificação da produção, acelerando a obtenção de produtos com maior qualidade, competitividade e sustentabilidade.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Produzir tambaqui triploide através do choque de pressão hidrostática e avaliar a puberdade, o bem estar e parâmetros biométricos destes peixes.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo de produção de tambaqui triploides com um índice mínimo 70% de triploidia.
- Confirmar a triploidia em tambaqui através de diferentes análises.
- Caracterizar a incidência (ou não) da puberdade em tambaquis triploides através da avaliação histológica das gônadas;
- Avaliar o bem estar do tambaqui triploide.
- Avaliar os parâmetros biométricos do tambaqui triploide nos primeiros seis meses de vida.

5. REFERÊNCIAS

Abdullah, N., et al. (2019). Biochemical profiles of *Pangasius hypophthalmus* exposed to environmental fluctuations. *Aquaculture*, 502, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.045>

Abdullah, N., et al. (2020). Hematological and biochemical responses of *lates calcarifer* to environmental stressors. *Aquaculture Research*, 51, 312–320. <https://doi.org/10.1111/are.14200>

Akinrotimi, O.A., & Gabriel, U.U. (2021). Hematological responses of *Oreochromis niloticus* exposed to varying temperature regimes. *Journal of Aquatic Sciences*, 36(1), 1–10.

Akinrotimi, O.A., Gabriel, U.U., & Anyanwu, P.E. (2021). Physiological and biochemical responses of *Oreochromis niloticus* to handling stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47, 123–131. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00838-4>

Almeida, F.L., et al. (2016). Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, 452, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.010>

Amaral, A.C., et al. (submetido). Uso de esfregaço sanguíneo para avaliação de triploidia em *Colossoma macropomum*. Embrapa.

Amaral, A.C., Oliveira, R.G.S., & O’Sullivan, F.L.A. (2020). Avaliação de parâmetros reprodutivos do tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetido à indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa. *Acta Amazonica*, 50(4), 293–302. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000372>

Arai, K. (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197, 205–208. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00550-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00550-2)

Araújo-Lima, C.A., & Goulding, M. (1998). *Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá.

Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR). (2018). Semana do Peixe 2018: Peixe BR foca consumidor para aumentar consumo de peixe cultivado. *Seafood Brasil*. <https://www.seafoodbrasil.com.br/semana-peixe-2018-peixebr-foca-consumidor-para-aumentar-consumo-de-peixe-cultivado>

Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR). (2024). *Anuário Peixe BR da Piscicultura 2024*. Brasília: Peixe BR. https://www.aen.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2024-07/anuariopeixebr2024.pdf

Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR). (2025). *Anuário Peixe BR da Piscicultura 2025*. <https://peixebr.com.br/Anuario2025/AnuarioPeixeBR2025.pdf>

Baltieri, B., Peroni, F., & Araujo, R. (2025, May 22). Brazilian supermarkets see shift in consumer preferences from beef to chicken and eggs. *S&P Global*. <https://www.spglobal.com/commodity-insights/en/news-research/latest-news/natural-gas/052225-brazilian-supermarkets-see-shift-in-consumer-preferences-from-beef-to-chicken-and-eggs>.

Basavaraju, Y. M., Mair, G. C., Kumar, H. M., Kumar, S. P., Keshavappa, G. Y., & Penman, D. J. (2002). An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp, *Cyprinus carpio*, in Karnataka, India. *Aquaculture*, 204(3–4), 407–418. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00843-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00843-6)

Benfey, T.J. (1999). Triploidy in fish: Production, biology, and performance. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 1–23. <https://doi.org/10.1023/A:1008927419116>

Benfey, T.J. (2001). Induced triploidy in fish. In M.M.M. (Ed.), *Aquaculture research trends* (pp. 1–22). Nova Science Publishers.

Benfey, T.J., & Sutterlin, A.M. (1984). Triploid rainbow trout identified by erythrocyte measurements. *Progressive Fish-Culturist*, 46(3), 147–150. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1984\)46](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1984)46)

Benfey, T.J. (1984). Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41(10), 1411–1415. <https://doi.org/10.1139/f84-173>

Benfey, T.J., et al. (2010). Genetic markers for triploidy verification in fish: Microsatellites and triallelic loci. *Aquaculture Research*, 41(5), 723–734. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02371.x>

Benfey, T.J. (2016). Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 264–282. <https://doi.org/10.1111/raq.12074>

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., et al. (2004). Biochemical responses of *Rhamdia quelen* to environmental stressors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 139, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.07.008>

Borges, L.F.A. (2022). *Reprodução induzida de peixes nativos da Amazônia: avanços e desafios na biotecnologia reprodutiva*. Embrapa Amazônia Ocidental. <https://www.embrapa.br/amazonia-ocidental>

Borin, L.A., Martins-Santos, I.C., & Oliveira, C. (2002). A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): Mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. *Genética*, 115(3), 253–258.

Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). (2010). *Perfil do consumo de pescado no Brasil*. Brasília: MPA.

Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). (2014). *Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011*. Brasília: MPA. <https://www.gov.br/pt-br/servicos/boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura>

Buchtova, H., Smutna, M., Vorlova, L., Svobodova, Z., & Flajshans, M. (2004). Fatty acid composition of diploid and triploid populations of tench (*Tinca tinca* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 73(2), 235–245. <https://doi.org/10.2754/avb200473020235>

Carman, O., Isnansetyo, A., & Suryati, N. (2023). Reproductive performances of triploid male and female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Biodiversitas*, 24(6), 3456–3465. <https://scholar.unair.ac.id/en/publications/reproductive-performances-of-triploid-male-and-female-nile-tilapi>

Carvalho, F.S. (2016). *Aspectos reprodutivos e maturação gonadal do tambaqui (Colossoma macropomum) em cativeiro* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.

Cesar, M.P., Murgas, L.D.S., Araújo, R.V., & Drummond, C.D. (2004). Método para obtenção de população monossexo na piscicultura. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Boletim Agropecuário, 69, 27p.

Cherfas, N., & Gomelsky, B. (1994). Triploid carp: Induction and verification. *Aquaculture*, 120(1–2), 73–82. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90090-6)

Christensen, K.A., et al. (2019). Genomic tools for triploidy identification in aquaculture species. *Aquaculture*, 504, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.042>

Cal, R., Vidal, S., & Sánchez, L. (2010). Image cytometric measurements of diploid, triploid and tetraploid fish erythrocytes in blood smears reflect the true dimensions of live cells. *Fish Physiol. Biochem.*, **36**, 307–315. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9288-1>.

Derayat, A., Magnússon, Á., Steinarsson, A., & Björnsson, B. (2013). Growth and gonadal development in diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(5), 1195–1203. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9766-2>

Do Nascimento, N.F., de Siqueira-Silva, D.H., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Senhorini, J.A., Nakaghi, L.S.O. and Yasui, G.S., 2017. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote*, 25(4), pp.537-544.

Do Nascimento, A.L., et al. (2017). Esfregaço sanguíneo e citogenética em *Pimelodus maculatus* triploide. Universidade Estadual Paulista.

Do Nascimento, A.L., et al. (2021). Citometria de fluxo em *Brycon amazonicus* triploide. Universidade Estadual Paulista.

Do Nascimento, A.L., et al. (2021). Molecular markers for triploidy confirmation in matrinxã (*Brycon amazonicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*). Universidade Estadual Paulista.

Do Nascimento, N. F.; Santos-Silva, A. P.; Pereira-Santos, M.; Levy-Pereira, N.; Senhorini, J. A.; Yasui, G. S. (2024). Manual vs. automated erythrocyte assessment for polyploidy detection in neotropical fish: a comparative study. *Brazilian Journal of Biology (Online)*, 84, e278885. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.278885>

Dunham, R.A. (2004). *Aquaculture and fisheries biotechnology: Genetics Approaches*.

Embrapa Pesca e Aquicultura. (2025, fevereiro 26). Piscicultura brasileira apresenta aumento recorde nas exportações. *Embrapa – Notícias*. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/97664679/piscicultura-brasileira-apresenta-aumento-recorde-nas-exportacoes>

Embrapa Pesca e Aquicultura; Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR). (2025). *Informativo Comércio Exterior da Piscicultura – Edição 20*. Palmas: Embrapa. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1169997/1/InfComExPisci-20.pdf>

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Pesca e Aquicultura). (2024). *Informativo Comércio Exterior da Piscicultura – Edição 18*. Palmas: Embrapa. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1165865/1/InfComExPisci-18.pdf>

Espinosa, E., García-Vázquez, E., & Espinosa, G. (2005). Triploidy in rainbow trout determined by computer-assisted erythrocyte morphometry. *Aquac. Res.*, **36**(9), 868–873. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01297.x>

Etsuro Yamaha, T., Saito, R., Goto-Kazeto, R., & Arai, K. (2007). Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. *Journal of Sea Research*, 58(1), 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.02.003>

Faggio, C., et al. (2014). Haematological and biochemical response of *Sparus aurata* to handling and confinement stress. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, 123–130. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_14

FAO. (2009). *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISSN 1020-5489.

Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool for aquaculture: A review. *Aquaculture*, 500, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.033>

Feindel, N.J., Benfey, T.J., & Trippel, E.A. (2011). Gonadal development of triploid Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Fish Biology*, 79, 1900–1912. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03140.x>

Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., & Piferrer, F. (2001). Comparison of the gonadal development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Journal of Fish Biology*, 58(4), 920–932. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11550186/>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2010). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. Rome: FAO. <https://www.fao.org/4/i1820e/i1820e00.htm>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2024). *Global fisheries and aquaculture production reaches a new record high*. <https://www.fao.org/newsroom/detail/fao-report-global-fisheries-and-aquaculture-production-reaches-a-new-record-high>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2024). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue transformation in action*. Rome: FAO. <https://www.fao.org/publications/sofia/2024/en>

Franěk, R., et al. (2016). Microsatellite triallelic patterns as indicators of triploidy in salmonid fish. *Aquaculture International*, 24, 1125–1137. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0025-7>

Fujimoto, T., et al. (2017). Chromosome visualization using FISH for triploidy confirmation in fish. *Cytogenetic and Genome Research*, 152(3), 145–153. <https://doi.org/10.1159/000478891>

Fukushima, H., Ghiraldelli, L., Costa, J.M., & Fim, J.D.I. (2012). Triploidy in the hematology of jundia juveniles (*Rhamdia quelen*). *Braz. J. Biol.*, 72(4), 807–812. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842012000500009>

Fukushima, Y., Suzuki, K., & Tanaka, M. (2012). Morphometric analysis of erythrocytes for identification of triploid *Rhamdia quelen*. *Aquaculture Research*, 43(11), 1672–1680. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03196.x>

Garcia-Abiado, M.A.R., Morizot, D.C., Cnaani, A., & Rinchar, J. (1999). Use of erythrocyte measurements to identify triploid saugeyes. *N. Am. J. Aquac.*, 61(4), 319–324. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(1999\)061<0319:UOEMTI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(1999)061<0319:UOEMTI>2.0.CO;2)

Ghiraldelli, L., et al. (2006). Biochemical responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) to handling and capture stress. *Aquaculture Research*, 37, 284–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01453.x>

Glover, K.A., Lien, S., & McGinnity, P. (2013). The performance of triploids versus diploids in aquaculture. *Aquaculture International*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9652-5>

Goulding, M. (1981). *Man and fisheries on an Amazon frontier*. The Hague: Dr. W. Junk Publications.

Harvey, B., & Carolsfeld, J. (1993). *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: International Development Research Centre (IDRC).

Hrubec, T.C., & Smith, S.A. (2010). Hematology and plasma chemistry reference intervals for fish. In *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed.). Wiley-Blackwell.

Huergo, G.P.C.M., & Zaniboni Filho, E. (2006). Triploidy induction in jundiá, *Rhamdia quelen* through hydrostatic pressure. *Journal of Applied Aquaculture*, 18, 45–57. https://doi.org/10.1300/J028v18n01_05

Hyndman, C.A., Kieffer, J.D., & Benfey, T.J. (2003). The physiological response of diploid and triploid brook trout to exhaustive exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 134, 167–179. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00267-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00267-5)

Ibrahim, Y., Nguyen, N.H., et al. (2017). Triploid striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*): Growth performance and gonadal development. *AACL Bioflux*, 10(4), 744–757. <https://www.bioflux.com.ro/docs/2022.744-757.pdf>

Isaac, V.J., & Ruffino, M.L. (2000). Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992–1993. In C.F. Fischer (Ed.), *Recursos pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira* (pp. 225–280). Brasília: IBAMA/GTZ/GOPA.

Johnson, O.W., & Utter, F.M. (1986). Triploidy in Atlantic salmon: Verification by cytological and flow cytometric techniques. *Journal of Fish Biology*, 29(3), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05015.x>

Kerby, H., Everson, M., Harrell, M., Geiger, R., Starling, C., & Revels, H. (2002). Performance comparisons between diploid and triploid sunshine bass in freshwater ponds. *Aquaculture*, 211, 91–108. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00074-1)

Lahnsteiner, F., & Dünser, B. (2024). Triploid brown trout (*Salmo trutta*) develop functional gonads with age and are able to interbreed with diploid fish. *Reproductive Biology*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38553987/>

Le Comber, S.C., & Smith, C. (2004). Polyploidy in fishes: Patterns and processes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 431–442. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00347.x>

Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajshans, M., & Vandeputte, M. (2001). Comparison of methods for hatchery-scale triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 17, 247–255. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2001.00288.x>

Lobo, I.K.C., Nascimento, Á.R., Yamagishi, M.E.B., Guiguen, Y., Silva, G.F., Severac, D., Amaral, A.C., Reis, V.R., & Almeida, F.L. (2020). Transcriptome of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during gonad differentiation: Different molecular signals leading to sex identity. *Genomics*, 112(1), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.09.002>

Luis Maistro, E., Lucia Dias, A., Foresti, F., Oliveira, C., & Moreira Filho, O. (1994). Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. *Caryologia*, 47(3–4), 233–239. <https://doi.org/10.1080/00087114.1994.10797384>

Lutz, C.G. (2003). *Practical Genetics for Aquaculture*. London: Blackwell.

Madaro, A., Kjølglum, S., Hansen, T., Fjellidal, P.G., & Stien, L.H. (2021). A comparison of triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) performance and welfare under commercial farming conditions in Norway. *Journal of Applied Aquaculture*, 34(4), 1021–1035. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.1905413>

Mahmoudi, R., Keyvanshokoh, S., & Rezaei, M. (2025). Interactive effects of triploidy induction and culture densities on growth performance and stress, immune, and metabolic responses in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Reports*, 26, 100497. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2025.100497>

Manor, M.L., Weber, G.M., Salem, M., Yao, J., Aussanasuwannakul, A., & Kenney, P.B. (2012). Effect of sexual maturation and triploidy on chemical composition and fatty acid content of energy stores in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 356–357, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.034>

Martins, C.A., et al. (2008). Triploid induction in *Oreochromis niloticus*: Erythrocyte diameter as a morphological marker. *Aquaculture Research*, 39(7), 759–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01938.x>

Menezes, W.F., Santos, J.P., & Ribeiro, D.M. (2024). Growth performance, reproductive status, and chromosomal instability in triploid Nile tilapias. *Animal Reproduction*, 21(2), e20230147. <https://www.animal-reproduction.org/article/10.1590/1984-3143-AR2023-0147/pdf/animreprod-21-2-e20230147.pdf>

Nandeesh, M.C., Hossain, M.A., & Saha, M. (2018). Induced triploidy in fish: A review. *Aquaculture Research*, 49(6), 1841–1854. <https://doi.org/10.1111/are.13545>

Nascimento, N.F., Foresti, F., Senhorini, J.A., & Oliveira, C. (2017). Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote*, 25(6), 717–725. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000383>

NASCO. (2020). *NAC/NASCO Fish Health Guidelines*. North Atlantic Salmon Conservation Organization. <https://nasco.int/wp-content/uploads/2020/06/NAC9224.pdf>

Oliveira, R.G.S. (2020). *Avaliação de hormônios sintéticos na indução da desova de tambaqui (Colossoma macropomum) em cativeiro* (Tese de doutorado). Universidade Federal do Ceará. https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/76206/3/2024_tes_mlsapoliano.pdf

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) & Food and Agriculture Organization (FAO). (2024). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2024–2033*. OECD Publishing. https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2024/07/oecd-fao-agricultural-outlook-2024-2033_e173f332/4c5d2cfb-en.pdf

Panasiak, L., Kuciński, M., Hliwa, P., Pomianowski, K., & Ocalewicz, K. (2023). Telomerase activity in somatic tissues and ovaries of diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) females. *Cells*, 12(13), 1772. <https://doi.org/10.3390/cells12131772>

Peixe BR. (2020). *Anuário Peixe BR da piscicultura 2020*. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura.

Perera, D.A., Geng, Y., Huang, X., & Liu, W. (2016). Xenogenesis: Production of channel catfish × blue catfish hybrid progeny using germ cell transplantation into triploid recipients. *North American Journal of Aquaculture*, 78(4), 339–347. <https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1180760>

Peruzzi, S., et al. (2013). Growth and gonadal development in diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 410–411, 119–127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23412979/>

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.C., Flajshans, M., Haffray, P., & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293, 125–156. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.023>

Przybył, A., Juchno, D., Przybylski, M., Leska, A., Nowosad, J., Kucharczyk, D., & Boroń, A. (2022). Sex steroids in diploid and triploid gibel carp (*Carassius gibelio*) of both sexes in different phases of the reproductive cycle. *Animal Reproduction Science*, 244, 107053. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107053>

Puruzzi, S., Chatain, B., Saillant, E., Haffray, P., Menu, B., & Falguière, J. (2004). Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Performances, maturation and carcass quality. *Aquaculture*, 230, 41–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.022>

Rehulka, J., et al. (2004). Triploid common carp verified by erythrocyte size and karyotyping. *Aquaculture*, 238(1–4), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.010>

Reis, M.S. (2016). *Efeitos da ausência de estímulos ambientais sobre a maturação gonadal de fêmeas de tambaqui (Colossoma macropomum) mantidas em cativeiro* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Brasil.

Ribeiro, C.S., Gomes, A.D., Vieira, V.A.R.O., Tabata, Y.A., Takahashi, N.S., & Moreira, R.G. (2012). The effect of ploidy on the fatty acid profile during the reproductive cycle of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 20, 1117–1137. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9526-2>

Ribeiro, F.A.S., et al. (2020). Hematological parameters and stress responses of *Colossoma macropomum* under low dissolved oxygen. *Aquaculture Reports*, 18, 100432. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100432>

Rożyński, R., Kujawa, R., Kucharczyk, D., et al. (2025). The effect of triploidy on gonadal development, hematological and biochemical parameters in European grayling (*Thymallus thymallus*). *Animals*, 15(4), 481. <https://www.mdpi.com/2076-2615/15/4/481>

Sadler, J., Wells, R.M.G., Pankhurst, P.M., & Pankhurst, N.W. (2000). Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 184, 349–361. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00341-2)

Sandnes, K., Lie, Ø., & Waagbø, R. (1988). Normal ranges of blood chemistry parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Biology*, 32, 129–136. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05471.x>

Santos, A.L., et al. (2022). Hematological and biochemical responses of *Colossoma macropomum* under different management conditions. *Aquaculture Reports*, 24, 101144. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101144>

Santos, G. M., Ferreira, E. J. G., & Zuanon, J. A. S. (2006). *Peixes comerciais de Manaus*. In: Geraldo (Ed.). Manaus: IBAMA/AM, ProVárzea. 144 p. ISBN 85-7300-211-5.

Santos, J.A., et al. (2021). Physiological indicators in *Arapaima gigas* reared in captivity. *Aquaculture*, 531, 735861. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735861>

Sato, L.S., Ribeiro, D.M., & Nakaghi, L.S.O. (2020). Triploidy in tambaqui (*Colossoma macropomum*) identified by chromosomes of fish larvae. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 9(5), 188–192. <https://medcraveonline.com/JAMB/triploidy-in-tambaqui-colossoma-macropomum-identified-by-chromosomes-of-fish-larvae.html>

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., & Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biology of Reproduction*, 78(1), 159–166. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060038>

Schafhauser-Smith, D., & Benfey, T.J. (2001). The reproductive physiology of three age classes of adult female diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 25(4), 319–333. <https://doi.org/10.1023/A:1023285008072>

Silva, M., et al. (2011). Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguacu basin, southern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 91(3), 361–366. <https://doi.org/10.1007/s10641-011-9853-3>

Soares, M. G. M., Costa, E. L., Siqueira-Souza, F. K., Anjos, H. D. B., Yamamoto, K. C., & Freitas, C. E. C. (2007). *Peixes de lagos do Médio Rio Solimões* (2^a ed., rev.). Manaus: Instituto I-Piatam. 160 p. ISBN 85-7401-264-3.

Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., & Hausen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 483–515. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004>

Tavares-Dias, M. (2015). Hematological and biochemical parameters of Brazilian teleost fish: A review. *Brazilian Journal of Biology*, 75(1), 169–174. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.09013>

Tavares-Dias, M., & Moraes, F.R. (2004). Hematological and biochemical reference values for Brazilian fish species. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3), 377–384. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842004000300003>

Tebaldi, P.C., & Amaral Junior, H. (2009). Production of tetraploid Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the application of thermal shock. *Aquaculture Research*, 40, 146–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02025.x>

Teskeredzic, E., Donaldson, E.M., Teskeredzic, Z., Solar, I., & McLean, E. (1993). Comparison of hydrostatic pressure and thermal shocks to induce triploidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 57, 57–64. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90233-R](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90233-R)

Thorgaard, G.H. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish. In W.S. Hoar, D.J. Randall, & E.M. Donaldson (Eds.), *Fish Physiology* (pp. 405–434). Academic Press.

Tiwary, B.K., et al. (2004). AFLP, RAPD, and SNP markers for the detection of triploidy in fish. *Aquaculture*, 237, 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.020>

Turner, N., Else, P.L., & Hulbert, A.J. (2003). Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: Implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften*, 90, 521–523. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0463-1>

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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.011>

Vieira, E.F., Isaac, V.J., & Fabre, N.N. (1999). Biologia reprodutiva de peixes da Amazônia: padrões de desova e estratégias adaptativas. *Acta Amazonica*, 29(4), 503–520. <https://doi.org/10.1590/1809-43921999294520>

Vieira, E.F., Isaac, V.J., & Fabré, N.N. (1999). Biologia reprodutiva do tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Teleostei: Serrasalminidae), no Baixo Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 29, 625–638. <https://doi.org/10.1590/1809-43921999294520>

Villacorta-Correa, M.A., & Saint-Paul, U. (1999). Structural indexes and sexual maturity of tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(4), 637–652. <https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000400011>

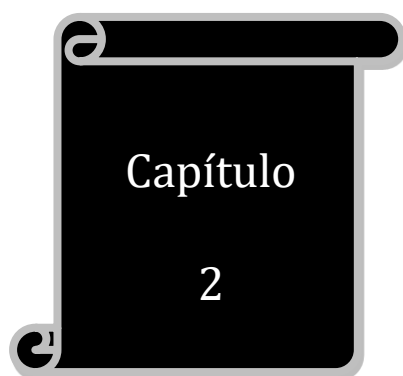
Wolters, W.R., Chrisman, C.L., & Libey, G.S. (1981). Induction of triploidy in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 110, 310–312. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1981\)110<310:IOTICC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1981)110<310:IOTICC>2.0.CO;2)

Yılmaz, S., Çakmak, E., & Çimrin, S. (2017). The performance of triploids versus diploids in aquaculture: A review through the omics window. *Aquaculture International*, 25(3), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0175-2>

Yu, F., Xiao, J., Liang, X., Liu, S., Zhou, G., Luo, K., ... & Zhu, Z. (2011). Rapid growth and sterility of growth hormone gene transgenic triploid carp. *Chinese Science Bulletin*, 56(16), 1679–1684. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4474-5>

Zhang, Q., Hu, W., Zhu, Z.Y., & Li, S.G. (2011). Rapid growth and sterility of growth hormone gene transgenic triploid carp (*Cyprinus carpio*). *Chinese Science Bulletin*, 56(11), 1142–1148. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4446-7>

Zhang, Q.Q., & Arai, K. (1999). Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyological Research*, 46(2), 153–161. <https://doi.org/10.1007/BF02674207>



Development of a pressure-induced triploidy protocol and its effects on growth performance and fertility in tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816)

Aldessandro da C. Amaral ⁽¹⁾, Lucas S. Torati ⁽²⁾, Luciana N. Ganeco-Kirschnik ⁽²⁾, Luciana C.V. Villela ⁽²⁾, André Silverio Pereira ⁽²⁾, Julia T. Lopes ⁽²⁾, Yury O. Chaves ⁽³⁾, Diogo T. Hashimoto ⁽⁴⁾, Velmurugu Puvanendran ⁽⁵⁾ and Fernanda L. Almeida O'Sullivan ⁽²⁾

PUBLICADO NA REVISTA AQUACULTURE

Development of a pressure-induced triploidy protocol and its effects on growth performance and fertility in tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816)

Aldessandro da C. Amaral ⁽¹⁾, Lucas S. Torati ⁽²⁾, Luciana N. Ganeco-Kirschnik ⁽²⁾, Luciana C.V. Villela ⁽²⁾, André Silverio Pereira ⁽²⁾, Julia T. Lopes ⁽²⁾, Yury O. Chaves ⁽³⁾, Diogo T. Hashimoto ⁽⁴⁾, Velmurugu Puvanendran ⁽⁵⁾ and Fernanda L. Almeida O'Sullivan ⁽²⁾

(1) Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Avenida Rodrigo Otávio, Manaus, AM, CEP 69080-900, Brazil.

(2) Embrapa Pesca e Aquicultura, Av. NS 10, cruzamento com a Av. LO 18 Sentido Norte Loteamento - Água Fria, Palmas, TO, CEP 77008-900, Brazil.

(3) Instituto Leônidas and Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia, Laboratory for the Diagnosis and Control of Infectious Diseases in the Amazon; Rua Terezina, 476, Manaus, AM, CEP 69057-070, Brazil.

(4) São Paulo State University (Unesp), Aquaculture Center of Unesp, Jaboticabal, SP, CEP 14884-900, Brazil.

(5) Center for Marine Aquaculture, Nofima AS, Muninbakken 9, 9019 Tromsø, Norway.

Corresponding author: Velmurugu Puvanendran: E-mail: velmurugu.puvanendran@nofima.no. Center for Marine Aquaculture, Nofima AS, Muninbakken 9, 9019 Tromsø, Norway.

Abstract

We tested different combinations of timing post fertilization and duration using 8000 psi pressure shock to establish an efficient protocol to induce triploidy in tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). To do so, two trials were carried out: first (T1), newly fertilized tambaqui eggs were subjected to a pressure of 8000 psi for 120 seconds, starting at different seconds post-fertilization-spf (T1.1 - 65 spf, T1.2 - 95 spf, T1.3 - 125 spf, T1.4 - 155 spf, T1.5 - 185spf and T1.6 – 312 spf). A group with no pressure treatment was used as control. All treatments yielded high triploidization rates (> 93%) but T1.1 and T1.2 resulted in higher final gastrula survival (FGS; >90%) and embryo survival indexes (ES; >87%) than T1.3 to T1.6. Based on the results of T1, a second trial (T2) was carried out to optimize duration of pressure shocks using 8000 psi at 65 spf for 60s (T2.1) and for 90s (T2.2), and at 95 spf for 60s (T2.3) and for 90s (T2.4). A group with no pressure treatment was used as control. T2.1 yielded 56% of triploids compared to > 94% obtained in T2.2, T2.3 and T2.4. Further, T2.3 and T2.4 yielded higher FGS and ES indexes compared to control, T2.1 and T2.2. Growth of progenies in earthen ponds diploid (control; n= 2 ponds) and treated fish (combined T2.1, T2.2, T2.3 and T2.4; n= 2 ponds) indicated that triploids have overall a better growth (body weight, body height, total and standard lengths) than diploids as measured monthly for the first six months of age. Histological analysis of the gonads of 20 months-old progenies from T2 reared in earthen ponds indicated that triploids are infertile while their control counterparts were maturing. This study provides a pressure shock protocol for future large-scale production of sterile triploid *C. macropomum*.

Keywords: hydrostatic pressure treatment, triploidization, neotropical fish, infertility.

1. Introduction

The volume of farmed fish production has increased eight-fold over the last three decades worldwide and the volume of farmed aquatic species has surpassed the volume of aquatic products from capture fisheries (FAO, 2024). The growth of fish farming aims to meet rising protein demands; however, this trend may also lead to various environmental concerns. One significant issue is the genetic mixing of farmed fish—whether hybrids or genetically modified strains—with wild populations. Such mixing can occur during escape events and natural spawning in open waters (Gross, 1998; Ottera et al., 2016; Hashimoto et al., 2012). Further, puberty also results in decreased growth, inferior flesh quality and compromised disease resistance and welfare which lead to huge economic loss for the fish farmers (Taranger et al., 2010).

One way to tackle the negative environmental impacts and economic loss is the production of sterile fish. In fish farming, the production of sterile individuals can be extremely advantageous, since sexual maturation is generally associated with reduced weight gain and growth, greater susceptibility to diseases, aggression among them and reduced meat quality (Arai, 2001; Peruzzi et al., 2004; Taranger et al., 2010; Ottera et al., 2016). While new molecular methods such as ablation of primordial germ cells (PGC) by depletion of Dead end (Dnd) are developing, it is in its early stage of R&D (Wong and Zohar, 2015). Triploidization has been used to develop sterility in aquatic species including fish over the several decades (Thorgaard and Gall, 1979). Triploid individual possesses an extra set of chromosomes, as a result of a chemical treatment or physical shock on the newly fertilized egg during the second phase of meiosis. The shock causes a depolymerization of tubulin fibers of the meiotic spindle impeding the extrusion of the second polar body (Dunham, 2011; Piferrer, 2018) and making the zygote possess three sets of chromosomes: two maternal (one from the egg's pronucleus and another from the retained polar body) and one paternal (from the spermatozoa's pronucleus) (Tebaldi and Amaral Jr., 2009).

Physical shocks are more commonly applied for aquaculture species to produce triploids through sudden thermal changes (Sato et al., 2020; Yasui et al., 2020; Silva Júnior et al., 2021; Pereira et al., 2022) or changes in hydrostatic pressure surrounding the newly fertilized eggs (Hyndman et al., 2003; Tiwary et al., 2004; Xu et al., 2008; Piferrer et al., 2009; Peruzzi et al., 2018; Puvanendran et al., 2019). Another alternative method to obtain a triploid zygote is crossing a tetraploid individual with a diploid individual resulting in interploid triploids (Piferrer et al., 2009; Hansen et al., 2025).

In most fishes, the presence of an extra set of chromosomes leads to infertility, as the meiotic division is disrupted by the failure on the chromosomes pairing before crossing over, early in meiosis (Benfey, 1999; Tiwary et al., 2004; Piferrer et al., 2009). However, there are some species in which male triploids can be fertile such as in the Neotropical *Astianax altiparanae* (Nascimento et al., 2017), the tench *Tinca tinca* (Linhart et al., 2006), pond loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Fujimoto et al., 2008) and brown trout *Salmo trutta* (Lahnsteiner and Dünser, 2024). Furthermore, studies indicate that triploid fish have better survival rates, feed conversion and disease resistance (Kerby et al., 2002; Wang et al., 2024), with no difference in performance (Pechsiri and Yakupitiyage, 2005; Wagner et al., 2006) or reduced performance (Aydin et al., 2021; Karayucel et al., 2018; Otterå et al., 2016). However, studies indicate that welfare issues such as the incidence of deformities can appear and need to be dealt with (Fraser et al. 2012; Peruzzi et al., 2018).

For pressure shock treatment of fish eggs, a specific machine with a stainless-steel pressure chamber, hydraulic electric pump, pressure gauge and air bleed valve are used (Peruzzi and Chatain, 2000). Currently, there are efficient pressure shock protocols to induce triploid for most commercial fish, such as the brook trout *Oncorhynchus gorboscha* (Benfey et al., 1997; Hyndman et al., 2003), the rainbow trout *O. mykiss* (Lincoln and Scott, 1984), the coho salmon *O. kisutch* (Piferrer et al., 1994), the Atlantic salmon *Salmo salar* (Glover et al., 2020), the brown trout *Salmo trutta* (Preston et al., 2013), the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Gao et al., 2007), the channel catfish *Ictalurus punctatus* (Wolters et al., 1982), the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Peruzzi et al., 2004), the yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Xu et al., 2008) and the tilapia *Oreochromis aureus* (Hussain et al., 1991). For neotropical species, hydrostatic shock of newly fertilized eggs has yielded 100% triploid in the jundiá *Rhamdia quelen*, and temperature shock produced 95 -100% triploid in the *Astianax altiparanae* (do Nascimento et al., 2017), curimatá *Prochilodus lineatus* (Yasui et al., 2020) and matrinxã *Brycon amazonicus* (do Nascimento et al., 2021). However, the effectiveness of either thermal or hydrostatic pressure shock highly depends on the time post fertilization when it is applied, on its intensity and duration (Pandian and Koteeswaran, 1998; Káldy et al., 2021).

Different methods have been used to verify the ploidy in fish. In general, these analyses are based on chromosome counts or DNA content, and less frequently based on the cell size (Abiado et al., 1991; Piferrer et al., 2009). Karyotyping is the most preferred technique, and more recently the flow cytometry has largely been used to quantify the DNA cell content (Thorgaard, 1983; Xu et al., 2008; Silva Júnior et al., 2021; Pereira et al., 2022). The measurement of the size of erythrocyte and/or nuclei in stained blood smear is another approach

applied to verify fish ploidy (Benfey and Sutterlin, 1984; Gao et al., 2007; Lu et al., 2009; Flajšhans et al., 2011; Yasui et al., 2020).

The Neotropical fish tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816), an Amazonian member of the family Serrasalminidae, is the most farmed native fish species in Brazil. Its cultivation has been steadily intensified over the past decade (Val and Oliveira, 2021), and in 2024 the production of farmed tambaqui exceeded 120 thousand tons (IBGE, 2025). Consequently, in Brazil, a great research effort has been carried out aiming at developing new techniques for the farming of tambaqui to improve the production and economic performance on the effect of different diets at various life stages (de Almeida et al., 2019; dos Santos et al., 2021), feeding regimes (Chellappa et al., 1995; Guilherme et al., 2022), stocking density (da Costa et al., 2019; Rodrigues et al., 2024), and environmental conditions (Aride et al., 2004, Sousa et al., 2017). However, puberty and early maturation have been seen to have negative effects on growth of tambaqui (Almeida et al., 2016; Silva et al., 2023). Given that triploidy induction in fish results in sterility, developing a better triploidy induction protocol can add a great value in the tambaqui industry, allowing greater yield in a shorter period. However, the attempts to date to induce triploidy in tambaqui using temperature shocks were not efficient, generating only 8 to 58.8% of triploids (Sato et al., 2020; Silva Júnior et al., 2021; Pereira et al., 2022). Moreover, the same studies demonstrated that heat shock in tambaqui eggs drastically decreases the fertilization index. Studies comparing the thermal (heat/cold) and hydrostatic pressure shock on triploidization showed that hydrostatic pressure shock methods resulted in better production of triploid fish (Malison et al. 2001; Meng et al. 2023).

To date, no efforts have been made to create a triploidization protocol using hydrostatic pressure. Therefore, the objective of this study was to establish an optimized protocol for inducing triploidy in *Colossoma macropomum* (tambaqui) through hydrostatic pressure. This was achieved by systematically evaluating how the timing of post-fertilization and the duration of pressure shock affect the efficiency of triploid induction and the resulting sterility.

2. Material and methods

The experiments described here complied with the “Brazilian guidelines for the care and use of animals for scientific and educational purposes”–DBCA and were registered at the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional

Knowledge – SISGen (ADBE614) and the Ethics Committee for the Use of Animals - CEUA of Embrapa Fisheries and Aquaculture (protocol n°11/2019).

2.1. Trial 1: Identification of the best time post-fertilization for pressure-shock application

2.1.1. Artificial reproduction and experimental design

Trial 1 was conducted at the facilities of Embrapa Fisheries and Aquaculture (Palmas-TO, Brazil) on December 07 and 08th 2020 using 3.5 years old, earth pond-cultured tambaqui male and females. Mature females ($n=2$, 6.26 ± 0.82 kg) and spermiating males ($n=2$, 5.09 ± 0.07 kg) of *C. macropomum* were selected and treated with carp pituitary extract (CPE, Danube Piscicultura, Brazil) following protocol described in Woynárovich and Van Anrooy (2019). Females were given a preparatory intraperitoneal dose of 0.5 mg.kg^{-1} of body weight (BW) and 12 hours later a resolving dose of 5.0 mg.kg^{-1} BW and males were treated with a single intraperitoneal dose of 2.5 mg.kg^{-1} BW. Care was taken to strip good quality eggs at an appropriate time. We closely monitored the fish for the first release of eggs in the tanks after hormonal treatments. When we observed that the females were releasing the eggs at 260 degree-hours and immediately anaesthetized the fish and stripped the eggs (Oliveira et al., 2023). The color of the eggs was also checked which was homogeneously light green and was devoid of any white spots (presumably dead/over-ripped eggs). For semen collection, males had their urinary tract emptied, urogenital papillae dried, and semen collected using dry sterile 5 mL syringes. After the collection, lack of spermatozoa activation was confirmed under an optic microscope to confirm that any urine/feces contamination resulted in sperm activation which would lead to lower or no fertilization (Maria et al. 2012; Marques et al. 2021). Equal amounts of semen from two males (2 mL/male) were then pooled and gently mixed prior to fertilization. Likewise, equal amounts of eggs (200 g/female) of the two females were pooled before fertilization.

Trial 1 (T1) was designed to test application of 8000 psi for 120s (2 minutes) at six different times (in seconds) post fertilization (spf). The pressure value (8000 psi), total time of the pressure applied (120 sec) and the start of the six different times in psf in this trial were selected after carefully analysing the literature and considering possible species-specific differences (Pandian and Koteeswaran, 1998; Peruzzi and Chatain, 2000; Piferrer et al., 2009; de Almeida et al., 2019; Sato et al., 2020; Silva Júnior et al., 2021). Each treatment was carried out in triplicate. Each replicate consisted of 12.5g of pooled eggs fertilized with 250 μL of pooled semen inside a 50 mL Falcon tube with perforated lids to avoid pressure build up inside

the Falcon tube during pressure treatment. Given the short time (65-312 spf and 120 sec induction period), fertilization for each treatment was done just before subjecting them to the pressure treatment and this was done in random order. The treatments were: T1.1 -65 spf, T1.2 -95 spf, T1.3 -125 spf, T1.4 -155 spf, T1.5 -185 spf and T1.6 -312 spf (see figure 1). For each treatment, triplicates of Falcon tubes containing fertilized eggs were placed together in the stainless chamber of the hydrostatic pressure shock machine (TRC Hydraulics, Dieppe, New Brunswick, Canada) which was filled with water from the incubators (29 °C). The tubes with eggs were placed inside the pressure chamber 10 s prior to the set spf, the lid was closed, and the pressure was raised to 8000 psi in 4 s. This was considered as 0 s and continued for 120 s. Soon after pressure treatment, decompression was instantaneously made using a pressure release valve. Control (CT) replicates were fertilized in Falcon tubes similar as in other six treatments but were not subjected to any pressure. All fertilized eggs in each of the Falcon tubes were incubated in individual 200 L incubators (n = 21).

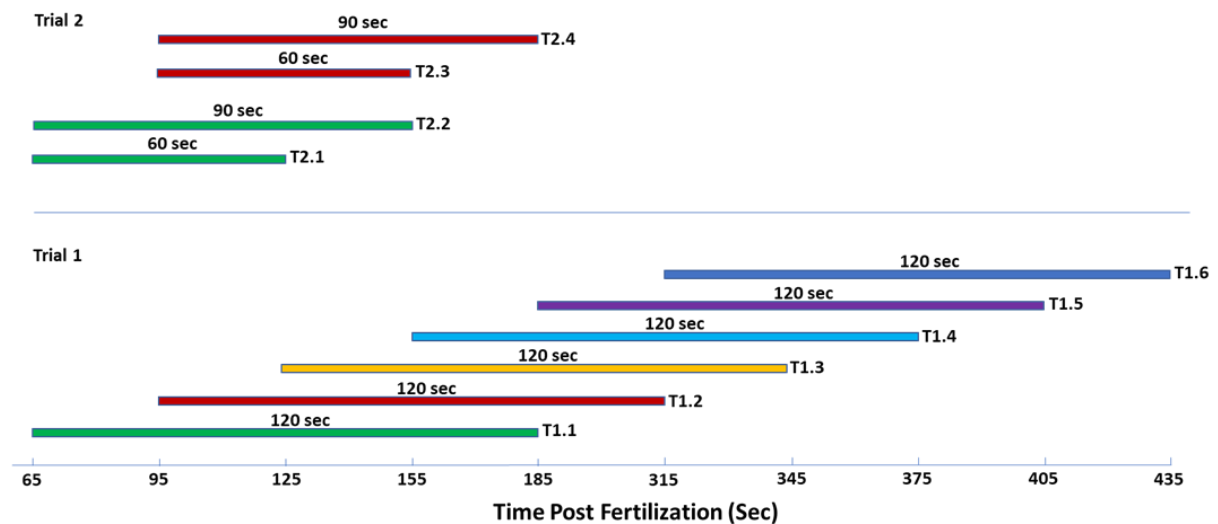


Figure 1. Schematic representation of both trials set-up to induce triploidy in tambaqui *C. macropomum*. Each line represents one treatment and shows the time post fertilization (sec) when fertilized eggs were subjected to pressure shock (8000 psi) and the duration of shock (above each line).

2.1.2. Survival at final gastrula stage and embryo survival (hatching) indices

To estimate the final gastrula survival (FGS) and embryo survival (ES), a random triplicate samples of 5 mL water sample containing embryos (at final gastrula stage) were taken from each incubator at 6 hours post fertilization (hpf) for FGS estimation and 11 hpf for ES estimation and were placed in a Petri dish to form a single layer of embryos. To estimate FGS,

the number of fertilized and unfertilized eggs at 6 hpf were counted under a binocular microscope and FGS was calculated as $FGS = (\text{Number of fertilized eggs} / \text{total number of eggs in the sample}) * 100$. To estimate the ES, the number of moving embryo inside the egg (viable) and whitish eggs or with dead embryos (nonviable) were counted at 11 hpf, and the ES was calculated as $ES = (\text{Number of viable eggs} / \text{total number of eggs}) * 100$. The stage of viable embryos at 11 hpf is considered as a good proxy for the number of hatched larvae (Galo et al. 2015). Larval hatching started approximately 12 hours after fertilization at 28°C (336 degree-hours). The gastrula and embryo survival indexes may be underestimated, as early embryonic mortality and egg disintegration before gastrulation were not accounted for. The total number of fertilized eggs immediately after fertilization could not be recorded due to the high number of treatment groups and replicates. No larval rearing was carried out for Trial 1.

2.1.3. Flow cytometry determination of larval ploidy

After 54 hpf, 20 larvae from each incubator were netted, euthanized in cold water (0°C), dried on a paper towel, placed in 200 µL microtubes (1/incubator), then dip frozen in liquid nitrogen. Samples were then stored at -80°C and shipped on dry ice to Embrapa Amazonia Ocidental (Manaus-AM) where they were kept at -80° C until being processed for flow cytometry analysis.

Flow cytometry analysis was carried out at FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Amazônia, Manaus). Because all larval samples from each incubator were placed in one single microtube, the thawing process impeded a proper separation of the individual larva and some larvae were lost. After thawing, following number of larvae were intact from six treatments T1.1= 20, T1.2= 20, T1.3= 20, T1.4= 20, T1.5= 14 and T1.6= 20. Using these larvae cell lysis was made following protocol from Xavier et al. (2017), where individually thawed larvae were immediately immersed in lysis solution (9.53 mM MgCl₂.7H₂O; 47.67 mM KCl; 15 mM Tris; 74 mM Sucrose, 0.6% Triton X-100, pH 8.0) for 120 min at room temperature. After cell lysis, the sample was filtered through a 30 µm mesh (Celltrics, Partec GmbH, Germany), stained with 50 µL of propidium iodide at 1 mg/mL (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) and individually processed in a flow cytometer (FACSCanto™ II, Erebodegem, Belgium). The equipment was operated using 6 colours within 2 lasers (Blue, 488 nm + red, 633 nm, being 4 colours in the blue laser and 2 colours in the red laser), power forward Scatter - FSC of 229, side scatter SSC of 330 and fluorescence intensity FL 330, and 50,000 acquired events were performed.

Ploidy of presumptive triploid fish was confirmed by comparison with diploid control fish. For the analysis of relative DNA content, we first analysed the control samples ($n=12$) to establish a standard amount of DNA present in nuclei suspension of diploid ($2n$) tambaqui larvae. The fluorescent cytometry histograms obtained from diploid and triploid fish are illustrated in figure 2. Relative fluorescence was evaluated using software FlowJo v. 10 (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA).

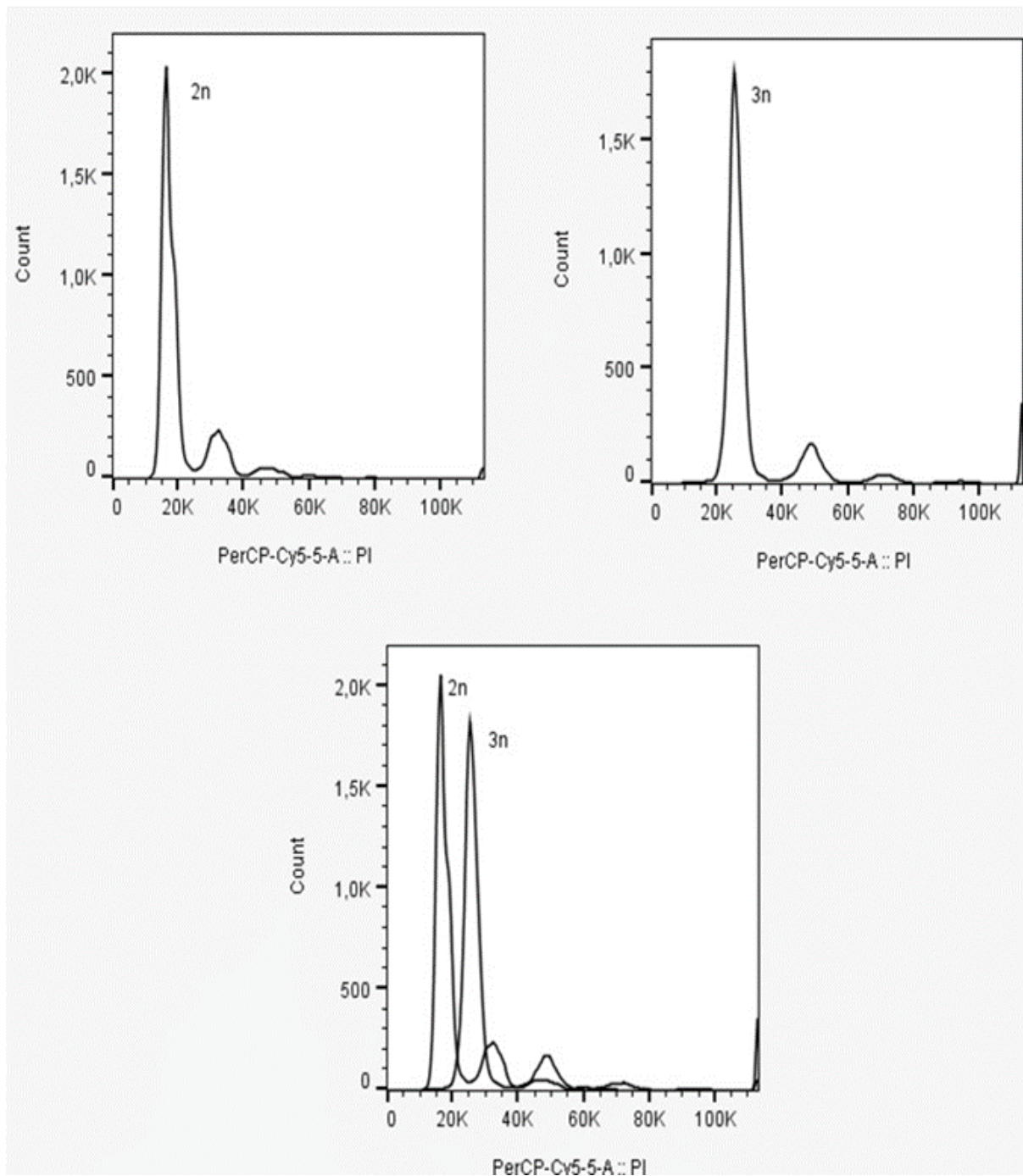


Figure 2. Flow cytometry histograms (from trial 1) for the nuclei DNA relative content of tambaqui *C. macropomum* larvae. a) In diploid fish (from unshocked egg) used as standard, b) triploid fish (eggs treated with hydrostatic pressure) and c) merged data from 2n and 3n fish.

Finally, we estimated the triploid yield (TY), which is a good indicator of the overall success of the triploidization. It was calculated using embryo survival (ES) of triploid and control and triploidization rate, as follows: $TY = (ES \text{ of triploid group} / ES \text{ of control group}) \times \text{triploidization rate}$ (Teskeredžić et al. 1993).

2.2. Trial 2: optimization of pressure shock duration

2.2.1. Experimental design

Based on triploidization, TY, FGS and ES from Trial 1, a second trial (T2) was designed to optimize pressure shock duration. The experiment was conducted at a commercial hatchery located at Brejinho de Nazaré-TO (Fazenda São Paulo; 11°1'57.81"S, 48° 35'22.05"W) using the same pressure shock machine used in Trial 1. On 8th March 2022, 7 kg mature females (n=2) and 7.5 kg spermiating males (n=3) were selected and spawning/spermiation was induced using CPE protocol (Woynárovich and Van Anrooy, 2019). Eggs and semen were collected as previously described. The semen was pooled (2 mL from each male). The trial aimed to test two durations (60s and 90s) of pressure (8000 psi) application in eggs (12.5 g eggs fertilized with 250 µL semen) at 65 spf and 95 spf. All four combinations (treatments) were done at 8000 psi in four replicates T2.1 = 60s at 65 spf; T2.2 = 90s at 65 spf; T2.3 = 60s at 95 spf and T2.4 = 90s at 95 spf (see figure 1). The water temperature for the whole trial was 27.5°C. Control (CT) replicates were fertilized exactly as treatments but not subjected to a pressure shock. After pressure shock, fertilized eggs were incubated in twenty, 200 L incubators. FGS and ES were estimated as previously described for Trial 1, at 6 and 11 hpf, respectively.

2.2.2. Rearing conditions, feeding regime and biometrics

From 3 dph, larvae were fed with *Artemia* nauplii *ad libitum* every two hours from 8:00 AM to 04:00 PM and then at 09:00 PM. After seven days post-hatching (dph), larvae were transported in plastic bags saturated with O₂ from Fazenda São Paulo (Brejinho de Nazaré-TO) to the facilities of Embrapa Fisheries and Aquaculture (Palmas-TO). Replicates were acclimated into individual 1000 L tanks (total of 20 tanks) at an approximate density of 2 larvae L⁻¹ maintained in a recirculation aquaculture system (RAS) and kept under constant aeration. Bottom of the tanks were siphoned daily and water quality was kept at the optimal conditions (6 mg L⁻¹; pH – 7,5) for the species (Hilsdorf, et al., 2022). The average temperature was 29°C, 12 h continuous light per day (12L:12D) and L min.⁻¹ water flow were provided.

From 20 dph onwards, fingerlings were also fed *ad libitum* with powdered commercial ration (50% crude protein, Aqua line SUPRA, São Leopoldo-RS, Brazil) along with *Artemia* nauplii, for weaning. Larvae were completely weaned onto a dry diet at 25 dph. When juveniles were approximately 2 months old (May 10th of 2022), 30 fish per replicate of each treatment (n=120/treatment and 480 in total) were transferred to one 600 m² earthen pond. Likewise, fish from control groups were also pooled and transferred to another 600 m² earth pond (n = 480). The remaining fish were discarded and euthanized with Benzocaine due to the limited number of earthen ponds available for the grow-out phase. From this moment up to 20 months-old, all fish were fed with commercial ration (CP 45%, Aqua line SUPRA, São Leopoldo-RS, Brazil) offered daily at 10% of total estimated biomass.

To perform biometric measurements, fifty fish from each group (control and treatment) were randomly captured from the earthen ponds and transferred to a 1000L anaesthetic tank (Eugenol at 100 mg. L⁻¹) and total length (TL in cm), standard length (SL in cm), body height (BH in cm) and body weight (BW in g) were measured at three, four, five and six months post-hatch (mph) on 6th June, 15th July, 17th August and 16th September, respectively.

2.2.3. Flow cytometry analysis for triploidization

To avoid sample losses during thawing of very small newly hatched larvae, the sampling of Trial 2 was done at 15 dph, and 15 larvae from each tank were sampled (60 per treatment), euthanized in cold water (0° C), and individually placed in 200 µL microtubes for cryopreservation in liquid nitrogen until flow cytometry analysis. Sample preservation and transportation were done as in Trial 1. The following number of larvae were analysed from the treatments: CT2=31, T2.1=37, T2.2=42, T2.3=45 and T2.4= 39 (see figure 2). In Trial 2, the triploid yield was also estimated as in Trial 1.

2.3. Blood smear and karyotype

At 12 months, 30 fish of each pond (treated and control) received individual transponders and were sedated with Benzocaine for blood sampling. The blood was collected in heparinized syringes, for the preparation of blood smears, which were then air-dried and stained with Giemsa. Pictures of the erythrocytes were taken in an optical microscope at magnification of 100X and the images were used for the measurement of 30 cells per slide. The longest diameter of each erythrocyte was measured in the software Image G (v. 1.8), and the average (in µm) was estimated.

The karyotype of 6 triploids and 6 control fish was performed as described in Sato et al., (2020).

2.4 Histology analysis of the gonads

To evaluate the gonad development of triploid tambaqui at 20 months of age, 10 triploids (based on the average size of the erythrocytes) and 19 diploid fish were anaesthetised with 0.01% benzocaine (Acros®, New Jersey, USA) and sacrificed by cerebral concussion. The gonads were dissected and placed in Karnovsky solution for 24 hours, dehydrated, infiltrated and embedded in glycol methacrylate (Leica®; Heidelberg, Germany). The 5 µm thick sections were stained with blue toluidine (1%), borax (1%), and mounted on slides for further analysis.

When fish were three years old, four females from the control group and one from the triploid group were sampled. Fish were weighed and dissected, and the weight of the ovary was used to estimate the gonadosomatic index (GSI).

2.5 Data and statistical analysis

FGS and ES of both trials were checked for normal distribution by the Shapiro Wilk test, subjected to one-way ANOVA, followed by Tukey post hoc test for multiple comparisons. The erythrocyte diameter data passed the Shapiro Wilk normality test and Levene's Test for homogeneity of variance and were subjected to unpaired T test to compare triploid and diploid averages. All biometric data passed the Shapiro Wilk normality test and were subjected to multiple unpaired T test to compare the values of control and triploid groups in each month. Data are represented as mean $\pm$ SEM. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Trial 1: Triploidization, final gastrula survival (FGS) and embryo survival (ES) (hatching) indices

All six treatments resulted in relatively higher triploidization ranging from 93-100% with T1.1 and T1.2 had 93 ± 11.54 % triploidization and T1.3, T1.4, T1.5 and T1.6 resulted 100% (Figure 3a). Control group (86.85 ± 4.7 %), T1.1 (94.64 ± 2.8 %), T1.2 (89.95 ± 3.3 %) and

T1.3 (86.02 ± 5.3 %) had significantly higher FGS compared to T1.4 (64.34 ± 13.9 %), T1.5 (52.33 ± 6.7 %) and T1.6 (54.50 ± 14.01 %) (Figure 3b; $P < 0.05$). The ES of control group (79 ± 1 %), T1.1 (89 ± 3 %) and T1.2 (87 ± 5 %) were significantly higher than the ES of T1.3 (58 ± 1 %), T1.4 (49 ± 2 %), T1.5 (43 ± 4 %) and T1.6 (31 ± 1 %), while T1.1 and T1.2 had significantly higher ES than the control group (Figure 3b; $P < 0.05$). The results showed that treatments T1.1 and T1.2 had higher triploid yield (89.48 % and 86.07 %, respectively) and were considered as the most effective protocols, while T1.3, T1.4, T1.5 and T1.6 ranged from 60.24% to 30.45 %; Figure 3c). We then considered T1.1 and T1.2 for further development (Trial 2). Although no quantitative assessment of larval deformities was performed, no visible abnormalities were observed among hatched larvae in any treatment.

Figure 3

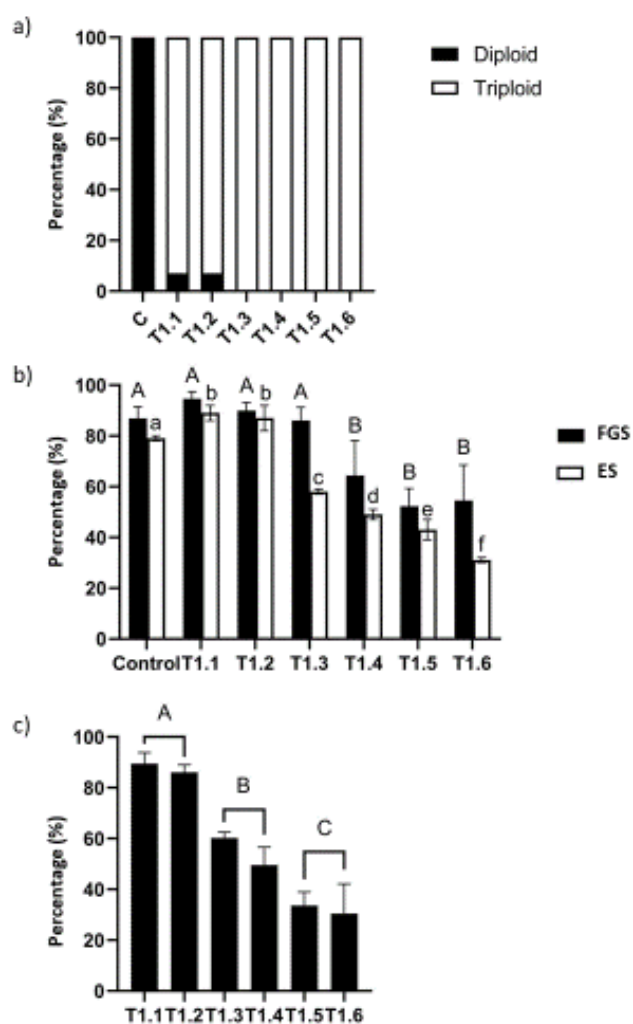


Figure 3. Triploidy induction (a), final gastrula survival (FGS), embryo survival index (ES) and triploid yield (c) in tambaqui *C. macropomum* treated and non-treated with pressure shock in trial 1. Data are presented as mean $\pm$ SD. Treatment groups labelled with the same letter do not differ significantly ($P < 0.05$), lower case refers to FI and upper case to ESI.

3.2. Trial 2: Optimization of pressure shock duration

3.2.1. Triploidization, final gastrula survival (FGS) and embryo survival (ES) (hatching) indices

T2.1 resulted in significantly lower triploidization compared to T2.2, T2.3 and T2.4 at $55 \pm 3.4\%$, $93 \pm 2.4\%$, $93 \pm 9.2\%$ and 100% , respectively (Figure 4a). No significant differences in FGS among control group ($98.9 \pm 0.9 \%$) and T2.3 ($97.4 \pm 1.2 \%$) and T2.4 ($97.3 \pm 1.9 \%$), while T2.1 ($93.6 \pm 2.5 \%$) and T2.2 ($89.7 \pm 3.1 \%$) had significantly lower FGS compared to control group, T2.3 and T2.4 (Figure 4b; $P < 0.05$). Similarly, control ($97.5 \pm 0.6 \%$), T2.3 ($96.9 \pm 1.2 \%$) and T2.4 ($96.9 \pm 1.8 \%$) had significantly higher ES compared to T2.1 ($94.5 \pm 2.4 \%$) and T2.2 ($91.5 \pm 2.6 \%$) (Figure 4b; $P < 0.05$). The overall triploid yield was 53.3% , 87.27% , 92.40% and 99.35% for T2.1, T2.2, T2.3 and T2.4, respectively (Figure 4c). Although no quantitative assessment of larval deformities was performed, no visible abnormalities were observed among hatched larvae in any treatment.

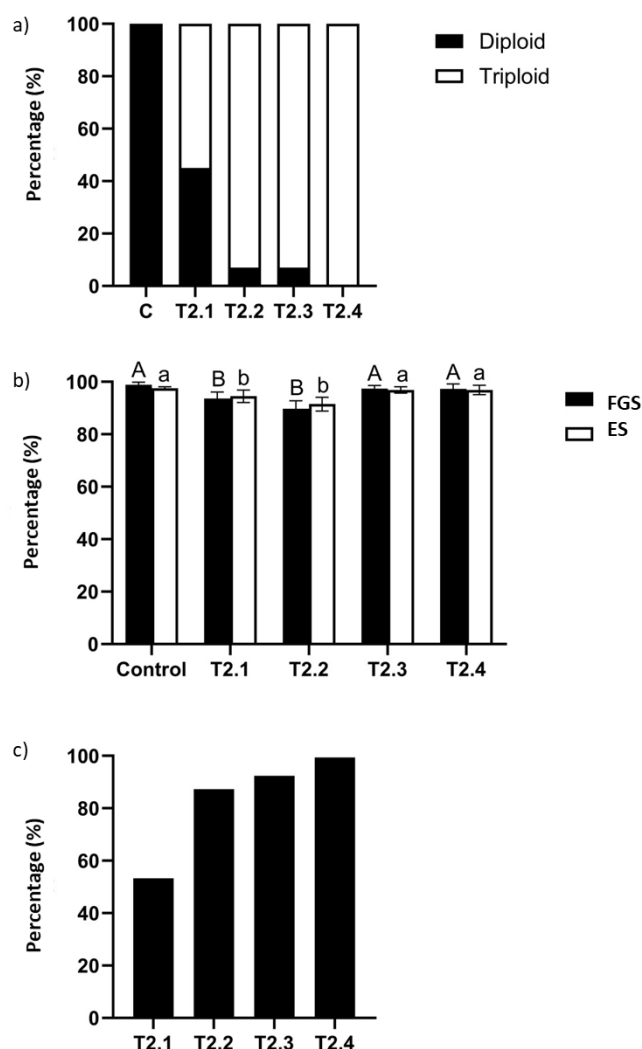


Figure 4. Triploidy induction (a), final gastrula survival (FGS), embryo survival index (ES) and triploid yield (c) in tambaqui *C. macropomum* treated and non-treated with pressure shock in trial 2. Data are presented as mean $\pm$ SD. Treatment groups labelled with same letter do not differ significantly ($P < 0.05$), lower case refer to FI and upper case to ESI.

3.2.2. Growth performance of triploid vs diploid fish

No mortality was registered during the growth phase of the study in both ponds. The control fish were significantly smaller in size compared to the triploid fish from two mph until the end of the experiment at six mph (Figure 5). Due to their smaller size, fish were not weighed at two mph. In both groups, the weight steadily increased from 3 mph until the end of the experiment, and the biomass in the triploid group was significantly higher ($P < 0.001$ in all parameters analysed). At six mph, the fish from the control group were 342.9 ± 67 g, 25.3 ± 1.7 cm in total length, 24.1 ± 1.7 cm in standard length and 10.9 ± 0.8 cm in body height. And the

triploid group was 416.08 ± 79.73 g, 27.4 ± 1.6 cm in total length, 26.2 ± 1.5 cm in standard length and 11.9 ± 0.7 cm in body height (Figure 5).

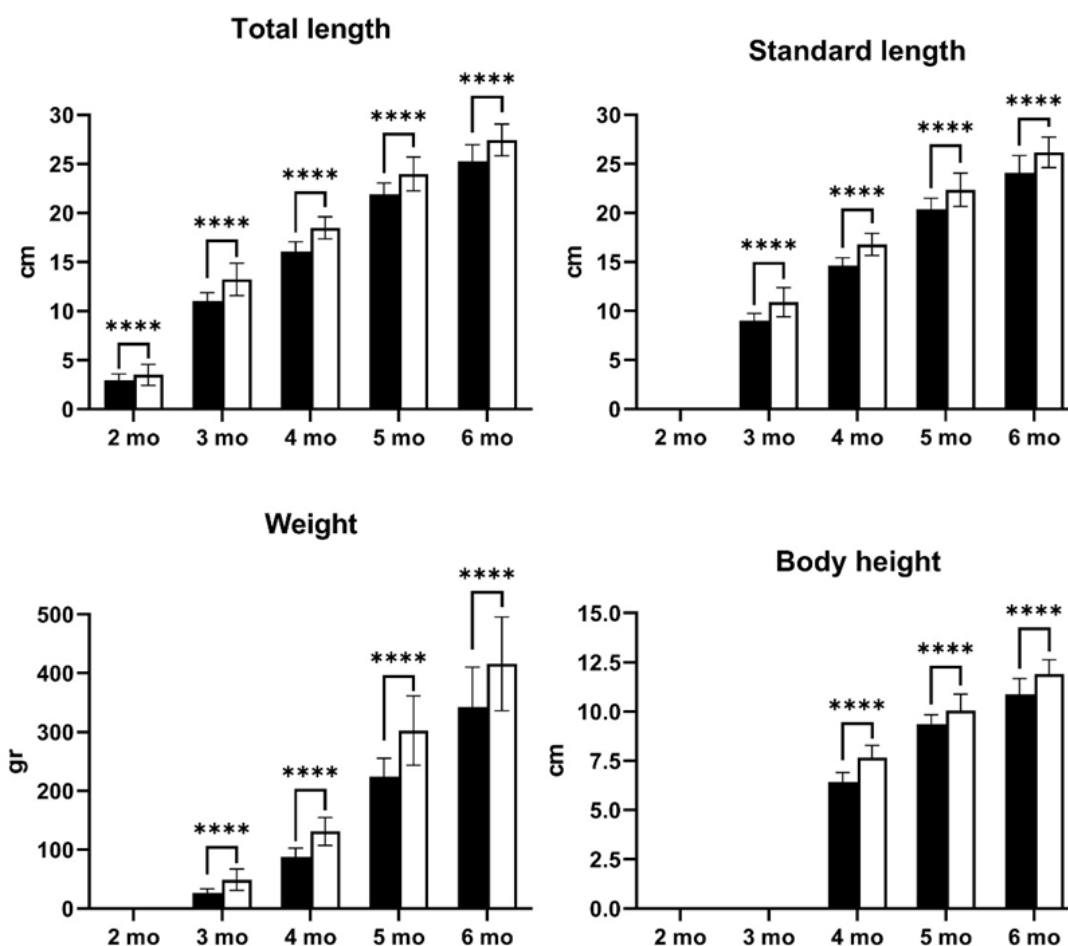


Figure 5. Monthly biometrics of tambaqui *C. macropomum* from 2 to 6 months of age. Black bars represent the control (unshocked; 2n) group; white bars represent the treated group, mostly composed by 3n fish. Data are presented as mean $\pm$ SD ($p < 0.001$).

3.3. Blood smear and karyotype

The erythrocytes of diploid fish presented an average size of 12.7 ± 0.6 μm , while the erythrocytes of fish induced to triploidy had an average of 15.8 ± 0.9 μm ($P < 0.001$). The karyotype of triploid fish presented cells in metaphase with more than 70 visible chromosomes. The erythrocytes of all 6 triploid fish used in the karyotype presented an average nuclear size above 15 μm (Figure 6).

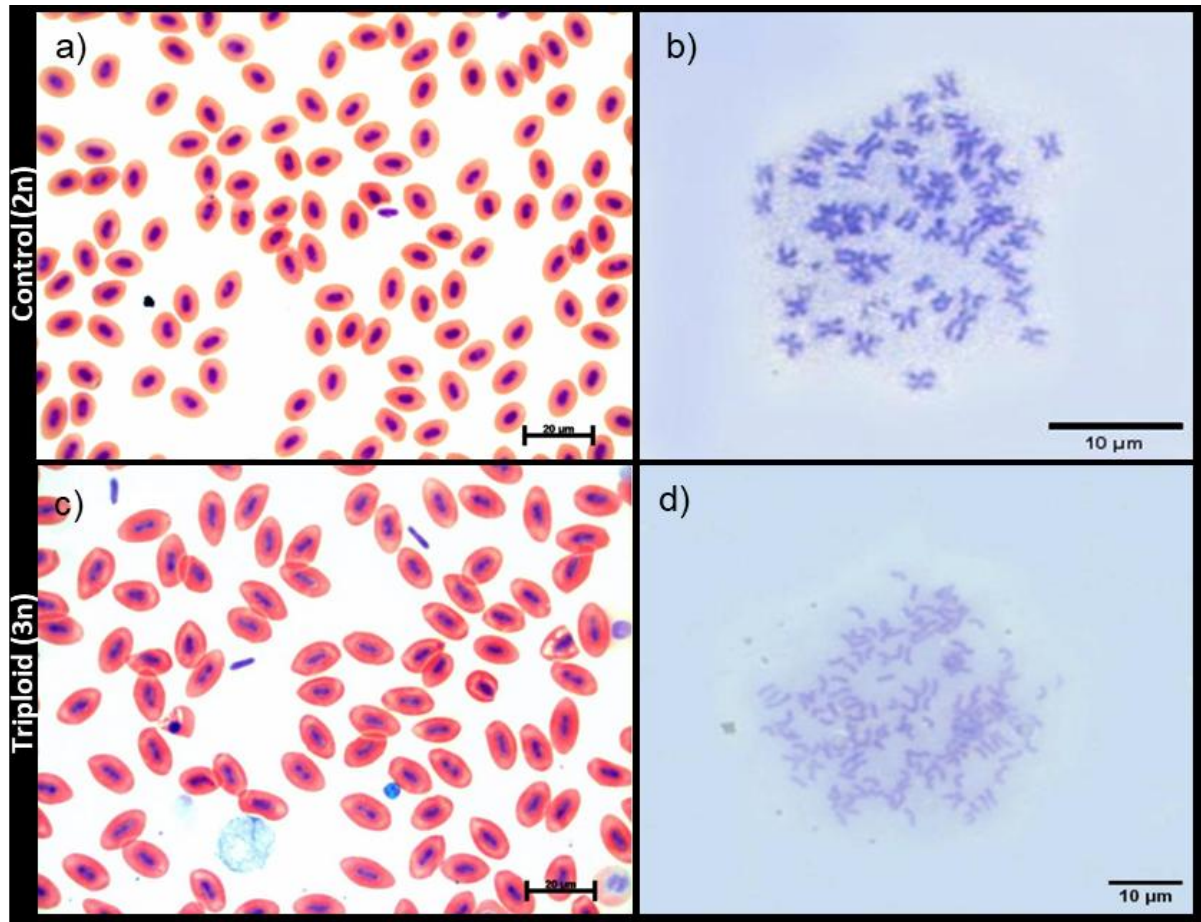


Figure 6. Erythrocytes and karyotype of diploid (a and b) and triploid (c and d) tambaqui *C. macropomum*.

3.4 Histology analysis of the gonads

From the 19 control fish, eight were females and six of them had developing ovaries at primary growth stage, while two had immature ovaries. Ovaries in primary growth had pre-vitellogenic and atretic oocytes, besides a higher number of primary oocytes arrested in prophase I of meiosis and surrounded by a single layer of flattened granulosa cells (Figures 7a and b). This germ cell line was arranged within typical ovarian lamellae. Among the ten triploid fish, five were females and all displayed immature ovaries without the usual ovarian lamella morphology. In these triploid females, no germ cells were observed in meiosis or post-meiosis and there was an apparent increased cellularity in the interstitium. Instead, the germinal epithelium was either devoid of germ cells or containing only oogonia as germ cell (Figures 7c and d, respectively).

Eleven diploid males were evaluated, and they were either in late maturation, with seminiferous tubules filled with free spermatozoa, or presented resting testis (Figures 7e and f), with spermatogonia as the main germ cell besides some residual spermatozoa. The resting testis could also be easily identified by the presence of thick, post spawning or absorbed, somatic stroma. This indicates that all control males have attained puberty at this age. The five triploid males were immature with testis containing only early and isolated type A spermatogonia in the germinal epithelium (Figure 7g). No presence of more advanced spermatogenic cells was observed in any triploid male.

Female diploid tambaqui at 3-years old showed well developed ovaries compared to the triploid female. The GSI of the triploid female was 0.01 while the diploid females had a GSI of 7.9 ± 1.01 (Figure 8).

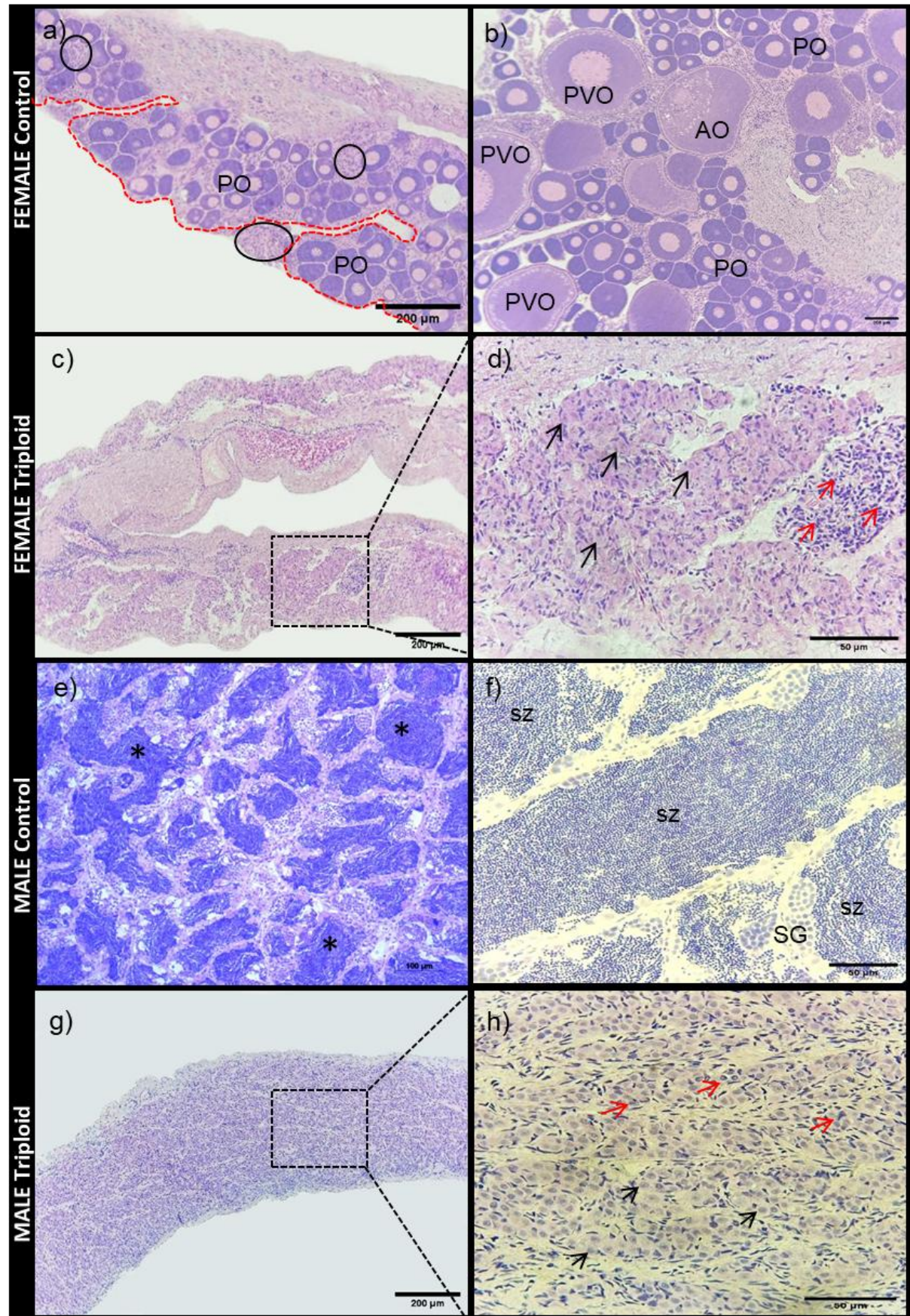


Figure 7. Gonads of tambaqui *C. macropomum*. a) 2n immature ovary containing mainly primary oocytes (PO) and oogonia (circled in black) allocated in lamellae (circled in red); b) 2n primary growth ovary containing primary, previtellogenic (PVO) and atretic (AO) oocytes; c) 3n ovary without lamella structure, with germinal epithelium (circled in red) devoid of CG germ cells; d) 3n ovary without lamella structure, containing only oogonia (black arrows) in the germinal epithelium, which also presented large areas of apoptotic cells (red arrows); e) resting 2n testis containing residual spermatozoa (asterisks) and thick interstitium; f) mature 2n testis containing free spermatozoa (SZ) and few spermatognial cysts (SG); g) 3n testis presenting spermatogenic cyst in apoptosis (red arrows), and isolated type A spermatogonia (black arrow).



Figure 8. Ovary of three year old (a) diploid and (b) triploid tambaqui *C. macropomum*.

4. Discussion

Results from our experiments showed that applying the hydrostatic pressure to induce triploidy can be successfully achieved in tambaqui. To our knowledge, no attempts were made to induce triploidy in tambaqui using a pressure shock. This is a breakthrough for the developing aquaculture industry in South America for tambaqui. The earlier attempts to produce triploidy in tambaqui using thermal shock were not successful because of lower triploidization (maximum 58.8%) and/or reduced fertilization index and embryo survival index (ESI) (Sato et al., 2020; Silva Júnior et al., 2021; Pereira et al., 2022). In our study, we have achieved 100% triploidization using 8000 psi pressure at 95 seconds post fertilization (spf) for 90 s. Studies have also shown that time after the post fertilization the shock applied, and the duration of the shock are very important factors affecting triploidization in fish (Káldy et al., 2021) while the magnitude of the hydrostatic pressure of approximately 8000 psi usually gives a satisfactory triploidy (Zajicek et al., 2011; Fetherman et al., 2015). In both trials in this study, we used a hydrostatic pressure of 8000 psi while a wide range of different times of spf (65-312 sec in Trial I) and selected spf (65 and 95 spf) and duration of the shock (60 and 90 sec) were used. In general, both trials gave higher triploidization but resulted in variable final gastrula survival FGS and ESI (Figure 3 and 4).

Application of the hydrostatic pressure needs to be applied on the fertilized eggs before the release of the second polar body to achieve a successful triploidization (Piferrer et al., 2009). In our experiments, higher rate of triploidization (93-100%) in Trial 1 confirmed that there was an extended time available between 65-312 sec after fertilization and during this time interval, the release of the second polar body during meiosis can be withheld. Although resulted in higher triploidization, the estimated FGS and ES were significantly lower in four of the longer spf (125, 155, 185 and 312 sec) compared to 65 and 95 spf (Figure 3b). The reduction in FGS and ES in T1.3 - T1.6 in trial 1 indicates that to get an optimal result, the pressure treatment should start earlier than 125 spf. Similar trends have been reported in turbot where the triploidization was higher in all treatments, but the ES was variable (Meng et al. 2023) or the TY was variable in brown trout, *Salmo trutta* (Preston et al. 2013). It is important to consider that even though our method, due to the experimental procedures, did not account for early embryonic mortality or egg disintegration before gastrulation, hence possibly leading to an underestimation of the actual fertilization and embryo survival indices, it was sufficient to allow reliable comparisons among the treatments applied.

When comparing different pressure treatments in newly fertilized eggs of different fish species, there is a range of pressure values (from 6000 to 9500 psi), timing to apply the shock (up to 40 minutes after fertilization) and length of the shock (up to 5 minutes in Atlantic salmon) to produce triploid fish (Chourrout, 1984; Hyndman et al., 2003). This indicates that the intensity of pressure and duration of shock for retention of the second polar body is species specific and could be related to the sensitivity of eggs and embryonic development time of each species. Fish with longer embryonic development time would require relatively longer duration for the release of the second polar body (40 mins as in rainbow trout; Chourrout, 1984) and fish species with shorter embryonic development time would require shorter duration as shown in our study for tambaqui. Hence, in the Trial 2 we tested two times after fertilization (65 and 95 spf) and pressure duration (60 and 90 sec). Treating the eggs at 95 spf for either 60 or 90 sec induced from 93 to 100% of triploidy without affecting the FGS and ES (Figure 4a, 4b). Although we used only one hydrostatic pressure value (8000 psi), a high triploidization up to 100% has justified the selection of 8000 psi and the time selections in our experiments.

Our study produced higher triploidy induction rates compared to studies in other fish species; African catfish (*Clarias gariepinus*; Babaheydari et al., 2016), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Chatchaiphan et al., 2016), big-head catfish (*Clarias macrocephalus*; Lawson and Ishola, 2010), and even with recent studies with tambaqui (Sato et al., 2020; Pereira et al., 2022; Silva Júnior et al., 2021). However, higher triploid induction efficiency of 100% with high rates of fertilization index and ES have also been reported in some commercial species such as Atlantic salmon *Salmo salar* (Graham et al., 1985), trout *Oncorhynchus mykiss* (Chourrout, 1984), channel catfish *Ictalurus punctatus* (Wolters et al., 1981), coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Teskeredzic et al., 1993), European catfish *Silurus glanis* (Linhart et al., 2001), and the Neotropicals jundiá *Rhamdia quelen* (Huergo and Zaniboni-Filho, 2006; Silva et al., 2007) and curimatá *Prochilodus lineatus* (Yasui et al., 2020).

Triploid tambaqui juveniles in our study were heavier and larger than diploid counterparts from two to six mph. Due to the limited number of earthen ponds available for the grow-out phase, it was not possible to maintain separate ponds for all treatment groups, and therefore, individuals were pooled into a single pond, while the control replicates were kept separately in equal numbers. This approach likely introduced a small proportion of diploid fish into the treated pond, as the triploidy rate among replicates ranged from 93% to 100%. Nevertheless, the zootechnical performance of this group remained consistently superior to that of the control fish even with this small proportion of diploid individuals, reinforcing the positive effects of triploidy in the growth of tambaqui. Differences in growth performance between individuals of

different ploidies reared under the same conditions are related to age and species (Ihssen et al., 1990). In *Pseudosciaena crocea*, the growth difference between diploid and triploid fish was evident only from 10 mpm with triploid individuals were bigger and heavier than diploids, demonstrating the advantages of triploidy were age-related for this species, probably concomitant with pubertal timing (Xu et al., 2008). On the contrary, in salmonids the growth is reduced in triploids, and the greatest advantage of producing such fish is the sterility aiming to preserve the genetic integrity of wild populations in case of any escape events of farmed fish (Madaro et al., 2022).

Our analysis comparing the erythrocyte sizes of diploid and triploid fish showed that triploid fish (confirmed by the observation of more than 70 chromosomes in the metaphase of such fish) showed larger erythrocytes compared to the diploid fish, as evidenced by the average size increase from 12.7 μm to 15.8 μm . and describing some key observations. The nuclear size of the erythrocytes in triploid fish being larger than 15 μm further supports the genetic differences, possibly related to the increased number of chromosomes and the additional genetic material. This finding is in line with observations in other teleosts such as salmonids (Dorafshan et al., 2008; Saranyan et al., 2017), common carp (Zhu et al., 2021), jundia (Fukushima et al., 2012) and zebrafish (Small et al., 2024; Benfey et al., 1999), among others. Considering that erythrocytes are key mediators of physiological adjustments in oxygen transport efficiency, ongoing research by our group is focused on assessing the hematological condition and health status of triploid tambaqui to better understand the potential implications of triploidy on the metabolism and physiology of the fish.

Histological analysis showed that triploidy induction impaired the development of the gonad germline in both female and male tambaqui and more evident by the presence of increased cellularity in the interstitium in triploid tambaqui. Typically, sterility is more evident in triploid females as observed for Atlantic cod (*Gadus morhua*; Feindel et al., 2011), pufferfish (*Takifugu nifobicas*; Hamasaki et al., 2013) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Han et al., 2010). In tambaqui, the gonads of triploid females were immature, with great proliferation of oogonia by mitosis and no signs of meiotic oocytes. Moreover, triploid ovaries presented a dense structure of connective tissue with high cellularity, most likely these cells are responsible for the cleaning of apoptotic oogonia and/or early oocytes (Golpour et al., 2016).

In triploid males only spermatogonium were observed, while all diploid males presented post-pubertal testis (in final maturation, mature or resting). Similar results were observed in *Heteropneustes fossilis* (Tiwarly et al., 2000) and in the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Felip et al., 2001). Moreover, in male sea bass and sea bream *Sparus aurata* (Haffray et al., 2005),

triploidy severely affects meiosis II, when secondary spermatocytes differentiate into spermatids. The sterility opens an opportunity for these males to become recipients for surrogate experiments (Siqueira-Silva et al., 2018). However, with the recent discovery that triploid brown trout develops fertility with aging (Lahnsteiner and Dünser, 2024), it is important that gonad status of older triploid tambaqui is evaluated to confirm if the sterility observed in the present study is permanent or transitory. Although only one fish was sampled, the sterility status of triploid female was further confirmed at three years with an undeveloped ovary compared to the fully developed ovary in 4 control diploid fish.

In conclusion, our results demonstrated that pressure shock at an appropriate time post fertilization (95 spf) for a duration of 90 sec would result in 100% triploidization and higher FGS (97%) and ES (97%). Our results also demonstrated that pressure shock treatment of the newly fertilized tambaqui eggs is a better way to produce triploidy than the previously used thermal shock methods. Our study presents an efficient and reproducible protocol for the production of triploid tambaqui, a significant advancement for the tambaqui aquaculture industry. Triploid tambaqui demonstrated sterility, a critical attribute that can mitigate the risk of genetic contamination in natural populations and improve farmed stock management. This sterility also provides an opportunity to optimize energy allocation for somatic growth, potentially enhancing productivity. The findings underline the practical benefits of triploidy as a sustainable solution for the tambaqui farming sector, paving the way for further research and broader application of this technique in aquaculture.

Acknowledgments

Authors are grateful to “Fazenda Aquicultura São Paulo” (Brejinho de Nazaré-TO, Brazil) and “Hidrobios” (Palmas-TO, Brazil) for assistance with tambaqui reproduction. Thanks also for those colleagues who helped on fish sampling and trial conduction: Allan Emílio Piedade, Danielle Santos Silva, Aurisan da S. Barroso, Daniel Guimarães Figueiredo Ariki, Geovana de Souza Andrade and Jonas Pereira Alves.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author (s).

Funding

This research was funded by EUROPEAN UNION'S HORIZON 2020 RESEARCH AND INNOVATION PROGRAMME, under grant agreement N° 818173. A.C.A. was funded by COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - BRASIL (CAPES) - Finance Code 018/2020 (PDPG).

Author Contributions

Conceptualization, V.P, F.A.L.O., LST and A.C.A.; methodology, V.P., L.S.T. and F.A.L.O.; software, A.C.A., Y.O.C. and F.A.L.O.; validation, F.A.L.O. and A.C.A.; formal analysis, A.C.A., R.R.A. and F.A.L.O.; investigation, A.C.A., LST, L.N.G-K., L.C.V.V., J.T.L., A.S.P., V.P. and F.A.L.O.; resources, L.S.T. and F.A.L.O.; data curation, A.C.A., R.R.A., Y.O.C. and F.A.L.O.; writing—original draft preparation, A.C.A., L.S.T., V.P. and F.A.L.O.; writing—review and editing, A.C.A., LST, L.N.G-K., L.C.V.V., J.T.L., A.S.P., V.P. and F.A.L.O.; visualization, A.C.A., R.R.A. and F.A.L.O.; supervision, F.A.L.O and L.S.T.; project administration, F.A.L.O. and L.S.T.; funding acquisition, L.S.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

- Abiado, M.A. G., Dabrowski, K., Christensen, J.E., Czesny, S., 1991. Use of erythrocyte measurements to identify triploid saugeyes. *North American Journal of Aquaculture* 61, 319-325.
- Almeida, F.D., Lopes, J.S., Crescencio, R., Izel, A.C.U., Chagas, E.C. and Boijink, C., 2016. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, 452, pp.224-232.
- Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan, in: Lee, C.S., Donaldson, E.M. (Eds.), *Reproductive biotechnology in finfish aquaculture*. Elsevier Science, pp. 205-208.
- Aride, P.H.R., Roubach, R. and Val, A.L., 2004. Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture. *World Aquaculture*, 35(2), p.2427.

Aydın, İ., Küçük, E., Polat, H., Öztürk, R.Ç., Terzi, Y. and Altınok, İ., 2021. Growth and feed conversion ratio of diploid and triploid induced juvenile turbot reared at different water temperatures. *Aquaculture*, 543, p.736981.

Babaheydari, S.B., Keyvanshokoo, S., Dorafshan, S., Johari, S.A., 2016. Proteome changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fertilized eggs as an effect of triploidization heat-shock treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 166, 116-121.

Benfey, T.J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7, 39-67.

Benfey, T.J., McCabe, L.E., Pepin, P., 1997. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Environ. Biol. Fishes* 49, 259-264.

Benfey, T.J., Sutterlin, A.M., 1984. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 36(4), 359-367.

Chatchaiphan, S., Srisapoom, P., Na-Nakorn, U., 2016. Effects of strains on growth performances of triploid bighead catfish, *Clarias macrocephalus* Günther, 1864. *Agriculture and Natural Resources* 50, 299-305.

Chellappa, S., Chellappa, N.T., Barbosa, W.B., Huntingford, F.A. and Beveridge, M.C.M., 1995. Growth and production of the Amazonian tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquaculture International*, 3, pp.11-21.

Chourrout, D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36, 111-126.

da Costa, O.T.F., Dias, L.C., Malmann, C.S.Y., de Lima Ferreira, C.A., do Carmo, I.B., Wischneski, A.G., de Sousa, R.L., Cavero, B.A.S., Lameiras, J.L.V. and dos-Santos, M.C., 2019. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. *Aquaculture*, 499, pp.260-268.

de Almeida, C.A.L., Vieira, J.S., Zancanela, V.T., Del Vesco, A.P., Oliveira, J.W.S., Rodrigues, P.G., Oliveira-Junior, G.M. and Brito, C.O., 2019. Embryonic development and the effect of different diets on the performance of post-larvae of tambaqui. *Interciência*, 44(11), pp.637-643 (in Portuguese).

do Nascimento, N.F., de Siqueira-Silva, D.H., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Senhorini, J.A., Nakaghi, L.S.O. and Yasui, G.S., 2017. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote*, 25(4), pp.537-544.

do Nascimento, N. F.; Veras, G. C.; Carvalho, A. P. A.; Torres, R. A.; Sampaio, E. V.; Oliveira, F. L.; Luz, R. K. Heat-Induced Triploids in *Brycon amazonicus*: a strategic fish species for aquaculture and conservation. *Zygote* 2021, 29 (5), 394–403. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000125>

dos Santos, D.K.M., Kojima, J.T., Santana, T.M., de Castro, D.P., Serra, P.T., Dantas, N.S.M., da Fonseca, F.A.L., Mariúba, L.A.M. and Gonçalves, L.U., 2021. Farming tambaqui (*Colossoma macropomum*) in static clear water versus a biofloc system with or without *Bacillus subtilis* supplementation. *Aquaculture International*, 29, pp.207-218.

Dorafshan S, Kalbassi MR, Pourkazemi M, Amiri BM, Karimi SS. Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. *Fish Physiol Biochem*. 2008 Sep;34(3):195-200. doi: 10.1007/s10695-007-9176-z. Epub 2007 Sep 6. PMID: 18665456.

Dunham, R.A., 2011. Gynogenesis, androgenesis, cloned populations and nuclear transplantation, in: Dunham, R.A. (Ed.), *Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches*. CABI, Wallingford-UK, pp. 47-57.

FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>.

Feindel, N.J., Benfey, T.J. & Trippel, E.A. (2011). Gonadal development of triploid Atlantic Cod *Gadus morhua*. *J. Fish Biol.* 79, 1900–12.

Felip, A., Piferrer, F., Zanuy, S. and Carrillo, M., 2001. Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. *Journal of Fish Biology*, 58(1), pp.76-88.

Fetherman, E.R., Lepak, J.M., Brown, B.L., Harris, D.J., 2015. Optimizing Time of Initiation for Triploid Walleye Production Using Pressure Shock Treatment. *North American Journal of Aquaculture* 77, 471–477.

Flajšhans, M., Pšenička, M., Rodina, M., Těšitel, J., 2011. Image cytometric measurements of diploid, triploid and tetraploid fish erythrocytes in blood smears reflect the true dimensions of live cells. *Cell Biol. Int.*, 67-71.

Fraser, T.W., Fjellidal, P.G., Hansen, T. and Mayer, I., 2012. Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science*, 20(4), pp.192-211.

Fujimoto, T., Yasui, G.S., Yoshikawa, H., Yamaha, E., Arai, K., 2008. Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 430–7.

Fukushima H, Bailone RI, Weiss LA, Martins MI, Zaniboni-Filho E. Triploidy in the hematology of jundia juveniles (Siluriformes: Heptapteridae). *Braz J Biol.* 2012, 72(1):147-51. doi: 10.1590/s1519-69842012000100017. PMID: 22437395.

Galo, J.M., Ribeiro, R.P., Streit-Junior, D.P., Albuquerque, D.M., Fornari, D.C., Roma, C.F.C. and Guerreiro, L.R.J., 2015. Oocyte quality of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the reproductive season. *Brazilian Journal of Biology*, 75, pp.279-284.

Gao, Z., Wang, W., Abbas, K., Zhou, X., Yang, Y., Diana, J.S., Sun, Y., 2007. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 147, 1001-1008.

Glover, K.A., Harvey, A.C., Hansen, T.J., Fjelldal, P.G., Besnier, F.N., Bos, J.B., Ayllon, F., Taggart, J.B., Solberg, M.F., 2020. Chromosome aberrations in pressure-induced triploid Atlantic salmon. *BMC Genet.* 21, 21-59.

Golpour, A., Siddique, M.A.M., Siqueira-Silva, D.H. and Pšenička, M., 2016. Induced sterility in fish and its potential and challenges for aquaculture and germ cell transplantation technology: a review. *Biologia*, 71(8), pp.853-864.

Graham, M.S., Fletcher, G.L., Benfey, T.J., 1985. Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. *Aquaculture* 50(1-2), 133-139.

Gross, M. R. (1998). One species with two biologies: Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild and in aquaculture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(S1), 131-144.

Guilherme, H.O., Santos, F.A., Costa, L.S., Prado, V.G., Palheta, G.D., de Melo, N.F., Luz, R.K. and Ribeiro, P.A., 2022. Feeding, growth, and blood chemistry of the tambaqui (*Colossoma macropomum*) held under self-feeding and time-restricted automatic feeding conditions. *Aquaculture International*, 30(1), pp.323-339.

Haffray, P., Bruant, J.S., Facqueur, J.M. and Fostier, A., 2005. Gonad development, growth, survival and quality traits in triploids of the protandrous hermaphrodite gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture*, 247(1-4), pp.107-117.

Hamasaki, M., Takeuchi, Y., Miyaki, K. & Yoshizaki, G. (2013). Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment. *Mar. Biotechnol.* 15, 133–44.

Han, Y., Liu, M., Lan Zhang, L., Simpson, B. & Xue Zhang, G. (2010). Comparison of reproductive development in triploid and diploid female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.* 76, 1742–50.

Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2012). Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 108-118.

Hilsdorf, A.W.S., Hallerman, E., Valladão, G.M.R., Zaminhan-Hassemer, M., Hashimoto, D.T., Dairiki, J.K., Takahashi, L.S., Albergaria, F.C., Gomes, M.E.D.S., Venturieri, R.L.L., Moreira, R.G., 2022. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: from Amazonian waters to sustainable production. *Reviews in Aquaculture* 14(2), 993-1027.

Huergo, G.P.C.M., Zaniboni-Filho, E., 2006. Triploidy Induction in jundiá, *Rhamdia quelen* Through Hydrostatic Pressure. *Journal of Applied Aquaculture* 18, 45-57.

Hussain, M.G., Chatterji, A., McAndrew, B.J., Johnstone, R., 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. *Theoretical and Applied Genetics* 81, 6-12.

Hyndman, C.A., Kieffer, J.D., Benfey, T.J., 2003. The physiological response of diploid and triploid brook trout to exhaustive exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134, 167–179.

Ihssen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I., Phillips, R.B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Transactions of the American Fisheries Society* 119, 698-717.

IBGE, 2025. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tambaqui/br>

Karayucel, İ., Parlak Akyüz, A. and Dernekbaşı, S., 2018. Comparison of growth performance, biochemical and fatty acid compositions between all-female diploid and triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyology*, 34(1), pp.142-148.

Káldy, J., Várkonyi, E.P., Fazekas, G.L., Nagy, Z., Sándor, Z.J., Bogár, K., Kovács, G., Molnár, M., Lázár, B., Goda, K., Gyöngy, Z., Ritter, Z., Nánási Jr., P., Horváth, Á., Ljubobratovic, U., 2021. Effects of Hydrostatic Pressure Treatment of Newly Fertilized Eggs on the Ploidy Level and Karyotype of Pikeperch *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758). *Life* 11(1296), 1-11.

Kerby, H., Everson, M., Harrell, M., Geiger, R., Starling, C., Revels, H., 2002. Performance comparisons between diploid and triploid sunshine bass in freshwater ponds. *Aquaculture* 211, 91-108.

Lahnsteiner, F., & Dünser, A. (2024). Triploid brown trout, *Salmo trutta*, develop functional gonads with age and are able to interbreed with diploid counterparts. *Journal of Fish Biology*, 104(6), 1960–1971. <https://doi.org/10.1111/jfb.15739>

Lawson, E.O., Ishola, H.A., 2010. Effects of cold shock treatment on the survival of fertilized eggs and growth performance of the larvae of African mud catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology* 5(2), 85-91.

Lincoln, R.F., Scott, A.P., 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 25(4), 385-392.

Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajshans, M., Vandeputte, M., 2001. Comparison of methods for hatchery-scale triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.). *Journal of Applied Ichthyology* 17, 247-255.

Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Mavrodiev, N., Nebesarova, J., Gela, D. & Kocour, M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench *Tinca tinca* (L.). *Aquacult. Internat.* 14, 9–25.

Lu, W., Liu, S., Long, Y., Tao, M., Zhang, C., Wang, J., Liu, Y., 2009. Comparative study of erythrocytes of polyploid hybrids from various fish subfamily crossings. *Cell Tissue Res.* 336, 159-163.

Madaro, A., Kjølglum, S., Hansen, T., Fjellidal, P.G., Stien, L.H., 2022. A comparison of triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) performance and welfare under commercial farming conditions in Norway. *Journal of Applied Aquaculture* 34(4), 1021-1035.

Malison, J.A., Held, J.A., Weil, L.S., Kayes, T.B. and Thorgaard, G.H., 2001. Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock. *North American Journal of Aquaculture*, 63(1), pp.17-24.

Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P. and Carneiro, P.C.F., 2012. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote*, 20(1), pp.39-43.

Marques, L.S., Gracia, L.F.G., Atehortúa, M.P., Rodrigues, R.B., dos Santos Teixeira, N., Oberst, E.R. and Streit Jr, D.P., 2021. Urine, feces, and blood contamination of frozen and fresh tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) sperm. *Cryobiology*, 102, pp.121-126.

Meng, Z., Zhang, B., Song, C., Yang, L., Liu, X., Jia, Y., Yang, Z. and Zhang, H., 2023. Optimal conditions for pressure shock induction of triploidy in turbot and a comparison of induction efficiency with cold shock. *Aquaculture Reports*, 33, p.101775.

Oliveira, R.G.S.D., Souza, G.B.D., Maria, A.N., de Freitas, R.A. and de Almeida, F.L., 2023. Effects of GnRH analogs on strip spawning and steroid plasma levels of *Colossoma macropomum*. *Aquaculture International*, pp.1-14.

Ottera, H., Thorsen, A., Karlsen, O., Fjelldal, P.G., Morton, H.C., Taranger, G.L., 2016. Performance of triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in commercial aquaculture. *Aquaculture* 464, 699-709.

Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384, 167-243.

Pechsiri, J. and Yakupitiyage, A., 2005. A comparative study of growth and feed utilization efficiency of sex-reversed diploid and triploid Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*, 36(1), pp.45-51.

Pereira, G.A., Copatti, C.E., Figueiredo, R.A.C.R.D., Reis, F.J.D.S., Costa, L., Souza, G., Melo, J., 2022. Cold, heat, or double thermal shock in tambaqui (*Colossoma macropomum*): triploid induction, fertilization rate, growth, and hematological variables. *Journal of Applied Aquaculture*, 1-11.

Peruzzi, S., Chatain, B., 2000. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture*, 189(1-2), pp.23-37.

Peruzzi, S., Chatain, B., Saillant, E., Haffray, P., Menu, B., Falguière, J., 2004. Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1. Performances, maturation and carcass quality. *Aquaculture* 230, 41-64.

Peruzzi, S., Puvanendran, V., Riesen, G., Seim, R.R., Hagen, Ø., Martínez-Llorens, S., Petersen, I.B.F., Fernandes, J.M.O., Jobling, M., 2018. Growth and development of skeletal anomalies in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed phosphorus-rich diets with fish meal and hydrolyzed fish protein. *PLoS One* 13(3), e0194340.

Piferrer, F., 2018. Epigenetics of Sex Determination and Differentiation in Fish, in: Wang, H.P., Piferrer, F., Chen, S.L., Shen, Z.G. (Eds.), *Sex Control in Aquaculture*. Wiley, pp. 65-84.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293(3-4), 125-156.

Piferrer, F., Benfey, T.J., Donaldson, E.M., 1994. Gonadal morphology of normal and sex-reversed triploid and gynogenetic diploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish Biol.* 45(4), 541-553.

Preston, A.C., Taylor, J.F., Craig, B., Bozzolla, P., Penman, D.J., Migaud, H., 2013. Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture* 414, 160-166.

Puvanendran, V., Lein, I., Bangera, R., Mortensen, A., Thorsen, A., 2019. Family differences on triploid induction, sexual maturation and its contribution to sea cage performance of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 506, 14–22.

Rodrigues, A.P.O., de Freitas, L.E.L., Maciel-Honda, P.O., Lima, A.F. and de Lima, L.K.F., 2024. Feeding rate and feeding frequency during the grow-out phase of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in earthen ponds. *Aquaculture Reports*, 35, p.102000.

Saranyan PV, Ross NW, Benfey TJ. Erythrocyte heat shock protein responses to chronic (in vivo) and acute (in vitro) temperature challenge in diploid and triploid salmonids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2017 Apr;206:95-104. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.01.007. Epub 2017 Jan 13. PMID: 28089856.

Sato, L.S., Jorge, P.H., Mastrochirico-Filho, V.A., Hata, M.E., Batlouni, S.R., Kuradomi, R.Y., Porto-Foresti, F., Foresti, F. and Hashimoto, D.T., 2020. Triploidy in tambaqui *Colossoma macropomum* identified by chromosomes of fish larvae. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 9(3), pp.65-69.

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, S110-S114

Silva, G.F., Shiotsuki, L., Dias, L.T. and Teixeira, R.A., 2023. Estimation of genetic parameters for weight and length gains in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Brazilian Journal of Biology*, 83, p.e277423.

Silva Júnior, G., Copatti, C.E., Costa, L., Souza, G., Bonfá, H.C., Melo, J.F.B., 2021. Triploidy induction in tambaqui (*Colossoma macropomum*) using thermal shock: fertilization, survival and growth performance from early larval to the juvenile stage. *Journal of Applied Aquaculture* 34(4), 1-16.

Siqueira-Silva DH, Saito T, Dos Santos-Silva AP, da Silva Costa R, Psenicka M, Yasui GS. Biotechnology applied to fish reproduction: tools for conservation. *Fish Physiol Biochem*. 2018 Dec;44(6):1469-1485. doi: 10.1007/s10695-018-0506-0. Epub 2018 Apr 29. PMID: 29707740.

Small CD, Benfey TJ, Crawford BD. Tissue-specific compensatory mechanisms maintain tissue architecture and body size independent of cell size in polyploid zebrafish. *Dev Biol*. 2024 May;509:85-96. doi: 10.1016/j.ydbio.2024.02.005. Epub 2024 Feb 20. PMID: 38387487.

Sousa, R.G.C., da Rocha, M.M., Pontuschka, R.B. and Barreiros, H.T., 2017. Effects of mechanical aeration on tambaqui farming (*Colossoma macropomum*) in excavated tanks. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 5(3), pp.113-119.

Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., Hausen, T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 483-515.

Tebaldi, P.C., Amaral Jr., H., 2009. Production of tetraploid nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the application of thermal shock. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* 10(10), 1-13.

Teskeredžić, E., Donaldson, E.M., Teskeredžić, Z., Solar, I.I. and McLean, E., 1993. Comparison of hydrostatic pressure and thermal shocks to induce triploidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 117(1-2), pp.47-55.

Thorgaard, G.H. and Gall, G.A., 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, 93(4), pp.961-973.

Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish, in: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 405–434.

Tiwary, B.K., Kirubakaran, R. and Ray, A.K., 2000. Gonadal development in triploid *Heteropneustes fossilis*. *Journal of fish biology*, 57(5), pp.1343-1348.

Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K., 2004. The biology of triploid fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 14, 391-402.

Val, A.L., Oliveira, A.M., 2021. *Colossoma macropomum*—A tropical fish model for biology and aquaculture. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 335(9-10), 761-770.

Wagner, E.J., Arndt, R.E., Routledge, M.D., Latremouille, D. and Mellenthin, R.F., 2006. Comparison of hatchery performance, agonistic behavior, and poststocking survival between diploid and triploid rainbow trout of three different Utah strains. *North American Journal of Aquaculture*, 68(1), pp.63-73.

Wang, C.A., Li, F., Wang, D., Lu, S., Han, S., Gu, W., Jiang, H., Li, Z. and Liu, H., 2024. Enhancing Growth and Intestinal Health in Triploid Rainbow Trout Fed a Low-Fish-Meal Diet through Supplementation with *Clostridium butyricum*. *Fishes*, 9(5), p.178.

Wolters, W.R., Chrisman, C.L., Libey, G.S., 1981. Induction of triploidy in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 110, 310-312.

Wolters, W.R., Libey, G.S., Chrisman, C.L., 1982. Effects of triploidy on growth and gonadal development of channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 111, 102-105.

Wong, T.T., Zohar, Y. 2015. Production of reproductively sterile fish: A mini-review of germ cell elimination technologies. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 221, pp.3-8.

Woynárovich, A. and Van Anrooy, R., 2019. Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, (624), pp. 1-121.

Xavier, P.L.P., Senhorini, J.A., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Shimoda, E., Silva, L.A., Dos Santos, S.A., Yasui, G.S., 2017. A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. *Front Genet* 8, 131.

Xu, J., You, F., Wu, X., Zhang, P., Lin, Y., Jiang, H., Zheng, C., 2008. Induction of triploidy in large yellow crocker *Pseudosciaena crocea* (Richardson, 1846): effects of pressure shocks and growth performance in the first rearing year. *Aquac. Res.* 39, 1369-1376.

Yasui, G.S., Nakaghi, L.S.O., Monzani, P.S., Nascimento, N.F.D., Pereira dos Santos, M., Goes, C.A.G., Senhorini, J.A., 2020. Triploidization in the streaked prochilod *Prochilodus lineatus* inferred by flow cytometry, blood smears and karyological approaches. *Journal of Applied Ichthyology* 36, 336-341.

Zajicek, P., Goodwin, A.E., Weier, T., 2011. Triploid Grass Carp: Triploid Induction, Sterility, Reversion, and Certification. *North American Journal of Fisheries Management* 31, 614–618.

Zhu Y, Xiong W, Xu Y, Zhang P, Zhang J, Luo Y. Comparison of metabolic scaling between triploid and diploid common carp. *J Comp Physiol B.* 2021 Jul;191(4):711-719. doi: 10.1007/s00360-021-01365-x. Epub 2021 Apr 3. PMID: 33811547.



Hematological and Physiological Indicators of Health in Triploid Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Aldessandro da C. Amaral ⁽¹⁾, Lucas S. Torati ⁽²⁾, Luciana N. Ganeco-Kirschnik ⁽²⁾, Jessica A. M. Cruz ⁽³⁾, Janaina S. I. Valandro ⁽⁴⁾, Velmurugu Puvanendran ⁽⁵⁾; Fernanda L. Almeida O'Sullivan ⁽²⁾

Hematological and Physiological Indicators of Health in Triploid Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Aldessandro da C. Amaral ⁽¹⁾, Lucas S. Torati ⁽²⁾, Luciana N. Ganeco-Kirschnik ⁽²⁾, Jéssica A. M. Cruz ⁽³⁾, Janaína S. I. Valandro ⁽⁴⁾, Wallice L. P. Duncan ⁽⁵⁾, Velmurugu Puvanendran ⁽⁶⁾; Fernanda L. Almeida O'Sullivan ⁽²⁾

(1) Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Avenida Rodrigo Octávio, Manaus, AM, CEP 69080-900, Brazil.

(2) Embrapa Pesca e Aquicultura, Av. NS 10, cruzamento com a Av. LO 18 Sentido Norte Loteamento - Água Fria, Palmas, TO, CEP 77008-900, Brazil.

(3) Instituto Tocantinense de Educação Superior e Pesquisa (ITOP). Iniciação Científica em parceria com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT) junto com a Embrapa Pesca e Aquicultura.

(4) Aquaculture Center of UNESP - Caunesp, Postgraduate Program in Aquaculture. Access route Professor Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal/São Paulo - CEP: 14844900, Brazil

(5) Laboratório de Morfologia Funcional, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus 69067-005, AM, Brazil

(6) Center for Marine Aquaculture, Nofima AS, Muninbakken 9, 9019 Tromsø, Norway.

Corresponding author: Velmurugu Puvanendran: Email: velmurugu.puvanendran@nofima.no. Center for Marine Aquaculture, Nofima AS, Muninbakken 9, 9019 Tromsø, Norway.

Abstract

This study aimed to evaluate the physiological condition and health status of triploid tambaqui (*Colossoma macropomum*) through hematological and biochemical analyses. Hematocrit, hemoglobin, and erythrocyte count values, as well as glucoses and plasma protein (globulin and albumin) concentrations, were assessed in triploid and diploid fish. In addition, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and mean corpuscular volume (MCV) values were determined. The fertilization index (FI) and embryonic survival index (ESI) were elevated in both the control and triploid groups. Triploid fish presented larger erythrocytes, lower erythrocyte counts, and slightly reduced levels of hemoglobin and hematocrit. Furthermore, the MCV and MCH were higher in triploid fish, reflecting a higher hemoglobin content per cell, while the MCHC showed similar values between diploids and triploids, indicating that this function was not compromised in triploid fish. Biochemical parameters did not show significant alterations. These findings indicate that triploid tambaqui appear to represent compensatory physiological adjustments to the increased DNA content in red blood cells, being able to maintain efficient oxygen transport and overall respiratory capacity, resulting in the maintenance of normal physiological functions, comparable to those of diploids. In summary, our results support the sustainable use of triploidy in tambaqui aquaculture.

Keywords: triploidy, *Colossoma macropomum*, hematology, aquaculture, erythrocyte

Introduction

With the stagnation of capture fisheries since the 1990s, coupled with population growth, aquaculture emerged as an alternative to meet the demand for fish protein. Thus, global production of farmed fish has been steadily increasing and intensifying. However, to achieve satisfactory results, several factors must be carefully considered and balanced in fish farming, such as the selection of the species to be farmed, which is particularly critical. Tambaqui (*Colossoma macropomum*), a characid native to the Amazon basin, presents key characteristics that support its cultivation potential, including rapid growth, physiological and anatomical adaptation to environments with low oxygen concentrations [1-2], tolerance to high densities [3,4,5], and a large market, mainly in the North region of Brazil. Despite these favorable traits, tambaqui farming systems and technological development still remain significantly behind those established for other fish species that dominate Brazilian aquaculture and serve as a benchmark in both national and international contexts, such as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [6]. This disparity underscores the need to intensify research efforts aimed at advancing and innovating technologies for native species such as tambaqui, with a focus on strategies that confer competitive advantages to the sector.

Considering techniques to increase productivity, the farming of triploid fish is widely practiced in countries where aquaculture is already a consolidated industry, such as Australia (salmon *Salmo salar*) [7] and Scotland (trout *Oncorhynchus mykiss*) [8]. In other countries, some fish species have also demonstrated 100% efficiency in obtaining triploids, among them the channel catfish *Ictalurus punctatus* (USA) [9], coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Croatia and Norway) [10,11], European catfish *Silurus glanis* (Czech Republic) [12], to the neotropicals jundiá *Rhamdia quelen* (Brazil) [13,14] and matrinxã *Brycon amazonicus* (Brazil) [15]. The production of triploid fish is very advantageous in the farming process, generating economic profits, mainly because they are sterile individuals. For tambaqui, there were some attempts to induce triploidy through temperature shock with 17 to 59% induction [16,17,18] and with hyperbaric pressure with 100% induction [19]. These positive factors of triploidy, added to the advantageous economic characteristics of tambaqui, can add more value to the production of the species, allowing a high yield in a shorter period of time.

Hematological examination is one of the commonly used methods to assess the physiological status and health of fish [20,21]. Hematological and biochemical indices provide comprehensive information about the oxygen transport capacity of fish, immunological potential, stress level, disease, intoxication and nutritional status, [22]. As part of the ultimate

goal of developing triploidy technology for tambaqui, the present study aimed to assess the physiological condition and health status of individuals induced to triploidy through comprehensive hematological analyses, hence ensuring that the triploidy condition does not compromise the overall health and welfare of the fish.

2. Material and methods

All procedures of this work comply with the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – Embrapa Fisheries and Aquaculture (protocol n° 11/2019). The project has Authorization of Access to Genetic Heritage registered under the code A5784B5.

2.1 Artificial reproduction and experimental design

The study was conducted at the Embrapa Pesca e Aquicultura (Palmas-TO, Brazil). On November 8th and 9th, 2023, 3.5-year-old males ($n=3$, 4.5 ± 0.5 kg) and females ($n=2$, 8 kg) tambaqui were selected and treated with carp pituitary extract (CPE, Danube Piscicultura, Brazil), to induce ovulation, spawning and spermiation. Females received a preparatory intraperitoneal dose of 0.5 mg.kg^{-1} body weight (BW) and 12 hours later a dose of 5.0 mg.kg^{-1} BW, and males were treated with a single intraperitoneal dose of 2.5 mg.kg^{-1} BW. When females were releasing eggs at 260 degree-hours, they were anesthetized and stripped for the release of the eggs. The color of the eggs was checked, which was homogeneously light green and free of any white spots (dead/overripe eggs). At the same time, males had their urinary tract emptied, the urogenital papillae dried, and semen was collected using sterile 5 mL dry syringes. After collection, sperm was examined under an optical microscope to confirm whether any urine/feces contamination resulted in sperm activation, which would lead to reduced or no fertilization [23]. Equal amounts of semen from three males (2 mL/male) were then pooled and gently mixed prior to fertilization. Likewise, equal amounts of eggs (200 g/female) from the two females were pooled prior to fertilization.

The treatment was performed in triplicate and each replicate consisted of 12.5 g of pooled eggs fertilized with 250 μL of pooled semen inside a 50 mL Falcon tube with perforated caps to prevent pressure build-up inside the Falcon tube during the pressure treatment. The Falcon tubes containing fertilized eggs were placed together in the stainless steel chamber of the

hydrostatic pressure shock machine (TRC Hydraulics, Dieppe, New Brunswick, Canada), which was filled with incubator water (29 °C). Hence, 95 seconds after fertilization (SPF) the eggs were submitted to a pressure of 8000 psi during 90 seconds [19]. Immediately after the pressure treatment, decompression was performed instantly using a pressure relief valve. Control (C) replicates were fertilized in Falcon tubes similar to the treatment, but were not subjected to any pressure. All fertilized eggs in each of the Falcon tubes were incubated in individual 200 L incubators (n = 6).

2.2 Fertilization Index (FI) and Embryo Survival (hatching) Index (ESI)

To estimate the fertilization index (FI) and embryo survival index (ESI), a random triplicate samples of 5 mL water sample containing embryos (at final gastrula stage) were taken from each incubator at 6 hours post fertilization (hpf) for FI estimation and 11 hpf for ESI estimation and were placed in a Petri dish to form a single layer of embryos. To estimate FI, the number of fertilized and unfertilized eggs were counted under a binocular microscope and FI was calculated as $FI = (\text{Number of fertilized eggs} / \text{total number of eggs in the sample}) * 100$. To estimate the ESI, the number of moving embryo inside the egg (viable) and whitish eggs or with dead embryos (nonviable) were counted, and the ESI was calculated as $ESI = (\text{Number of viable eggs} / \text{total number of eggs}) * 100$. The stage of viable embryos at 11 hpf is considered as a good proxy for the number of hatched larvae [24]. Larval hatching started approximately 12 hours after fertilization at 28°C (336 degree-hours).

2.3 Rearing conditions and feeding regime

The larvae were kept in the incubators and from the 5th day post hatching (dph) they were fed with vitellus of brine shrimp eggs (Vitellus; BernAqua HatcheryFeeds; Belgium) every two hours. From 15 to 20 dph, the juveniles were co-fed *ad libitum* with commercial powdered feed (50% crude protein, Aqua line SUPRA, São Leopoldo-RS, Brazil), for weaning. Subsequently, a total of 1,956 treated larvae and 2,002 control larvae were transferred to 15,000 L outdoor vinyl tanks, previously fertilized with rice bran (750 g) and simple superphosphate (500 g). They were kept in a partial water renewal system under constant aeration. Water quality was maintained at ideal conditions (Oxygen 6 mg L⁻¹; pH – 7.5) for the species [25]. The average temperature was 29°C, and 12 h of light per day (12L:12D). Larvae were completely weaned onto a dry diet at 20 dph. From that point until 16 months of age, all fish were fed a commercial diet containing 45% crude protein (Aqua line SUPRA, São Leopoldo, Brazil), with feed particle

size adjusted according to the developmental stage, offered daily at 10% of the estimated total biomass.

2.4 Blood smear

To identify and confirm triploid individuals, the longest diameter of erythrocytes from 12-month-old fish was measured. For this, 70 control fish and 70 treated fish received individual electronic pit tags (AnimallTag, São Paulo, Brazil) and were sedated with 100 mg L⁻¹ tea tree essential oil - tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (Ferquima, Vargem Grande Paulista- SP, Brazil) for blood sampling to verify the ploidy status. Whole blood, collected in heparinized syringes, was immediately used to prepare blood smears, which were air-dried and stained with Giemsa. Images of erythrocytes were obtained under an optical microscope at 100X magnification, and the diameter of 30 erythrocytes per sample was measured using Image J software (v. 1.8) to identify triploid fish [19].

2.5 Sampling

At 16 months of age, 30 control fish and 35 pressure-treated fish were sampled for biometric and hematological analyses. Biometric data were recorded for body weight (W, gr), total length (TL, cm), and standard length (SL, cm). Fish were deeply sedated with 100 mg L⁻¹ of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil, and blood was collected from the caudal vein with a syringe rinsed with 10% EDTA.

2.6 Biochemical parameters

Immediately after collection, the blood samples were centrifuged at 2500 rpm for five minutes and plasma was collected and frozen at - 80 °C until analysis. The biochemical variables analyzed were glucose, determined using an enzymatic colorimetric test (InVitro®, Belo Horizonte, Brazil), total protein, measured using the biuret method, and albumin, determined using the bromocresol green method (colorimetric determination; InVitro®, Belo Horizonte, Brazil). Serum globulin was estimated by the subtraction of albumin from total plasma protein concentration.

2.7 Hematological parameters

Hematocrit and hemoglobin rates were analyzed as described by Goldenfarb et al. (1971) [26] and Drabkin (1948) [27], respectively. Erythrocytes were counted in a Neubauer chamber

under a 40 X objective of an optical microscope, after blood dilution in citrate formaldehyde (Collier, 1944) [28]. Then, it was possible to estimate mean corpuscular volume [MCV = (hematocrit x 10)/erythrocytes], mean corpuscular hemoglobin [MCH = (hemoglobin x 10)/erythrocytes] and mean corpuscular hemoglobin concentration [MCHC = (hemoglobin rate x hematocrit) x 100], according to Wintrobe (1934)[29].

2.8 Statistical analysis

Fertilization index, embryo survival index, fish length and weight, biochemical (glucose, total protein, albumin and serum globulin), hematimetric indices (MCV, MCH and MCHC) and haematological parameters (haematocrit, haemoglobin and erythrocytes number) were checked for normal distribution and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. The equality of the remaining data was analyzed using the T-test to compare the treatment mean with that of the control in all analyses (confidence limit of $p < 0.05$). Data are represented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analyses and graphical outputs were performed using RStudio (version 2025.05.0+496; R 4.5.0 for Windows). The **RVAideMemoire**, **car**, and **dplyr** packages were used for data manipulation and analytical procedures.

3. Results

3.1 Fertilization Index (FI) and Embryo Survival (hatching; ESI) indices

The fertilization rate were 97% in the control group and 91% in the pressure-treated group, with a significant difference between the means ($t(4) = 3.5496$; $p = 0.02381$). The embryonic survival rate for both groups was 94%, with no significant difference between the means ($t(4) = 0.3015$; $p = 0.778$) (Figure 1).

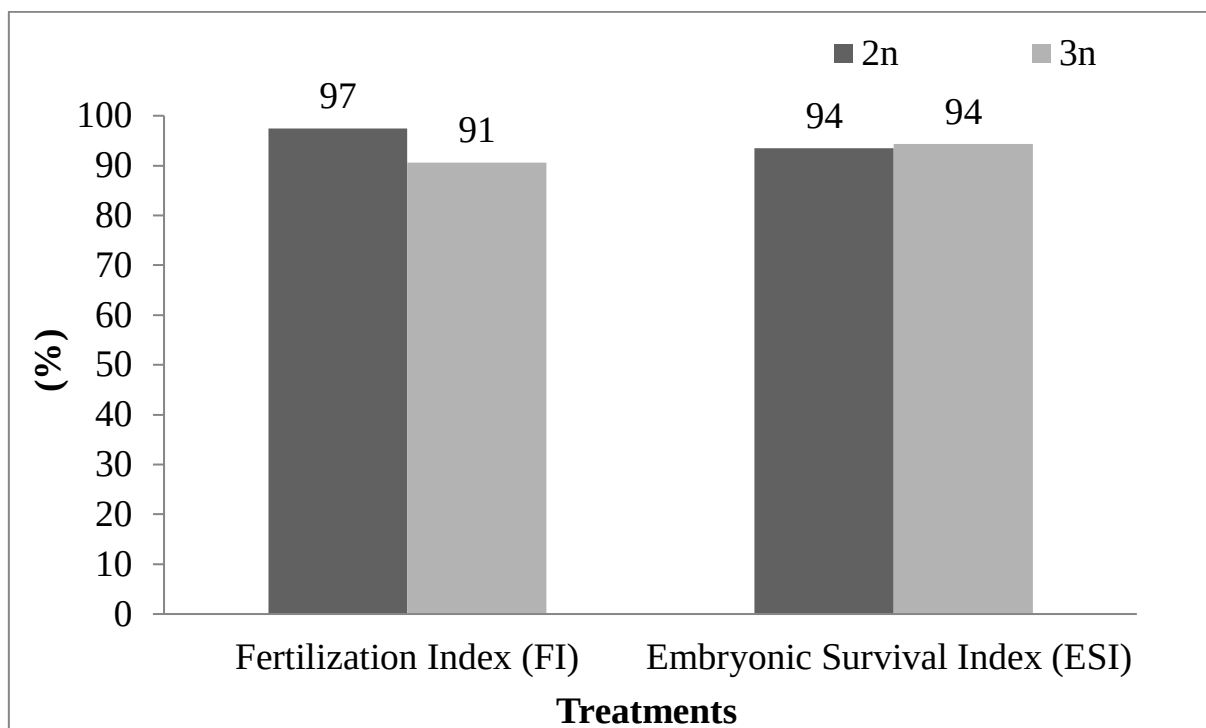


Figure 1. Fertilization index (FI) and embryonic survival index (ESI) in tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy: diploid (2n, control) and triploid (3n, pressure-treated).

3.2 Blood smear

The erythrocytes of diploid fish exhibited an average length of $12.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$, whereas those of fish induced to triploidy showed a significant ($t(123) = -19$, $p = < 2.2e^{-16}$) larger average size of $15.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$, consistent with the expected increase in cell dimensions associated with triploidy (Figure 2).

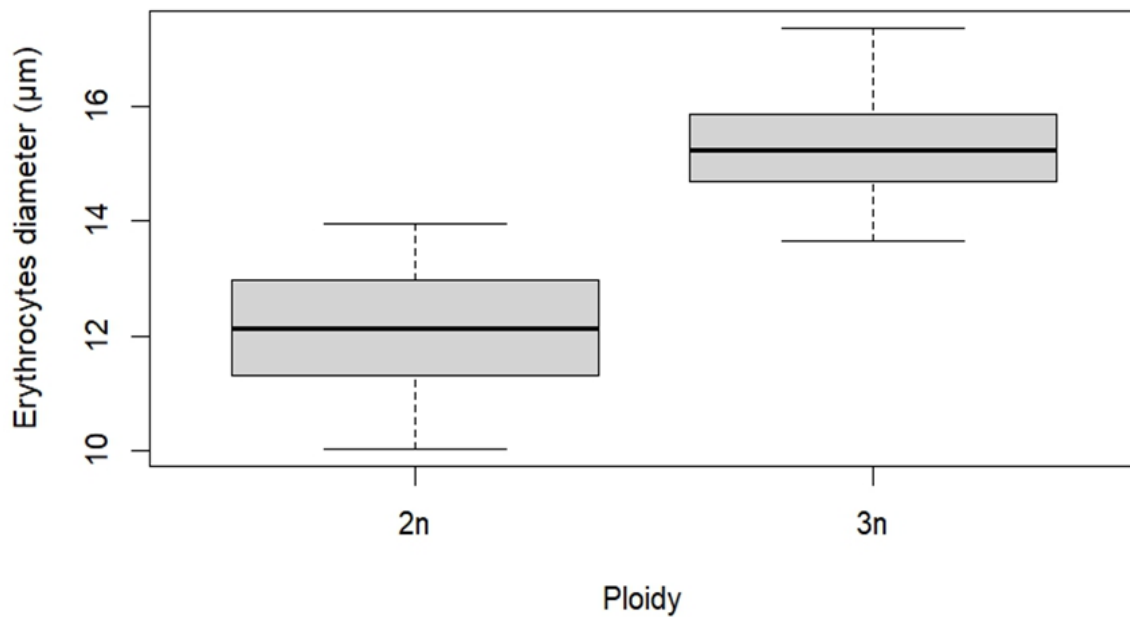


Figure 2. Erythrocyte size of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Triploid individuals showed higher median values and a distribution shifted toward larger cell diameters compared to diploids, indicating increased erythrocyte size associated with ploidy level.

3.3 Biometrics

At 16 months of age, the fish were sampled for biometrics (Figure 3). The mean weight of the control group was $1,268 \text{ g} \pm 203.2$ and that of the triploid group was $1,042 \text{ g} \pm 269.9$. The t-test showed a significant difference between the means of the groups ($t(43) = 3.192$; $p = 0.00267$). For total length, the mean of the control group was $40.06 \text{ cm} \pm 1.98$ and that of the triploid group was $38.00 \text{ cm} \pm 2.72$. The t-test showed no significant difference between the means ($t(43) = 2.5074$; $p = 0.01602$). For the standard length, the mean for the control was $34.88 \text{ cm} \pm 1.98$ and for the treated group was $33 \text{ cm} \pm 2.42$, with no significant difference between the means ($t(43) = 2.4953$; $p=0.0165$).

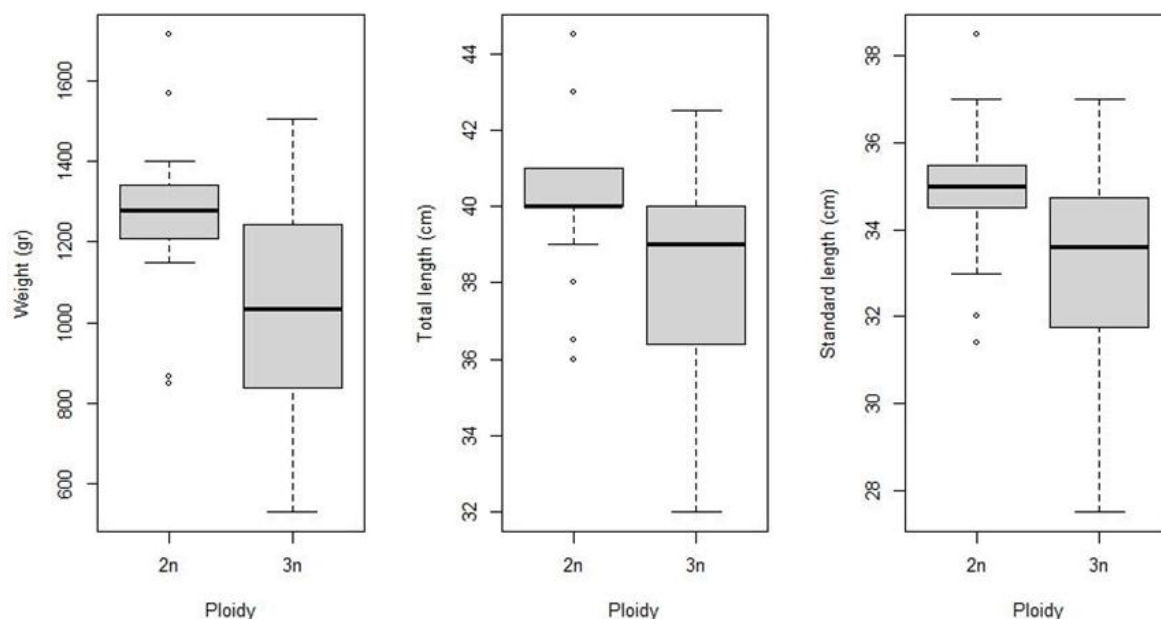


Figure 3. Weight, total length, and standard length of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Diploid individuals tended to show higher median values for all morphometric variables, while triploids exhibited greater within-group variability. Points represent outliers.

3.4 Biochemical parameters

Blood plasma biochemical analyses indicated no statistically significant differences between triploid tambaqui ($n= 35$) and diploid controls ($n= 30$), as reflected by comparable mean levels of glucose, total protein, albumin and serum globulin (T-test; $p > 0.05$; figure 4). The glucose mean was 10.36 ± 2.40 mmol/L in the triploid group and 9.64 ± 2.48 mmol/L in the control group, with no significant difference between the means ($t(63) = 1.20$, $p = 0.23$). For total protein, the mean of the triploid group was 2.53 ± 0.52 g/dL and of the control group was 2.75 ± 0.41 g/dL, with no significant difference between the means ($t(63) = 1.88$, $p=0.06$). The albumin mean values were 0.89 ± 0.17 and 0.92 ± 0.17 g/dL for the triploid and control groups, respectively ($t(63) = 0.83$, $p = 0.40$). The globulin was 1.64 ± 0.47 and 1.83 ± 0.37 g/dL for the triploid and control groups, respectively ($t(63) = 1.78$, $p = 0.07$).

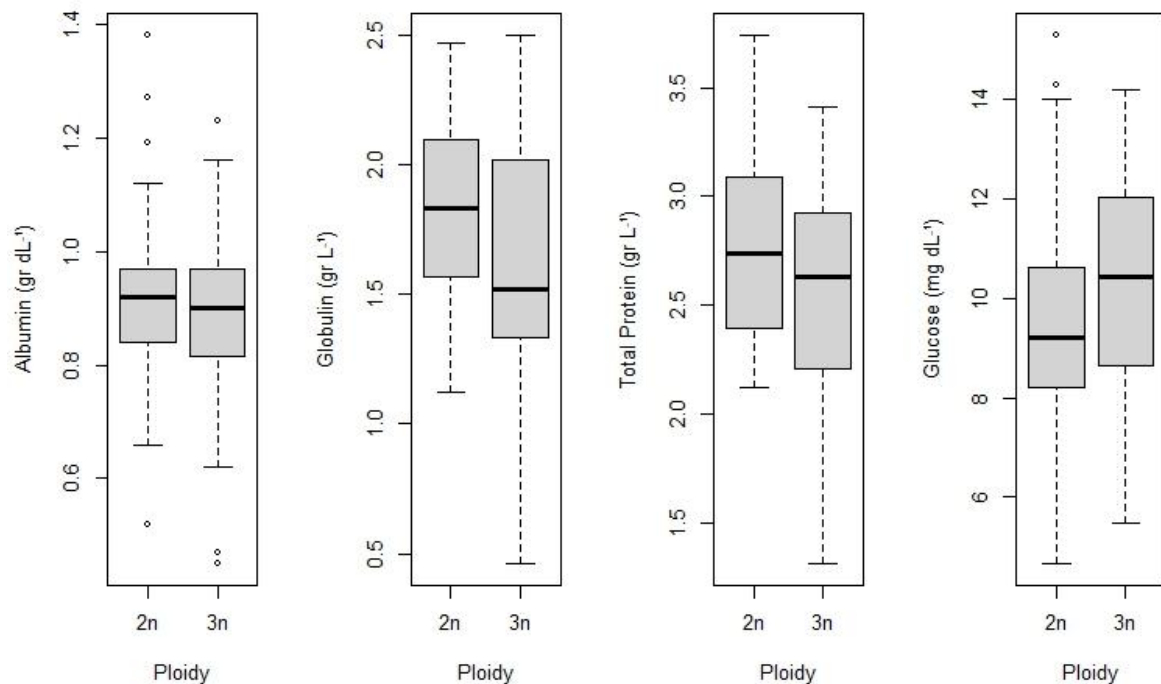


Figure 4. Biochemical parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. In general, diploid individuals showed slightly higher medians for most biochemical parameters, except for glucose, while triploid individuals showed greater intragroup variation in some variables. Points represent outliers.

3.5 Hematological parameters

Blood samples were collected from 65 fish, 30 from the control group (2n) and 35 from the triploid group (3n). The hematocrit mean of triploid fish ($35.82 \pm 3.24\%$) was similar to the mean of the control group ($37 \pm 3.95\%$) ($t(51) = 1.17$; $p = 0.24$). The hemoglobin means were also similar between triploid ($9.18 \pm 2.69 \text{ g dL}^{-1}$) and control fish ($9.45 \pm 1.88 \text{ g dL}^{-1}$) ($t(42) = 0.25$; $p = 0.79$). The average number of erythrocytes per μL was lower in triploid ($1.5 \pm 3.24 \times 10^6$) than control ($1.8 \pm 3.95 \times 10^6$) ($t(53) = 2.82$; $p = 0.006$; (Figure 5).

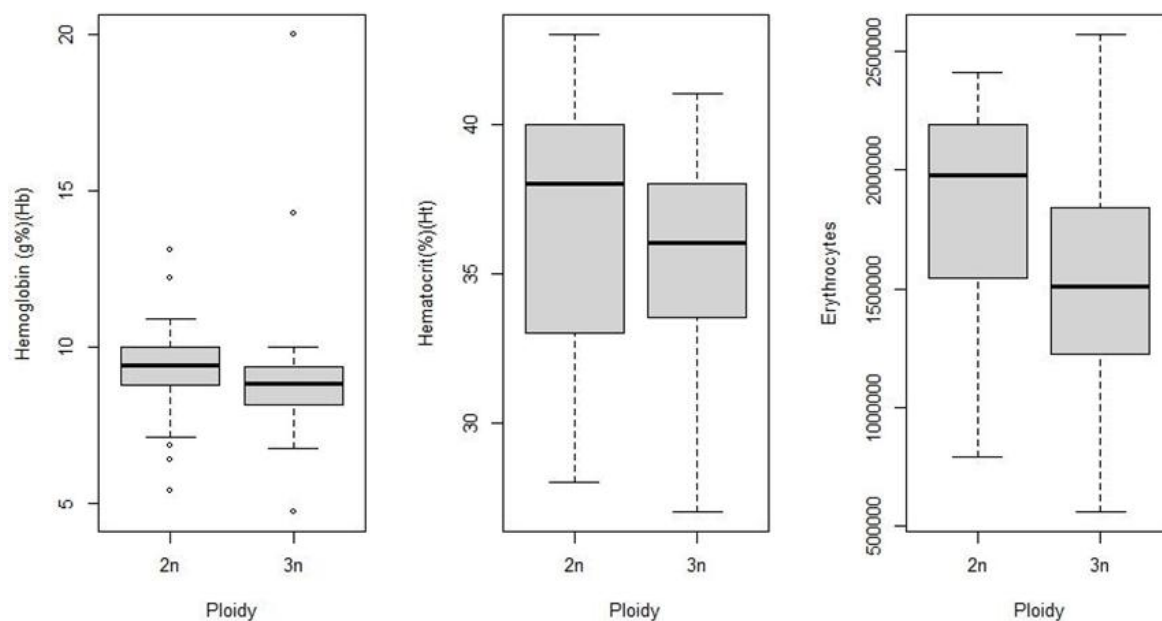


Figure 5. Hematological parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Diploid individuals tended to present higher median values for all hematological parameters, whereas triploids showed wider variability in some measurements. Points represent outliers.

Regarding the hematimetric indices, the triploid group presented a significantly higher mean corpuscular volume- MCV (0.00025 ± 0.0001) than the control group (0.00021 ± 0.00005) ($t(36) = -2.42$, $p = 0.020$), a significantly higher mean corpuscular hemoglobin - MCH (0.000063 ± 0.000025) than the control group (0.000051 ± 0.00002) ($t(33) = 2.48$, $p = 0.017$), and a nonsignificant mean corpuscular hemoglobin concentration - MCHC, 25.61 ± 8.06 (3n) and 25.25 ± 5.04 (2n, ($t(43) = 0.19$, $p = 0.84$) (Figure 6).

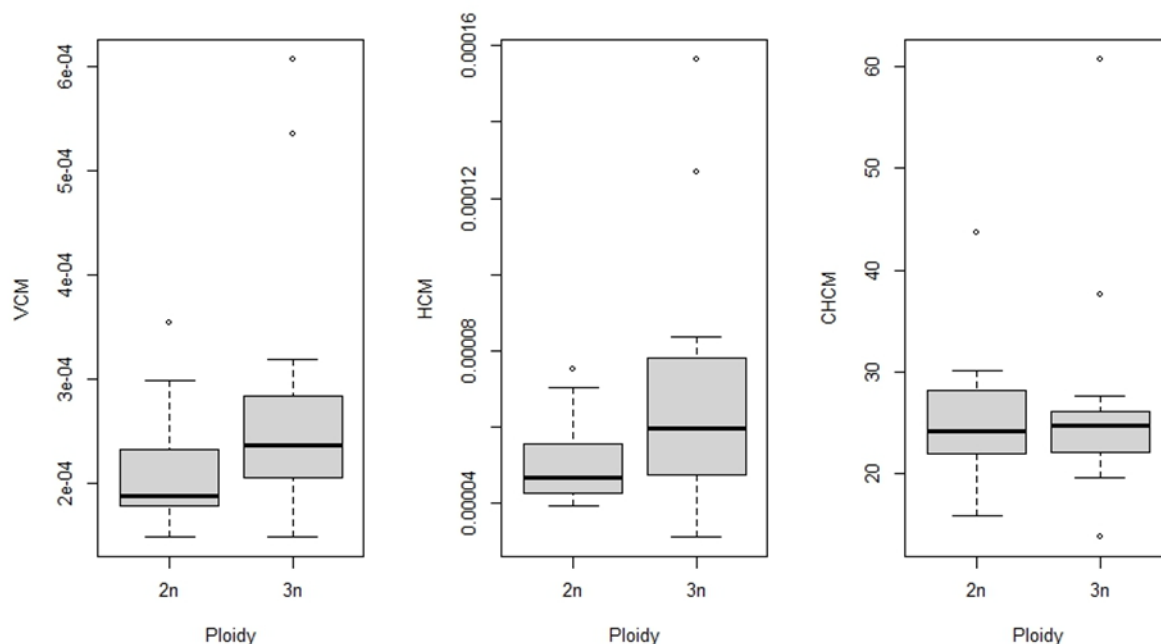


Figure 6. Hematimetric indices of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different ploidy levels. Comparison of VCM, HCM, and CHCM between diploid (2n) and triploid (3n) fish. Triploids showed higher values of mean corpuscular volume (VCM) and mean corpuscular hemoglobin (HCM), whereas mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) remained relatively similar between ploidy groups. Points represent outliers.

4. Discussion

Hematology provides simple yet reliable methods for assessing the physiological status of fish, offering valuable insights into various biological processes. It serves as a good indicator of fish welfare and health, and, indirectly, of the environmental conditions to which they are exposed. This study aimed to evaluate the physiological condition and health status of triploid tambaqui through detailed hematological analyses. These assessments were conducted to ensure that the triploid condition does not adversely affect the fish's overall health or welfare, thereby supporting the sustainable application of triploidy as a biotechnological tool to enhance tambaqui production.

Measuring erythrocytes through blood smears is a rapid and inexpensive method widely used to determine ploidy in teleosts [30,31]. However, additional analyses, such as flow cytometry and cytogenetics, are often required to validate the results and confirm triploidy. In

a previous study, we confirmed the correlation between erythrocyte size, flow cytometry and karyotype in diploid and triploid tambaqui, demonstrating that erythrocyte diameter measurement is a validated and reliable method for identifying triploid tambaqui [19]. Hence, in this study we used the erythrocyte diameter, measured in blood smears, to confirm the triploid tambaqui.

Our results show that the number of erythrocytes in triploid tambaqui was lower than in diploids. This reduction results from the increase in erythrocyte size and, consequently, the decrease in their number, as also reported in other species [32,33]. The extra genetic material leads to reduced erythrocyte counts in triploid organisms, a homeostatic mechanism that compensates for the increase in cell volume [30,34,35].

No significant differences in total or standard length were observed between diploid and triploid tambaqui at 16 months of age, although diploid individuals exhibited significantly higher mean total weight. This difference may be associated with greater energy expenditure related to respiratory gas transport and metabolic activity in triploid fish [30,36]. Similar patterns have been observed in *Oncorhynchus mykiss* [30], *Cyprinus carpio* [32], and *Clarias gariepinus* [36], where triploid fish showed lower erythrocyte counts and relatively slower growth, possibly due to reduced oxygen transport efficiency and increased energy expenditure.

No significant differences were observed in hemoglobin (Hb) and hematocrit values, although mean values were slightly lower in triploid tambaqui, which may reflect subtle physiological adjustments in oxygen transport efficiency without compromising growth or overall condition. Red blood cells are directly involved in oxygen and carbon dioxide transport through their main component, hemoglobin, while hematocrit represents the percentage of blood volume occupied by these cells [30,37]. Thus, both the number and volume of red blood cells indicate the blood's oxygen-carrying capacity [37,38]. The Hb content and hematocrit are regarded as a key indicator of the secondary stress response.

Regarding hematometric indices, mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) were higher in triploid fish compared to diploids, reflecting higher hemoglobin content per cell, possibly due to the greater DNA content in triploid red blood cells. Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), which represents the ratio of hemoglobin quantity to cell volume, showed similar values between diploids and triploids, indicating that this function was not compromised in triploid fish. Hence, although triploid erythrocytes are morphologically larger, the internal hemoglobin concentration remains within a stable physiological range, suggesting compensatory hematological efficiency between the groups [37,38].

Biochemical parameters showed no differences in triploid tambaqui compared to the control group, indicating no effects in plasma glucose levels, total protein, albumin and serum globulin caused by triploid condition. This indicates that, in triploid tambaqui, the activation of stress response mechanisms, such as cortisol and catecholamine release which stimulate gluconeogenesis and the mobilization of energy reserves [30,36] and the immune response [39], remained stable between ploidies, and may not be influenced by chromosomal variation. Altogether, these results point that the physiological homeostasis may have been preserved in triploid tambaqui.

Conclusion

The results of this study indicate that triploidy in *Colossoma macropomum* did not cause significant alterations in hematological or biochemical parameters that could compromise fish health or physiological performance. Although triploid individuals exhibited larger erythrocytes, lower cell counts, and slightly reduced hemoglobin and hematocrit values, these differences appear to represent compensatory physiological adjustments that maintain efficient oxygen transport and overall respiratory capacity. Similarly, the stability of total protein, globulin, albumin and glucose concentrations demonstrate that triploid fish can preserve biochemical homeostasis even under increased metabolic demands or physiological stress. Overall, these findings confirm that triploid tambaqui maintains physiological functions and health status comparable to diploid individuals, supporting the view that triploidy is a safe and sustainable biotechnological approach to enhance the aquaculture production of this species without compromising animal welfare. Further studies under more physiologically demanding conditions are warranted to clarify this aspect.

Author Contributions

Conceptualization, F.L.A.O., A.C.A., P.V., and L.S.T.; Methodology, F.L.A.O., A.C.M., J.A.M.C., J.S.I.V., and L.S.T.; Validation, A.C.A., J.A.M.C, and J.S.I.V; Formal Analysis, A.C.A., J.A.M.C, and J.S.I.V; Investigation, A.C.A., J.A.M.C, and J.S.I.V; Resources, P.V., and L.S.T.; Data Curation, F.L.A.O., A.C.A., P.V.; Writing – A.C.A. and F.L.A.O.; Original Draft Preparation, A.C.A; Writing – Review and Editing, F.L.A.O., A.C.A., P.V.; Supervision,

F.L.A.O., P.V., and L.S.T.; Project Administration, F.L.A.O., P.V., and L.S.T.; Funding Acquisition, L.S.T.

Funding

This research was funded by EUROPEAN UNION'S HORIZON 2020 RESEARCH AND INNOVATION PROGRAMME, under grant agreement N° 818173. A.C.A. was funded by COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - BRASIL (CAPES) - Finance Code 018/2020 (PDPG).

Institutional Review Board Statement

Not applicable.

Declaration of competing interest

No potential conflict of interest was reported by author (s).

References

1. Marcos, R.; et al. Weight gain and morphometric growth of genetically improved tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Semina: Ciências Agrárias* **2016**, 37(4), 2521–2527. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n4Supl1p2521>.
2. Sousa, R.G.C.; Rocha, M.M.; Pontuschka, R.B.; Barreiros, H.T. Effects of mechanical aeration on tambaqui farming (*Colossoma macropomum*) in excavated tanks. *Acta Fish. Aquat. Res.* **2018**, 5(3), 113–119.
3. Brandão, F.R.; Gomes, L.C.; Chagas, E.C.; Araújo, L.D. Stocking density of tambaqui juveniles during second growth phase in cages. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2004**, 39(4), 357–362. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2004.v39.6781>.
4. Gomes, L.D.; Chagas, E.C.; Martins-Junior, H.; Roubach, R.; Ono, E.A.; Lourenço, J.N.P. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central Amazon floodplain lake. *Aquaculture* **2006**, 253(1–4), 374–384. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.012>.
5. Costa, J.; Freitas, R.; Gomes, A.L.; Carneiro, D.; Martins, M.I. Effect of stocking density on economic performance for *Colossoma macropomum* juveniles in earthen ponds. *Latin*

American Journal of Aquatic Research **2016**, 44(1). <https://doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-18>.

6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Produção Agropecuária: Tambaqui*. **2025**. Available online: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tambaqui/br>.
7. Benfey, T.J. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Reviews in Aquaculture* **2016**, 8(3), 264–282.
8. Berrill, I.K.; MacIntyre, C.M.; Noble, C.; Kankainen, M.; Turnbull, J.F. Bio-economic costs and benefits of using triploid rainbow trout in aquaculture: reduced mortality. *Aquaculture Economics & Management* **2012**, 16(4), 365–383.
9. Perera, D.A.; Geng, Y.; Huang, X.; Liu, W. Xenogenesis: production of channel catfish × blue catfish hybrid progeny using germ cell transplantation into triploid recipients. *North American Journal of Aquaculture* **2016**, 78(4), 339–347.
10. Teskeredzic, E.; Donaldson, E.M.; Teskeredzic, Z.; Solar, I.; McLean, E. Comparison of hydrostatic pressure and thermal shocks to induce triploidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* **1993**, 57, 57–64.
11. Christensen, K.A.; et al. Effect of triploidy on liver gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) under different metabolic states. *BMC Genomics* **2019**, 20, 5655. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5655-8>.
12. Linhart, O.; Haffray, P.; Ozouf-Costaz, C.; Flajshans, M.; Vandeputte, M. Comparison of methods for hatchery-scale triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.). *Journal of Applied Ichthyology* **2001**, 17, 247–255.
13. Huergo, G.P.C.M.; Zaniboni-Filho, E. Triploidy induction in jundiá (*Rhamdia quelen*) through hydrostatic pressure. *Journal of Applied Aquaculture* **2006**, 18, 45–57.
14. Fukushima, H.; Bailone, R.L.; Weiss, L.A.; Martins, M.L.; Zaniboni-Filho, E. Triploidia na hematologia de juvenis de jundiá (*Siluriformes: Heptapteridae*). *Brazilian Journal of Biology* **2012**.
15. Do Nascimento, N.F.; et al. Heat-induced triploids in *Brycon amazonicus*. *Zygote* **2021**, 29(5), 394–403. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000125>.
16. Sato, L.S.; et al. Triploidy in tambaqui (*Colossoma macropomum*) identified by chromosomes of fish larvae. *Journal of Aquaculture & Marine Biology* **2020**, 9, 65–69.
17. Silva Júnior, G.; et al. Triploidy induction in tambaqui using thermal shock: fertilization, survival and growth. *Journal of Applied Aquaculture* **2021**, 1–16.

18. Pereira, G.A.; et al. Cold, heat or double thermal shock in tambaqui: triploid induction and hematological variables. *Journal of Applied Aquaculture* **2022**, 1–11.
19. Amaral, A.C.; et al. Development of a pressure-induced triploidy protocol and its effects on growth performance and fertility in tambaqui. *Submitted*.
20. Docan, A.; Grecu, I.; Dediu, L. Use of hematological parameters as assessment tools in fish health status. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* **2018**, 24, 317–324.
21. Fazio, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture* **2019**, 500, 237–242.
22. Witeska, M.; Kondera, E.; Bojarski, B. Hematological and hematopoietic analysis in fish toxicology: a review. *Animals* **2023**, 13(16), 2625. <https://doi.org/10.3390/ani13162625>.
23. Marques, L.S.; et al. Urine, feces and blood contamination of frozen and fresh tambaqui sperm. *Cryobiology* **2021**, 102, 121–126.
24. Galo, J.M.; et al. Oocyte quality of tambaqui during the reproductive season. *Brazilian Journal of Biology* **2015**, 75, 279–284. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.11613>.
25. Hilsdorf, A.W.S.; et al. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*. *Reviews in Aquaculture* **2022**. <https://doi.org/10.1111/raq.12638>.
26. Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, T.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology* **1971**, 56, 35–39.
27. Drabkin, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. *American Journal of the Medical Sciences* **1948**, 215, 110. <https://doi.org/10.1097/00000441-194801000-00017>.
28. Collier, H.B. Haemoglobin: the standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal* **1944**, 50, 550–552.
29. Wintrobe, M. Variations in erythrocyte size and hemoglobin content in vertebrates. *Folia Haematologica* **1934**, 51, 3249.
30. Benfey, T.J. The physiology and behavior of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* **1999**, 7(1), 39–67. <https://doi.org/10.1080/10641269991319162>.
31. Ballarin, L.; et al. Haematological parameters in umbrine. *Aquaculture International* **2004**, 12(6), 459–468.
32. Rehulka, J.; Adamec, V.; Kouril, J. Effect of PCB on hematology of common carp. *Acta Veterinaria Brno* **2004**, 73(3), 301–309.
33. Small, C.D.; Benfey, T.J.; Crawford, B.D. Tissue-specific compensatory mechanisms... *Developmental Biology* **2024**, 509, 85–96.

34. Van de Pol, G.; Flik, W.C.E.P.; Verberk, J.W.C.E.P. Triploidy in zebrafish larvae. *PLoS One* **2020**, *15*(3), e0229468.
35. Small, C.; et al. Early, non-lethal ploidy and genome size quantification. *Journal of Experimental Zoology Part B* **2021**, *336*(6), 496–510.
36. Tiwary, B.K.; Kirubakaran, R.; Ray, A.K. The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **2004**, *14*(4), 391–402.
37. Hrubec, T.C.; Smith, S.A. Hematology of fishes. In: Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th ed.; Wiley-Blackwell: Ames, IA, **2010**; pp. 994–1003.
38. Ranzani-Paiva, M.J.T.; et al. *Métodos para análise hematológica em peixes*. Eduem: Maringá, **2013**.
39. Martins, M.L.; et al. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* **2008**, *68*(3), 657–661.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a elaboração de um protocolo eficiente de indução à triploidia em tambaqui (*Colossoma macropomum*) por meio de pressão hidrostática, este estudo baseou-se em três premissas fundamentais: i) identificar o momento ótimo para a aplicação do choque de pressão hidrostática após a fertilização dos ovos; ii) determinar a pressão ideal a ser aplicada nos ovos recém fertilizados; e iii) definir o tempo de duração da pressão de 8.000 psi. A pressão de 8000 psi foi estabelecida baseada no valor utilizado em outras espécies de peixes de aquicultura, como o salmão do Atlântico. Para tanto, dois experimentos bem estabelecidos e estruturados em quatro réplicas foram realizados, até que obtivemos valores satisfatórios não somente em porcentagem de indução à triploidia, mas também com valores de taxa de fertilidade e de sobrevivência embrionária (pré-eclosão) semelhantes ao grupo controle. O choque de pressão de 8000 psi, aplicado 95 segundos após a fertilização durante 90 segundos resultam em 100% de triploidização do tambaqui. Esse protocolo mostra-se mais eficiente e reprodutível do que os métodos de choque térmico empregados anteriormente, configurando uma abordagem prática e confiável para a produção de tambaquis triploides.

Embora a sobrevivência larval não tenha sido objeto de estudo desta tese, as análises de malformações foram realizadas e não revelaram diferenças entre os tratamentos, sendo a frequência desses eventos muito baixa, semelhante à observada no grupo controle. Entretanto, uma das principais vantagens obtidas com a triploidia em tambaqui, amplamente demonstrada nos presentes estudos, foi a esterilidade de machos e fêmeas, característica que representa um importante avanço para o manejo do tambaqui por reduzir o risco de contaminação genética de populações naturais e aprimorar o manejo de estoques cultivados. A esterilidade possibilita melhor direcionamento da energia metabólica para o crescimento somático, contribuindo para o aumento do desempenho produtivo e da eficiência zootécnica, e assegura os estoques genéticos superiores e/ou geneticamente editados. Além disso, mais recentemente, peixes estéreis têm sido utilizados como receptores de transplantes xenogênicos de células germinativas, principalmente de espécies ameaçadas ou de difícil reprodução. Um importante parâmetro na produção de peixes triploides é a confirmação assertiva da poliploidia. Em nosso trabalho utilizamos as principais técnicas hoje aplicadas para tal finalidade: a citometria de fluxo, que quantifica o conteúdo genético das células individualizadas, a medição do tamanho dos eritrócitos, geralmente maiores que nos indivíduos diploides, e a cariotipagem, que permite, de forma conclusiva, visualizar o número de cromossomos nesses animais. Essa abordagem múltipla foi fundamental para a confiabilidade dos nossos dados, além de validar a medição dos

eritrócitos, técnica simples e de baixo custo, como forma de confirmar futuros lotes de tambaqui triploide.

Dentre as principais características importantes em peixes triploides, o rendimento zootécnico se configura entre os principais, pois em geral são peixes com vantagens econômicas. Em se considerando o crescimento e ganho de peso do tambaqui triploide, em nosso primeiro estudo, realizado em tanques escavados até os seis meses de idade, houve vantagem absoluta, em comprimento corporal e peso total, do tambaqui triploide, em todos os meses, em comparação com o grupo controle. No segundo experimento, entretanto, devido à falta de instalações adequadas, os peixes foram mantidos em tanques circulares suspensos de vinilona, sob condições de manejo menos favoráveis. Nessas condições, não foi possível ajustar o arraçoamento à biomassa, e a alimentação foi realizada até a saciedade aparente, com interrupções nos finais de semana, resultando em falhas significativas no fornecimento de ração. Essa diferença nas condições de cultivo influenciou diretamente o desempenho zootécnico dos triploides, que apresentaram crescimento menos satisfatório. Esses resultados sugerem fortemente que o tambaqui triploide apresenta maior exigência nutricional e ambiental em relação aos diploides, necessitando de manejo mais otimizado para expressar plenamente seu potencial produtivo. Nas condições adequadas dos tanques escavados, contudo, os triploides demonstraram desempenho excelente, confirmando seu elevado potencial zootécnico.

Do ponto de vista fisiológico, a triploidia não provocou alterações adversas significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados, que pudessem comprometer a saúde ou a fisiologia desses peixes. Embora os indivíduos triploides tenham apresentado eritrócitos de maior tamanho, menor contagem celular e ligeira redução nos valores de hemoglobina e hematócrito, tais diferenças parecem refletir ajustes fisiológicos compensatórios, capazes de manter a eficiência do transporte de oxigênio e a estabilidade respiratória. De forma semelhante, a manutenção dos níveis de proteínas plasmáticas (total, globulina e albumina) e glicose evidencia que os triploides preservam a homeostase bioquímica, mesmo sob possíveis demandas metabólicas elevadas. Em síntese, os achados confirmam que o tambaqui triploide mantém funções fisiológicas e condição de saúde comparáveis às dos indivíduos diploides, reforçando que a triploidia constitui uma ferramenta biotecnológica segura, sustentável e promissora para o aprimoramento da produção aquícola dessa espécie. Em resumo, os achados desta tese reforçam o potencial da triploidia como estratégia biotecnológica relevante para o controle reprodutivo e o aumento da eficiência zootécnica do tambaqui. A triploidia representa um avanço significativo para a aquicultura do tambaqui, reunindo benefícios de manejo,

biossegurança e desempenho produtivo. Os indivíduos triploides apresentaram esterilidade completa, sem variações nos parâmetros hematológicos e fisiológicos avaliados, evidenciando que a condição triploide não resultou em efeitos adversos aparentes. Assim, todas as características observadas apontam para vantagens consistentes, com implicações diretas para o avanço sustentável da aquicultura nacional.