

SEXAGEM MOLECULAR EM SALMONÍDEOS E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE LOTES MONOSSEXOS

Ricardo Shohei Hattori

Biol., Dr., PqC do Programa Jovem Pesquisador da Fapesp /UPD de Campos do Jordão do Polo Regional Vale do Paraíba/APTA
hattori.fish@gmail.com

Yara Aiko Tabata

Med. Vet., Dr., PqC da UPD de Campos do Jordão do Polo Regional Vale do Paraíba/APTA
yara@apta.sp.gov.br

Neuza Sumico Takahashi

Biol., Dr., PqC do Instituto de Pesca/APTA
neuza@pesca.sp.gov.br

Introdução

Uma característica bastante explorada em cultivos de peixes de interesse comercial é o sexo fenotípico, uma vez que muitas espécies apresentam dimorfismo sexual em relação às taxas de crescimento, qualidade da carne, tamanho em que atingem a primeira maturação, entre outros. Isso faz com que a produção de lotes monossexuais seja mais vantajosa comercialmente comparada com a de lotes de sexos mistos.

Entre os salmonídeos, particularmente em truta arco-íris, a produção de lotes 100% fêmeas representa aproximadamente 90% do total produzido no mundo. Tais lotes são obtidos através de cruzamentos entre fêmeas normais XX e machos XX, sendo estes últimos

gerados a partir da masculinização de fêmeas XX via administração da 17- α -metilttestosterona, durante os estágios iniciais do desenvolvimento.

Uma das dificuldades neste procedimento consiste na distinção dos machos com genótipo XX e XY, ou seja, os que sofreram a reversão sexual em relação aos que não sofreram, respectivamente, uma vez que apresentam o mesmo fenótipo. O método mais comumente empregado seria o teste de progênie, que além de trabalhoso demanda maior tempo.

Porém, com a descoberta do gene mestre determinante do sexo *sdY* (*sexually dimorphic on the Y-chromosome*), primeiro na truta arco-íris (Yano et al., 2012) e posteriormente em outros 15 salmonídeos (Yano et al., 2013), tornou-se possível agilizar significativamente a genotipagem sexual neste grupo de peixes, uma vez que dispensa os testes de progênie.

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade dessa ferramenta molecular na sexagem genotípica dos estoques de salmonídeos cultivados na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Campos do Jordão o gene *sdY* foi examinado, na primeira etapa, nas seis linhagens de truta arco-íris e na variedade *landlocked* do salmão do Atlântico e, posteriormente, na produção pioneira de lotes 100% fêmeas de trutas de coloração azul.

Correlação entre a presença do gene *sdY* e o sexo fenotípico

A sexagem fenotípica foi feita através da observação direta da mandíbula prognata e da papila genital proeminente, características que são típicas de machos e de fêmeas, respectivamente, que completaram a maturação sexual.

As amostras de nadadeiras para sexagem genotípica foram obtidas a partir de exemplares adultos de três a quatro anos de idade no caso do salmão do Atlântico *landlocked* (*Salmo salar*) e de dois anos de idade no caso da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

As linhagens de truta arco-íris foram as seguintes: Albina recessiva, Albina dominante (antes denominada de Golden), Azul cobalto, Campos do Jordão, Shasta e Kamloops. Para as linhagens Shasta e Kamloops, foram coletadas amostras de 12 exemplares fêmeas, uma

vez que estas são compostas apenas de indivíduos geneticamente fêmeas (XX). Para as demais, foram coletadas amostras de exemplares de ambos os sexos (seis de cada sexo).

Os fragmentos de nadadeira caudal foram tratados para extração de DNA e amplificados por PCR usando os *primers* específicos para *sdY*: para truta arco-íris sdYE2S1 e sdYE2AS2; para salmão do Atlântico SSsdYS e SSsdYAS. Como controle positivo foi utilizado o gene ribossomal 18S (18SS e 18SAS). Os *primers* e as condições de amplificação utilizados são os mesmos descritos em Yano et al.(2013).

Todos os exemplares identificados fenotipicamente como fêmeas apresentaram resultados negativos para o gene *sdY*, inclusive os das linhagens Shasta e Kamloops, compostas somente por fêmeas genéticas (XX). No salmão do Atlântico e nas demais linhagens de truta arco-íris o gene *sdY* foi amplificado com sucesso em todos os exemplares machos analisados.

Sexagem molecular usando gene *sdY* na produção pioneira de lotes 100% fêmeas de trutas de coloração azul

Para avaliar a eficácia da sexagem com o gene *sdY* na produção de lotes monossexos femininos, 50 alevinos obtidos de acasalamento entre machos XY e fêmeas XX azuis foram submetidos a tratamento de masculinização com 17- α -metilttestosterona, na dose de 250 μ g/Kg de ração, a partir da fase de início da alimentação exógena até completarem 1000 UTAs (unidades térmicas acumuladas em graus centígrados dias).

Após o término do tratamento hormonal, 48 animais foram individualmente genotipados através da amplificação do gene *sdY*, utilizando amostras de tecido da nadadeira caudal, conforme a seção anterior. Os machos genotípicos XY (n= 27) foram descartados e as fêmeas genotípicas XX (n= 21) mantidas sob condições rotineiras de cultivo.

Após maturarem sexualmente, o sêmen de uma fêmea masculinizada (macho XX) foi coletado e usado para fertilizar ovócitos de uma fêmea normal (XX). Uma amostra da progênie (n=24 indivíduos) foi genotipada sexualmente através da amplificação do gene *sdY*.

Todos os indivíduos foram negativos para *sdY* certificando, portanto, que a progênie resultante era 100% constituída de fêmeas.

Considerações finais

Estes resultados demonstram que o gene *sdY* é funcional nas linhagens de sexo misto e que, portanto, pode ser utilizado como um eficiente marcador do sexo genotípico, assim como outros genes de determinação sexual descritos em peixes (Hattori et al., 2013). A geração de lotes 100% fêmeas da linhagem azul cobalto demonstra a eficácia do gene *sdY* como ferramenta molecular na agilização do processo de produção de lotes 100% fêmeas a partir de lotes de sexo misto. Estudos futuros serão conduzidos para geração de lotes monossexo femininos em outras linhagens de truta arco-íris e também no salmão do Atlântico *landlocked*.

Referências bibliográficas

HATTORI, R.S.; STRÜSSMANN, C.A.; FERNANDINO, J.I.; SOMOZA, G.M. Genotypic sex determination in teleosts: Insights from the testis-determining *amhy* gene. **General and Comparative Endocrinology**, v.192, p.55-59, 2013.

YANO, A.; GUYOMARD, R.; NICOL, B.; JOUANNO, E.; QUILLET, E.; KLOPP, C.; CABAU, C.; BOUCHEZ, O.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Current Biology**, v.22, p.1423-1428, 2012.

YANO, A.; NICOL, B.; JOUANNO, E.; QUILLET, E.; FOSTIER, A.; GUYOMARD, R.; GUIGUEN, Y. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. **Evolutionary Applications**, v.6, p.486-496, 2013.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao biólogo Túlio Teruo Yoshinagae a equipe de apoio à pesquisa da UPD de Campos do Jordão, Rosana Aparecida da Silva Lopes, Luiz Roberto da Silva e Antonio Donizete da Silva, pela manutenção dos animais e auxílio nas atividades de reprodução. Este projeto foi financiado pela FAPESP (Processo #2013/17612-9).