

**BOLETIM AGROPECUÁRIO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

**MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE**  
**POPULAÇÃO MONOSEXO NA**  
**PISCICULTURA**

Boletim Agropecuário - n.º 69 - p.1-27  
Lavras/MG

**GOVERNO DO BRASIL**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

**MINISTRO:** Fernando Haddad

**REITOR:** Antonio Nazareno Guimarães Mendes

**VICE-REITOR:** Ricardo Pereira Reis

**Diretoria Executiva:** Marco Antônio Rezende Alvarenga (Diretor), Nilton Nagib Jorge Chalfun e Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

**Conselho Editorial:** Marco Antônio Rezende Alvarenga (Presidente), Luiz Carlos de Oliveira Lima, Luiz Roberto Guimarães Guilherme, Renato Paiva, Cláudia Maria Ribeiro, Nilton Nagib Jorge Chalfun e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

**Consultoria Técnica:** Ana Tereza Mendonça Viveiros - DZO/UFLA - Lavras/MG e Priscila Vieira Rosa Logato - DZO/UFLA - Lavras/MG.

**Secretária:** Cláudia Alves Pereira Estevam

**Revisão de Bibliografia:** Márcio Barbosa de Assis

**Revisão de Português:** Amanda Jackeline Santos Silva

**Editoreção Eletrônica:** Luciana Carvalho Costa, Alézia C. Modesto Ribeiro, Christyane A. Caetano

**Impressão:** Gráfica/UFLA

**Marketing e Comercialização:** Maria Aparecida Torres Florentino



O “BOLETIM AGROPECUÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS” tem o propósito de publicar informes técnicos de interesse agropecuário.

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:**

EDITORA UFLA - Caixa Postal 3037 - 37200-000 - Lavras, MG.

Telefax: (35) 3829-1532 Fone: (35) 3829-1115

E-mail: editora@ufla.br

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>2 MODIFICAÇÃO NA EXPRESSÃO SEXUAL.....</b>	<b>6</b>
2.1 Quanto ao Sexo.....	8
2.2 Quanto à Determinação Sexual.....	8
<b>3 INVERSÃO SEXUAL.....</b>	<b>9</b>
3.1 Linhagens Invertidas Monosexo pela Técnica Hormonal.....	10
3.2 Supermachos.....	13
3.3 Superfêmeas.....	15
<b>4 PRODUÇÃO DE MONOSEXO POR MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA ...</b>	<b>15</b>
4.1 Poliploidia.....	17
4.1.1 Triplóides Puros e Híbridos.....	18
4.1.2 Tetraplóides.....	20
4.2 Haplóides.....	21
4.3 Ginogênese.....	21
4.3.1 Produção de Ginogênicos.....	22
4.4 Androgênese .....	24
4.4.1 Produção de Linhagens Androgênicas.....	24
4.4.2 Androgênicos e Supermachos.....	25
4.4.3 Androgênese e Conservação Genética.....	25
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>



# MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE POPULAÇÃO MONOSEXO NA PISCICULTURA

**Marcos Pinto Cesar<sup>1</sup>**  
**Luís David Solis Murgas<sup>2</sup>**  
**Rafael Venâncio de Araújo<sup>1</sup>**  
**Cristina Delarete Drummond<sup>2</sup>**

## 1. INTRODUÇÃO

A obtenção de lotes monosexo em peixes tem sido amplamente estudada, porém ainda pouco aplicada em cultivo comercial.

Inúmeras são as vantagens que se pode obter com a produção de lotes monosexo. Uma das vantagens obtidas no cultivo de peixes monosexo ocorre quando um dos sexos apresenta uma marcada superioridade na taxa de crescimento em relação ao outro. Contudo, dependendo da espécie, as técnicas de controle dos sexos podem trazer outros benefícios, tais como: supressão da reprodução, contenção de gastos energéticos com a atividade reprodutiva, uniformidade de tamanho na colheita, redução dos efeitos da maturação sexual na aparência e na qualidade da carne, bem como a diminuição dos riscos de impactos ambientais decorrentes do escape de peixes para os sistemas naturais (BEARDMORE et al., 2001).

Para a obtenção de um lote de peixes do mesmo sexo, novas técnicas de controle de sexualidade têm sido estudadas e aprimoradas com objetivo de aumentar o potencial produtivo de determinadas espécies, as quais também permitem obter benefícios que viabilizarão características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico.

No presente boletim são apresentadas e comentadas as principais biotecnologias genéticas, atualmente aplicadas na piscicultura, para obtenção de peixes monosexo. Inicialmente são abordadas as técnicas relacionadas à inversão sexual: neofêmeas, neomachos, supermachos e superfêmeas. Posteriormente, serão discutidas as técnicas de produção de peixes por manipulação cromossômica: poliploidia, triploidia, haploidia, tetraploidia, ginogênese e androgênese.

---

<sup>1</sup> Acadêmico do curso de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx.P.3037 – 37200-000 – Lavras/MG .

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras/UFLA.

A obtenção e realização dos métodos de produção de linhagens de peixes estéreis, monosexuais e com altos níveis de consangüinidade são unicamente métodos de manipulação cromossômica e hormonal, não tendo nenhuma ação de mutações.

## **2 MODIFICAÇÃO NA EXPRESSÃO SEXUAL**

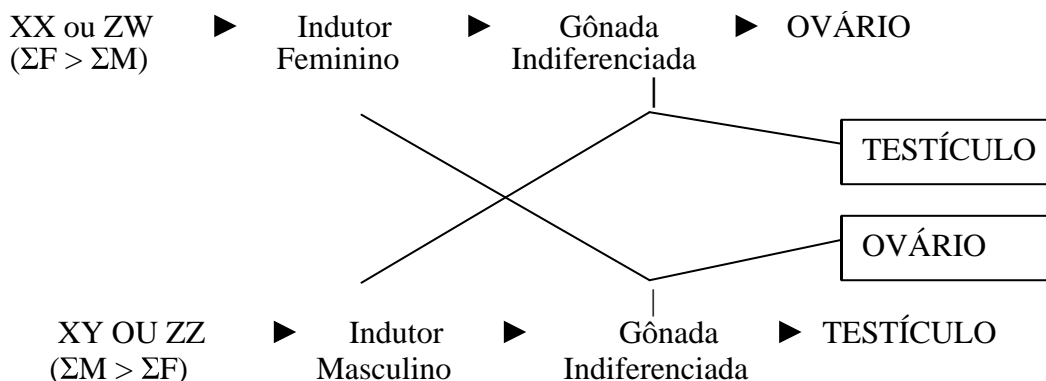
As características sexuais e o sexo gonadal em peixes podem ser modificados pelo tratamento das pós-larvas com hormônio por um período variável, iniciando na fase larval da maioria das espécies, quando as gônadas estão ainda em fase indiferenciada de organização (Figura 1).

A diferenciação sexual foi demonstrada inicialmente por Padoa (1937) em truta arco-íris, mas a importância do controle no processo de determinação de sexo nos peixes foi estabelecida com os estudos de Yamamoto (1953, 1955), investigando os mecanismos da determinação do sexo em peixes. Fatores determinantes da fisiologia e mecanismos envolvidos no processo de determinação do sexo em peixes, bem como o controle e a manipulação desta característica pelo tratamento com hormônios, tem sido intensivamente estudado nas três últimas décadas (DONALDSON & HUNTER, 1983; PANDIAN & SHEELA, 1995; PANDIAN et al., 1999; YAMAZAKI, 1983). As técnicas de modificação das características sexuais nas progênes de peixe por tratamento com hormônios, difundidas como “inversões de sexo”, são atualmente reconhecidas como uma metodologia de grande utilidade para a produção de populações monosexo, cuja importância para o desenvolvimento da aquicultura pode ser demonstrada por vários exemplos.

Em algumas espécies, machos e fêmeas apresentam diferentes taxas de crescimento que podem ser exploradas no processo de produção, com vistas à obtenção de maiores ganhos, tendo-se como exemplos:

- Em tilápias, os machos apresentam um crescimento mais rápido que as fêmeas, devido a diferenças fisiológicas específicas;
  - Nos Bagres do canal, os machos crescem em taxas de 10 a 30% mais rápido que as fêmeas da espécie;
  - Em salmonídeos, as fêmeas se desenvolvem e crescem mais rapidamente do que os machos.
-

**FIGURA 1** – Processo de formação de gônadas em peixes, ovários e testículos. Processo artificial de indução de modificações na estrutura das gônadas por tratamento hormonal. XX-XY, ZW-ZZ – mecanismo de determinação de sexo;  $\Sigma F$  – somatória dos fatores feminilizantes,  $\Sigma M$  – somatória dos fatores masculinizantes.



Fonte: Foresti & Foresti (2004).

O controle da proporção de sexo entre os peixes também pode ter aplicação no manejo do tamanho e do crescimento populacional nos tanques de criação. É reconhecido pelos criadores que, as tilápias constituem um grupo extremamente prolífero e que a manutenção de um número excessivo de indivíduos nos tanques pode tolher o desenvolvimento da população. Assim, nesta espécie, a criação de linhagens monosexo pode determinar a obtenção de boas taxas de crescimento.

Durante o período da maturidade sexual, alguns salmonídeos apresentam características específicas que determinam a deterioração da qualidade da carne, reduzindo drasticamente o preço do produto. Neste caso, a produção de populações monosexo femininas também tem se mostrado de grande aplicação, uma vez que estas apresentam maturação tardia, permitindo um melhor manejo do estoque, tornando a produção lucrativa (BYE & LINCOLN, 1986).

De modo inverso, na produção dos populares “peixes de briga” ornamentais (*Betta splendens*, Regan 1910), o interesse maior está na produção de linhagens monosexo machos, que são apreciados pela presença de nadadeiras de visual atrativo: ondulantes, bem desenvolvidas e em forma de véu (KAVUMPURATH & PANDIAN, 1992).

## 2.1 Quanto ao Sexo

Os peixes podem ser classificados como: Gonocóricos (quando os sexos ocorrem separadamente nos indivíduos); Hermafroditas (ambos os sexos estão presentes no mesmo indivíduo) e Unissexuados (espécies em que ocorre apenas o sexo feminino ou apenas o masculino). Em razão dessa ampla variação, machos e fêmeas poderiam ser melhores definidos, respectivamente, como produtores de sêmen e de ovos (YAMAMOTO, 1969).

Os gonocóricos são divididos em indiferenciados e diferenciados. Nos indiferenciados, a gônada primordial inicia o desenvolvimento assemelhando-se a um ovário, e depois uma parte dos indivíduos tornam-se machos e a outra parte torna-se fêmea. Nos diferenciados, a gônada diferencia-se em um testículo ou em um ovário.

O hermafroditismo é dividido em três tipos: sincrônico (onde os ovos e espermatozóides maturam ao mesmo tempo); protogínico (primeiro desenvolvem ovário e posteriormente reverterem para testículo); protandrômico (primeiro desenvolvem testículo e depois ovário).

Nos unissexuais, a reprodução natural é por ginogênese, onde o espermatozóide do macho de uma espécie bissexual contribui apenas para a ativação do desenvolvimento do ovo, sem ocorrência da singamia (YAMAZAKI, 1983).

## 2.2 Quanto à Determinação Sexual

O sexo genético ocorre na fertilização pela combinação dos cromossomos provenientes do ovo e do espermatozóide, sendo a determinação sexual definida como a soma dos genes responsáveis pela formação das gônadas e de suas características. Esses genes podem estar espalhados pelo genoma ou estando a maioria deles concentrados em um par de cromossomos que, neste caso, são chamados de cromossomos sexuais. As determinações sexuais podem ser do tipo: cromossômico, poligênico e interação genótipo-ambiente (PIFERRER, 2001).

A determinação cromossômica implica na presença de cromossomos sexuais, em que um par de cromossomos (denominados de heterocromossomos) acumula a maioria dos genes responsáveis pelo desenvolvimento sexual e, com base em análises citogenéticas, inversão sexual e cruzamentos controlados, oito sistemas cromossômicos já foram descritos. Estes sistemas variam desde sistemas simples

---



como XX/XZ ou WZ/ZZ, até os mais complexos, envolvendo mais que um par de cromossomos sexuais ou diferentes números de cromossomos, dependendo do sexo. Os peixes que possuem cromossomos iguais são chamados homogaméticos, e heterogaméticos quando são diferentes.

No sistema poligênico de determinação sexual, genes epistáticos determinantes do sexo estão presentes tanto nos cromossomos autossômicos como nos heterocromossomos, e o sexo do embrião será resultante da combinação dos fatores masculinos e femininos presentes no conjunto cromossômico herdado de cada parental (DONALDSON & HUNTER, 1983). Neste sistema, a proporção sexual macho:fêmea será diferente de 1:1.

O controle genético é um dos principais determinantes do sexo, mas fatores ambientais, tais como temperatura, fotoperíodo, salinidade e alta densidade de estocagem também possuem grande influência no processo.

### **3 INVERSÃO SEXUAL**

A manipulação de gametas, ovos e embriões podem ser realizadas com maior facilidade em peixes do que em outros animais, porque eles geralmente apresentam fecundação e desenvolvimento externos. Valendo-se disso, consegue-se controlar o sexo fisiológico dos peixes por meio da adição de hormônios esteróides anabolizantes na sua dieta ou na água em que vivem. A razão pela qual é possível controlar o sexo fisiológico dos peixes é que, enquanto o sexo genético é determinado por ocasião da fecundação, a determinação do sexo fisiológico que acontece pelo desenvolvimento das células germinativas primordiais determinantes do sexo, é mais tardia.

No início da embriogênese, um peixe não é nem macho nem fêmea porque não possui ovário, testículos ou outras características associadas aos sistemas reprodutores. Ao contrário, um embrião de peixe possui precursores embriológicos de ovários e testículos (células germinativas primordiais) e, nesse estágio, um embrião é “totipotente” podendo se desenvolver em macho ou fêmea. Em determinado momento durante o desenvolvimento embriológico (momento que é específico de cada espécie), um sinal químico originado de um gene ou de um conjunto de genes “informa” ao tecido totipotente em que direção se desenvolver. Uma vez que isso ocorra e o tecido pré-gonadal complete seu desenvolvimento, o peixe se torna fisiologicamente macho ou fêmea.

---

Após essa fase não é mais possível alterar o sexo fisiológico, exceto por técnicas radicais, tais como a cirurgia gonadal que tem mostrado pouco sucesso.

Neste pequeno espaço de tempo, que varia de espécie para espécie, durante o qual o sexo fisiológico pode ser alterado, se um peixe ingerir ou absorver esteróides anabolizantes, ele pode interferir diretamente no desenvolvimento das células totipotentes. Esta tecnologia tem sido muito pesquisada nas últimas décadas e vem sendo rotineiramente aplicada em programas de piscicultura envolvendo tilápias, salmonídeos e ciprinídeos.

O conhecimento dos mecanismos que determinam a expressão do sexo nos peixes é um pré-requisito fundamental para o desenvolvimento de estratégias efetivas na indução de alterações na proporção sexual em uma espécie.

Embora o sexo genótipo seja estabelecido no momento da fertilização do óvulo pelo espermatozóide, a diferenciação do sexo fenotípico ocorre em etapas mais avançadas do desenvolvimento, sendo após o período final de absorção do saco vitelínico e início da alimentação (período da transição entre a alimentação endógena e exógena). Esse período é variável de espécie para espécie, contados em Graus Celsius Dias. Isto é explicado devido os peixes serem pecilotérmicos, sendo que seu desenvolvimento está estreitamente relacionado com a temperatura da água, portanto as medidas são dadas em unidades térmicas acumuladas (UTA).

Deve-se lembrar que o tratamento com o hormônio apropriado, administrado em dosagem adequada durante a fase indiferenciada de desenvolvimento da gônada, é condição determinante do sucesso da inversão sexual. Atualmente, mais de trinta diferentes hormônios naturais e sintéticos têm sido usados por diferentes pesquisadores no estudo da inversão. O mais utilizado entre os andrógenos é a  $17\alpha$ -metil-testosterona, e entre os estrógenos é o  $17\beta$ -estradiol. A inversão do sexo nem sempre é 100% efetiva, sendo difícil até de ser conseguida em certas espécies. Dessa forma, o desenvolvimento de estoques com a totalidade de indivíduos pertencentes a apenas um dos sexos pode ser feito pela combinação destas técnicas com outras de cruzamento (MAIR et al., 1997).

### **3.1 Linhagens Invertidas Monosexo pela Técnica Hormonal**

A diferenciação sexual das gônadas é bem expressiva no estágio de desenvolvimento e a inversão sexual pode ser facilmente obtida por meio do fornecimento de estrógenos ou andrógenos na alimentação.

---

A produção de lotes de monosexo pela técnica hormonal pode ser obtida de 2 modos: o DIRETO em uma etapa, ou INDIRETO em duas etapas.

1) Linhagens produzidas em uma etapa – Altera-se o sexo fisiológico dos peixes. As larvas e alevinos devem ser alimentados com ração contendo andrógenos (hormônios masculinos) ou estrógeno (hormônios femininos), ou mantidos por certo tempo em água contendo concentrações diluídas desses mesmos hormônios.

O processo em uma única etapa é mais usado na produção de tilápias (Figura 2). Essa monosexagem de machos tem como finalidade impedir a reprodução precoce e descartar as fêmeas que crescem mais devagar que os machos. Com essa finalidade, larvas de Tilápia do Nilo são alimentadas com ração contendo 40 mg de 17  $\alpha$  - metiltestoterona / Kg de dieta durante um período de 40 dias. Essa dosagem usualmente reverte de 90 a 99% das larvas em machos, dependendo do manejo e das condições ambientais.

Na piscicultura de truta arco-íris, em que uma das finalidades é a monosexagem para fêmeas, as larvas indiferenciadas são alimentadas com ração contendo 20 mg de 17  $\beta$  -estradiol / Kg de dieta durante um período de 40 dias. Se acompanhado o manejo e a técnica corretamente obtêm-se normalmente 100% de fêmeas revertidas.

**FIGURA 2** – Esquema geral do protocolo para a produção direta de linhagens invertidas de machos ou fêmeas, em peixes com determinação do sexo tipo XX/XY.

#### ETAPA ÚNICA: Produção direta de linhagens revertidas

FASE DE VIDA	Larvas Indiferenciadas	
	⊥	
TIPO DE ESTERÓIDE	ANDRÓGENOS	ESTRÓGENOS
	↓	↓
SEXO FISIOLÓGICO	MACHOS	FÊMEAS
SEXO GENÉTICO	Machos Revertidos ou Neomachos (XX) Machos Normais (XY)	Fêmeas Revertidas ou Neofêmeas (XY) Fêmeas Normais (XX)

Fonte: Almeida-Toledo et al. (1996).

2) Linhagens produzidas em duas etapas para fêmeas - Utilizada na obtenção de matrizes capazes de produzir linhagens constituídas somente de fêmeas, possuindo sistemas de determinação do sexo do tipo XX/XY. Neste caso, são utilizados hormônios andrógenos para produzir neomachos XX, que são obtidos em duas etapas, assim como mostrado na Figura 3.

Não é possível separar os neomachos ou machos invertidos XX dos machos normais XY pelas suas características sexuais externas. Assim, uma 2ª etapa faz-se necessária para realizar um teste de progênie, identificando os machos revertidos dos normais para separá-los. Com esta finalidade, são feitos cruzamentos entre casais de fêmeas normais e machos tratados hormonalmente, em que cada família é criada separadamente até que a descendência possa ser sexada. Caso a descendência se mostre constituída por 50% de fêmeas e 50% de machos, o macho parental é do tipo XY e deve ser descartado. Se, por outro lado, a descendência for 100% fêmeas, então o macho parental testado é um neomacho tipo XX e deve ser mantido porque estes tipos de matrizes servirão para a produção de linhagens monosexo de fêmeas.

**FIGURA 3** – Esquema geral do protocolo para a produção de linhagens monosexuais de fêmeas em espécies de peixes com sistema de determinação do sexo tipo XX/XY.

---

**1. Etapa: Produção de linhagens de machos invertidos (XX)**

---

- Linhagens indiferenciadas → Andrógenos → Machos revertidos (XX) e Machos normais (XY)

---

**2. Etapa de Progênie para identificação dos machos revertidos (XX)**

---

- Fêmeas normais (XX) x Machos revertidos (XX) → 100% de fêmeas normais (XX)

- Fêmeas normais (XX) x Machos normais (XY) → 50% de machos normais (XY) +  
50% de fêmeas normais (XX)

---

**Guardar Linhagens de Machos Revertidos (XX)**

---

Fonte: Almeida-Toledo et al. (1996).

---

3) Linhagens produzidas em duas etapas para machos - Utilizada para se obter matrizes que sejam capazes de produzir linhagens monosexo de machos em espécies com sistema de determinação do sexo tipo ZW/ZZ. As larvas devem ser revertidas sexualmente com estrógeno. Assim, são produzidas linhagens de neofêmeas ZZ. O único modo de diferenciar as neofêmeas ZZ de fêmeas normais ZW é por meio do teste de progênie das fêmeas, em que as neofêmeas ZZ que produzem 100% de descendentes machos serão as matrizes que irão ser guardadas, pois são fêmeas capazes de produzir linhagens monosexo de machos.

### 3.2 Supermachos

É a reprodução realizada em peixes que apresentam sistemas de determinação do sexo tipo XX/XY. A obtenção de linhagens monosexo de machos é feita por meio da produção de matrizes de supermachos (machos que são YY em vez de XY).

Observando a Figura 4 nota-se que a obtenção de supermachos é um dos mais eficientes métodos de produção de machos. Em contrapartida, é um método demorado até a obtenção do reprodutor desejado.

**FIGURA 4** – Esquema geral do protocolo para a produção de supermachos em espécies de peixes com sistema de determinação do sexo tipo XX/XY.

---

#### 1. Etapa: Produção de linhagens de fêmeas revertidas

---

Larvas indiferenciadas → Estrógeno → Fêmeas normais XX + Fêmeas revertidas XY

---

#### 2. Etapa: Teste de progênie para identificar fêmeas revertidas

---

Fêmeas normais XX x Machos normais XY → 50% Fêmeas normais XX +  
50% Machos normais XY

Fêmeas revertidas XY x Machos normais XY → 25% Fêmeas normais XX +  
50% Machos normais XY +  
25% Supermachos YY

---

#### 3. Etapa: Teste de Progênie para identificar os Supermachos

---

Fêmeas normais XX x Supermachos YY → 100% Machos  
Fêmeas normais XX x Machos Normais XY → 50% Machos normais XY +  
50% Fêmeas normais XX

---

**Guardar as Linhagens de Supermachos YY**

---

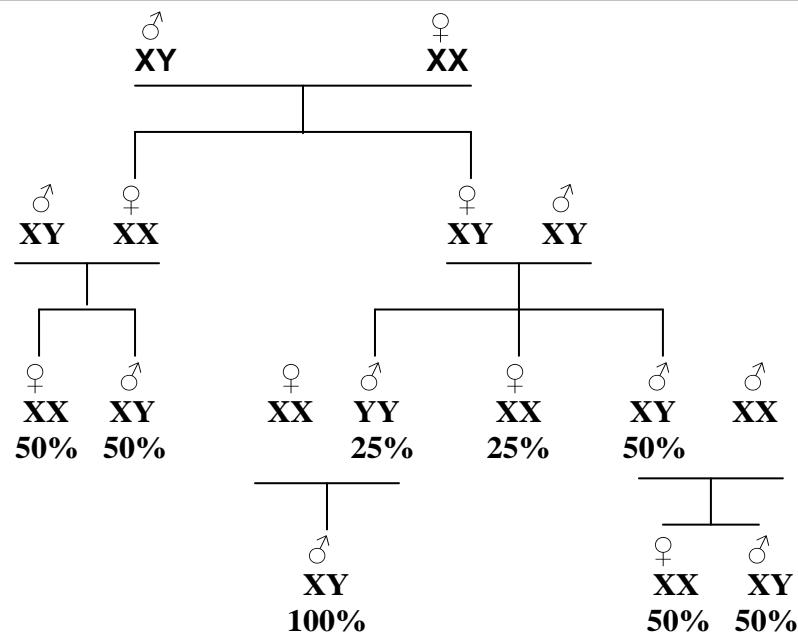
Fonte: Almeida-Toledo et al. (1996).

---

A obtenção de supermachos ocorre em 3 etapas:

A primeira etapa deste programa consta da alimentação das larvas sexualmente indiferenciadas com ração contendo estrógeno, com a finalidade de produzir neofêmeas ou fêmeas invertidas. Ao fazer a sexagem, verifica-se que os peixes tratados com hormônio se enquadram em três categorias: machos normais XY, fêmeas invertidas XY e fêmeas normais XX. Os machos e fêmeas normais devem ser descartados, mas é difícil separar as fêmeas normais XX das fêmeas invertidas XY examinando-se apenas as características sexuais externas. Então se faz a segunda etapa, em que consta da realização do teste de progênie, para identificação das fêmeas revertidas XY e descarte das fêmeas normais XX. Isto é feito pelo cruzamento de cada fêmea com um macho normal com cultivo de cada família em tanques individuais, até que a descendência possa ser sexada. As fêmeas que produzirem descendência constituída por 50% de fêmeas e 50% de machos, serão descartadas. As fêmeas que produzirem 75% de machos e 25% de fêmeas são neofêmeas XY. E dos 75% dos machos, 50% são machos XY e 25% são os machos de interesse YY. Nesse ponto, os 25% de fêmeas são descartadas e os 75% de machos (XY e YY) passarão por uma terceira etapa, como mostra o Figura 5.

**FIGURA 5**– Processo da formação de indivíduos Supermachos (YY), por meio de tratamento hormonal em uma primeira fase e cruzamentos dirigidos, na segunda.



Fonte: Foresti & Foresti (2004).

Não sendo possível separar machos normais XY e supermachos YY pelo exame das características sexuais externas, faz-se uma terceira etapa em que é realizado o teste de progênie para identificar os supermachos. Descartam-se as linhagens que produziram 50% machos e 50% fêmeas, mantendo as que produziram 100% de machos, em que se sabe que são supermachos.

Este método de produção de supermachos é utilizado em tilápias do Nilo, em que as matrizes de supermachos podem ser produzidas pela combinação das biotecnologias de inversão sexual e ginogênese, já que são espécies com sistema de determinação do sexo tipo XX/XY.

### **3.3 Superfêmeas**

As matrizes de superfêmeas (WW) possibilitam a produção de linhagens monosexo de fêmeas em espécies em que o sistema de determinação do sexo é do tipo ZW/ZZ.

Para sua obtenção, realizam-se três etapas, sendo as mesmas para obtenção dos supermachos, seguindo os mesmos procedimentos. Elas diferenciam-se apenas nos hormônios, pois onde eram feminilizantes agora são masculinizantes (andrógenos para inversão), e nas tipagens eram espécies do tipo XX/XY e agora são para espécies ZW/ZZ.

Os testes de progênie também são os mesmos, que agora são feitos para separação das superfêmeas que são machos invertidos ZW.

## **4 PRODUÇÃO DE MONOSEXO POR MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA**

Várias técnicas são descritas na literatura para produção de peixes haplóides, triplóides, tetraplóides ou mesmo os que possuem apenas cromossomos maternos (ginogênicos) ou paternos (androgênicos), como exemplificadas na Figura 6, em que estão acompanhadas de seus produtos e respectivas aplicações de cada técnica.

Há duas divisões categóricas nas tecnologias de alteração no número de cromossomos: Choques de Temperatura (ou térmicos) e Choques de Pressão (ou hiperbáricos).

---

**FIGURA 6** – Tipos de biotecnologias genéticas aplicadas à piscicultura.

<b>Tipo de Biotecnologia</b>	<b>Produtos Obtidos</b>	<b>Aplicações em Piscicultura</b>
TRIPLOIDIA PURA	Linhagens estéreis	Controle da reprodução, Linhagens com maior sobrevivência e crescimento
TRIPLOIDIA HÍBRIDA	Linhagens híbridas estéreis	Controle da reprodução, Linhagens com maior sobrevivência e crescimento e resistência a doenças
HAPLOIDIA	Linhagens haplóides	Produção de ginogenéticos e/ou Androgenéticos haplóides
GINOGÊNESE	Linhagens ginogenéticas	Produção de Linhagens monossexo de fêmeas para casos de determinação do sexo tipo XX/XY; Produção de linhagens altamente endocruzadas; Identificação de sistema de determinação do sexo
ANDROGÊNESE	Linhagens androgenéticas	Produção de supermachos; Produção de linhagens altamente endocruzadas; Criopresevação do germoplasma
INVERSÃO	Linhagens de neomachos e neofêmeas	Produção de linhagens invertidas; Produção de supermachos e superfêmeas; Identificação do sistema de determinação do sexo
DNA RECOMBINANTE	Linhagens transgênicas	Linhagens com características vantajosas codificadas pelo DNA transplantado

Fonte: Almeida-Toledo et al. (1996).

Choques de temperatura são aplicados aos ovos logo após a fertilização (cerca de 5 – 10 minutos), sendo chamados choques precoces. Já os choques de pressão são aplicados aos ovos decorridos tempos maiores após a fertilização (cerca de 60 – 90 minutos), sendo chamados choques tardios.

A finalidade do choque precoce é atuar na meiose, bloqueando a eliminação do segundo corpúsculo polar do ovócito. Já o choque tardio, é interferir no início da mitose, impedindo a primeira clivagem do zigoto que se tornaria um embrião com duas células.

Em algumas estações de piscicultura, utiliza-se o choque térmico e não o hiperbárico, pois a aparelhagem para manutenção de temperaturas constantes oferece maior segurança para os operadores, além de possibilitar o trabalho com volumes



maiores de ovos. Nos choques de pressão são usados cilindros hidráulicos de aço inoxidável, sendo bastante caros, comportando volumes reduzidos e operando por vários minutos em altas pressões que oscilam por volta de mil psi (psi = libra por polegada quadrada), ocorrendo muitas vezes riscos de rompimento.

Embora possam se utilizar tanto os choques térmicos quentes quanto os frios, os quentes produzem melhores resultados em espécies de águas frias e os frios em espécies de águas quentes. Deve-se lembrar que o tipo, a intensidade e a duração do tratamento térmico são peculiares para cada espécie.

Na verificação do sucesso da manipulação cromossômica, várias técnicas podem ser usadas:

- Em primeiro lugar, sendo o mais laborioso, é contar o número de cromossomos;
- Um segundo método é medir o tamanho dos núcleos dos eritrócitos, isto é, coram-se esfregaços de sangue com Giemsa e mede-se ao microscópio óptico o eixo maior do núcleo dos eritrócitos;
- Um terceiro método é a medição do volume nuclear do eritrócito, rotineiramente realizado nas pisciculturas norte-americanas produtoras de carpas capim triplóides com o auxílio do aparelho Coulter Counter Channelyzer, sendo caro porém bastante eficiente e rápido;
- Um quarto método consiste na determinação do conteúdo de DNA do núcleo dos eritrócitos por citofotometria de fluxo;
- Um quinto método é pela coloração de um esfregaço de sangue por nitrato de prata, em que é contado o número máximo de nucléolos existentes nos núcleos dos eritrócitos;
- Uma sexta técnica pode ser pela realização da eletroforese.

## **4.1 Poliploidia**

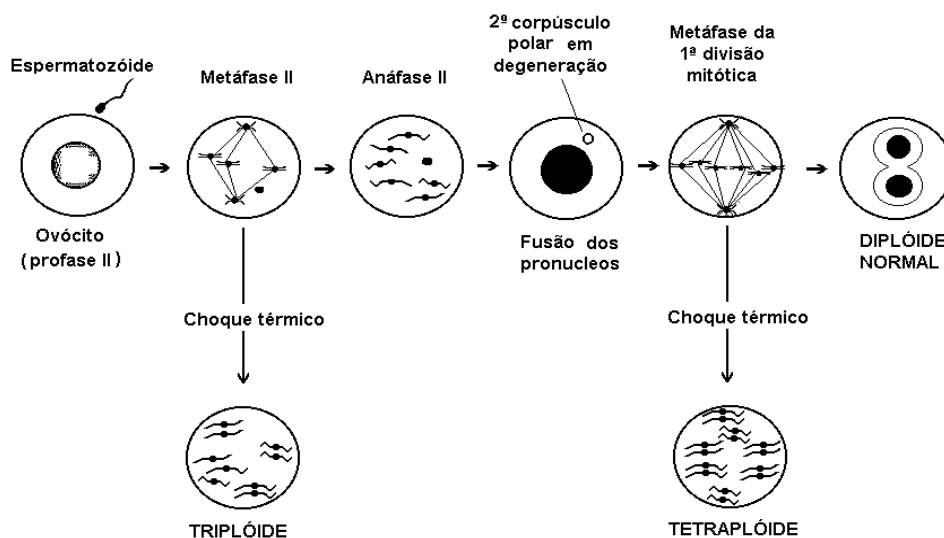
Com a manipulação do número de cromossomas do genoma consegue-se obter peixes poliplóides.

Fazendo-se a fertilização normal seguida da retenção do segundo corpúsculo polar nos ovócitos, obtêm-se óvulos triplóides (Figura 7) que apresentam três conjuntos cromossômicos, dois de origem materna e um de origem paterna. Os ovócitos triplóides são freqüentemente viáveis e de aparência normal.

---

Se for impedida a realização da primeira divisão de clivagem do embrião, tendo acúmulo dos conjuntos de cromossomos duplicados, serão originados indivíduos tetraplóides (Figura 7) com quatro conjuntos cromossômicos.

**FIGURA 7** – Processo de desenvolvimento e obtenção de peixes triplóides e tetraplóides, utilizando choques de temperatura ou pressão, para retenção do segundo corpúsculo polar, no caso da triploidia, ou no impedimento da realização da primeira divisão de clivagem do embrião, no caso da tetraploidia.



#### REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INDUÇÃO À POLIPLOIDIA

Fonte: Tabata et al. (2000).

#### 4.1.1 Triplóides Puros e Híbridos

As vantagens da produção dos triplóides são possuírem maior crescimento que os diplóides e serem estéreis (não se reproduzem, auxiliando no manejo). Ocorrem dois tipos de triploidia:

- Os **Triplóides Puros**, também chamados de autotriplóides e triplóides intraespecíficos, no qual são formados por três conjuntos haplóides de cromossomos provenientes de uma mesma espécie.

- Os **Triplóides Híbridos**, também designados como autotriplóides ou triplóides interespecíficos, no qual são formados por dois lotes haplóides de cromossomos de uma mesma espécie e por um outro lote de outra espécie.

### Produção

Os triploides são obtidos logo após a fertilização comum, quando os ovos são submetidos a choques térmicos (Tabela 1) (sabendo-se que por ocasião da desova, as fêmeas eliminam o que comumente se costuma chamar de “ovas ou óvulos”, mas na realidade são ovócitos secundários).

Estes “óvulos” eliminam o segundo corpúsculo polar somente após terem sido fertilizados. Porém, se um “óvulo” recém-fertilizado for submetido a um choque térmico, o segundo corpúsculo polar não será eliminado. Em consequência, o ovo resultante irá conter três núcleos haplóides: um que é o pró-núcleo do “óvulo”, outro é o pró-núcleo proveniente do espermatozóide, e o outro é o núcleo do segundo corpúsculo polar. Os três haplóides se fundem para formar um zigoto triploide que, por sua vez, produzirá um peixe triploide.

**TABELA 1** – Valores otimizados para indução de triploidia por choques térmicos em algumas espécies usadas na piscicultura brasileira.

<b>Espécie</b>	<b>Início do choque (minutos)</b>	<b>Temperatura do choque (°C)</b>	<b>Duração do choque (minutos)</b>	<b>Frequência de triploide (%)</b>	<b>Taxa de eclosão (%)</b>
Bagre africano	4	5	40	8 – 100	9 – 40
Bagre do canal	5	5	60	100	79
Carpa capim	4	42	1	67	72
Carpa comum	10	0 – 0,2	30	95	52
Tambaqui	2	39	3	12	82
Tilápia do Nilo	7	9	30	100	86
Truta arco-íris	25	26	20	100	87

Fonte: Cyrino et al. (2004).

### Otimização

A temperatura exata e a duração do choque térmico, que são necessárias para a produção de triploides, devem ser estabelecidas inicialmente por tentativa de erro, que é alguns graus mais frios ou mais quentes que a temperatura normal de cada espécie. O tempo exato em que o choque deve começar e terminar depende do tempo após a fertilização, no decorrer do qual o segundo corpúsculo polar é eliminado, devendo começar antes do evento da eliminação e continuar por tempo suficiente até que seja improvável a extrusão do segundo corpúsculo polar.

### Reconhecimento

Em relação à morfologia externa, os triplóides puros e os diplóides geralmente não possuem diferenças significativas. A nível celular é que se encontram as diferenças mais marcantes, pois o tamanho dos núcleos e das células dos triplóides é cerca de um terço maior que dos diplóides. A maneira mais fácil para identificar triplóides de peixes é através da medida dos eixos maiores dos eritrócitos em esfregaços de sangue corados por Giemsa.

Outros procedimentos para o reconhecimento são as seis técnicas já citadas, que verificam o sucesso da manipulação cromossômica.

### Interesse

Os triplóides têm despertado interesse na piscicultura por dois motivos: o de apresentar maior crescimento em peso e comprimento, e por serem estéreis. Sob aspecto teórico, espera-se que os triplóides sejam maiores que os diplóides, pois suas células contêm 33% a mais de informação genética.

#### **4.1.2 Tetraplóides**

Tetraplóides apresentam quatro conjuntos haplóides de cromossomos no lugar de dois lotes normais. Eles podem ser produzidos por choque hiperbárico tardio, que bloqueia a primeira divisão mitótica de um zigoto diplóide (Figura 8). Desse modo, foram produzidos em 1984 salmonídeos tetraplóides de primeira geração, em que mostraram taxas de eclosão variando de 5% a 80% e taxas de sobrevivência e crescimento bastante baixas (CHOURROUT, 1987; THORGAARD, 1992).

O interesse potencial dos tetraplóides em projetos de piscicultura, no qual é usado para a produção de triplóides interplóides estéreis, faz com que a técnica de produção elimine a necessidade de se produzir triplóides pelos métodos convencionais de choques térmicos precoces. Entretanto, os cruzamentos tanto de machos como fêmeas de linhagens tetraplóides com diplóides produzindo descendência chamada de triplóide interplóide, possuem taxas de fertilização reduzidas, pois os espermatozóides possuem dificuldade de penetração nas micrópilas dos óvulos que apresentam diâmetros não suficientes para a realização da fecundação.

Atualmente, a tecnologia de tetraploidia se encontra restrita apenas ao nível experimental, não tendo sido ainda incluída na rotina de projetos de piscicultura. Somente trabalhos futuros dirão sobre as reais possibilidades dos peixes tetraplóides na área aplicada.

---

## 4.2 Haplóides

São organismos que apresentam somente um lote de cromossomos. Como possui um único conjunto cromossômico, qualquer gene com efeito detrimental (deletério) irá se manifestar e, como tal, é pouco provável que a maioria dos haplóides sobreviva durante muito tempo. De fato, práticas laboratoriais comprovam a baixa sobrevivência destes peixes (CHOURROUT, 1987).

Uma das técnicas de produção dos haplóides consiste na fertilização dos “óvulos” com espermatozóides que tiveram seu material genético destruído (por raios X, raios gama, produtos químicos ou radiação UV). Esses espermatozóides permanecem móveis e aptos para fertilizarem e ativarem os “óvulos” que, uma vez ativados, iniciam o desenvolvimento embrionário (mesmo que o espermatozóide fecundante não mais transporte genes funcionais). O espermatozóide inativado, não contribui com seu material genético. Portanto, os alelos contidos no núcleo haplóide do “óvulo” são os únicos a fazerem parte do núcleo do “zigoto”. Os embriões assim produzidos são ginogenéticos haplóides, pois todo seu material genético é de proveniência materna.

Outro modo de produzir haplóide é destruindo o material genético dos “óvulos” com raios X ou raios Gama e fertilizá-los com espermatozóides normais. Como o gene haplóide do espermatozóide é o único que contribui para o genoma do zigoto, o embrião será haplóide. Neste caso, o embrião será androgenético haplóide, pois seu material genético é proveniente exclusivamente do parental paterno.

Portanto, sob o ponto de vista prático, é importante conhecer como produzir os haplóides, pois constituem o primeiro passo para a produção de peixes ginogenéticos e androgenéticos diplóides.

## 4.3 Ginogênese

Ginogênese ou herança materna completa, termo identificado pela própria raiz etimológica, é o “processo de trazer à existência um ser somente a partir da fêmea”. Na prática, em peixes e outros organismos é possível produzir uma descendência a partir de uma fêmea madura, sem que haja contribuição genética paterna (PURDON, 1993).

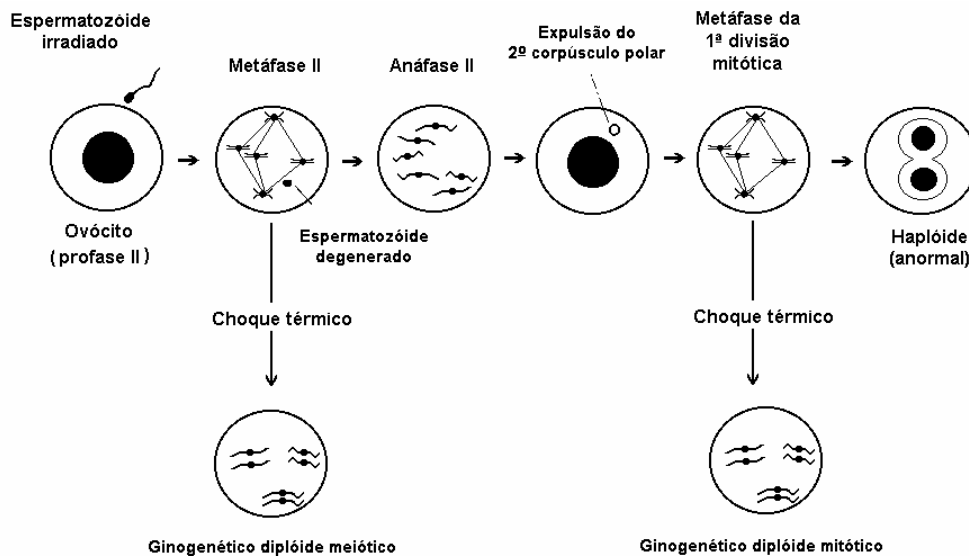
A técnica para produzir “óvulos” ginogenéticos (Figura 8) requer a inativação do genoma paterno e a diploidização do material genético da fêmea no zigoto, por

---

um processo induzido por agentes físicos ou químicos, no qual a determinação do sexo é do tipo XX/XY, em que fêmeas são homogaméticas (XX) e todos os ginogenéticos serão fêmeas.

Esse processo tem duas grandes aplicações potenciais em piscicultura: a primeira é no controle da proporção sexual pela produção de linhagens monosexo fêmeas, e a segunda é a rápida produção de linhagens altamente consangüíneas.

**FIGURA 8** – Processo natural de desenvolvimento em peixes e processos de obtenção de indivíduos ginogênicos, utilizando irradiação de espermatozoides e choques de temperatura ou pressão, para retenção do segundo corpúsculo polar.



**Representação Esquemática da Ginogênese**

Fonte: Tabata et al. (2000).

### 4.3.1 Produção de Ginogênicos

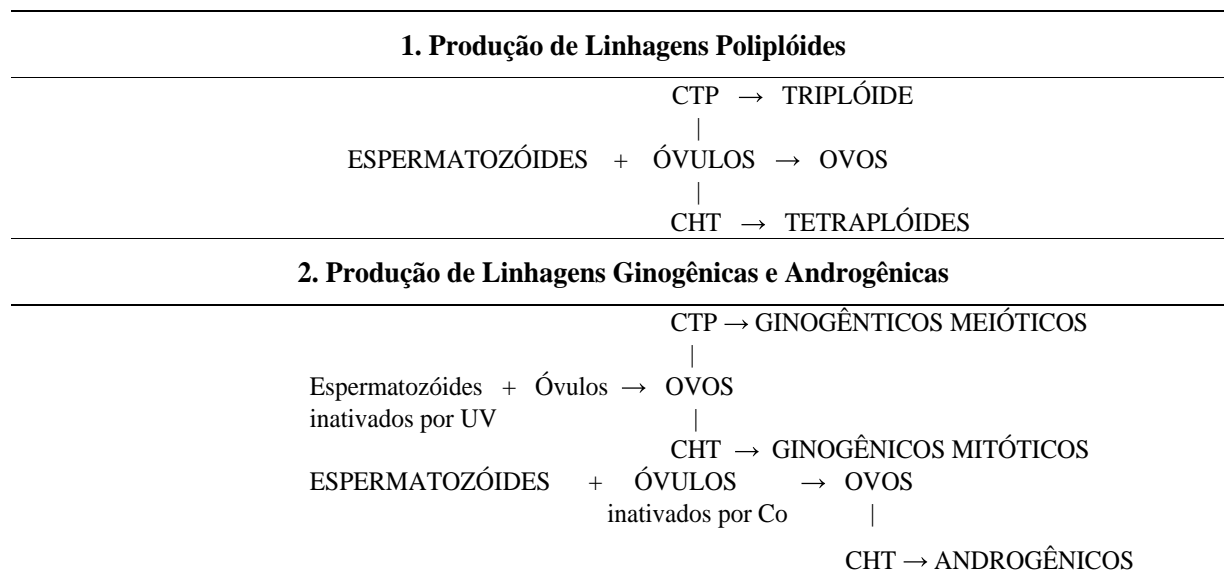
Há três técnicas de produzir linhagens ginogenéticas:

1ª – Ginogênicos meióticos – Essa primeira maneira é ativando os “óvulos” com espermatozoides que tiveram seu material genético destruído por raios X, raios Gama (em geral usando fonte de CO) ou radiação UV. A radiação gama é preferencial por obter maior poder de penetração, mas deixa fragmentos cromossômico na descendência. No entanto, utiliza-se mais a inativação dos espermatozoides por UV.

Inicialmente o espermatozoide é diluído de modo que possa ser espalhado numa camada bem fina em uma placa de vidro e exposto a uma fonte de UV de uma lâmpada germicida. Grande número de “óvulos” podem ser fertilizados quando colocados diretamente na placa de vidro na qual é feita a inativação dos espermatozoides. Normalmente, com exposições apropriadas à radiação UV, nenhum fragmento cromossômico paterno permanece nos espermatozoides. É importante lembrar que há a possibilidade de alguns dos peixes produzidos pelo método acima descrito ser diplóide normal, visto que espermatozoides não-inativados também podem fertilizar os “óvulos”. Para evitar esse tipo de ocorrência, alguns pesquisadores usam espermatozoides de outras espécies, por saberem que produzirão embriões híbridos não-viáveis.

Após a ativação dos “óvulos”, estes são submetidos a choques precoces para impedir a eliminação do segundo corpúsculo polar (Figura 8 e 9), em que os ovos assim produzidos conterão dois núcleos haplóides: o núcleo do “óvulo” e o núcleo do segundo corpúsculo polar. Estes dois núcleos irão se fundir formando um núcleo diplóide que contém os dois conjuntos de cromossomos originados do parental materno.

**FIGURA 9** – Esquemas gerais dos protocolos para produção de linhagens de peixes poliplóides, ginogênicos e androgênicos.



CTP = choque térmico precoce; CHT = choque hiperbárico tardio;

UV = fonte de ultravioleta; Co = fonte de cobalto

Fonte: Almeida-Toledo et al. (1996).

2<sup>a</sup> – Ginogênicos mitóticos – Essa segunda técnica para produzir peixes ginogênicos, se inicia do mesmo modo que os meióticos: Numa primeira etapa, os “óvulos” são ativados por espermatozóides que tiveram seu material genético destruído por radiação, produzindo assim ginogenéticos haplóides. Quando o zigoto haplóide inicia a primeira clivagem é dado um choque tardio que bloqueia a metáfase da primeira divisão mitótica. Desse modo, os dois núcleos haplóides fundem-se e formam um zigoto diplóide com dois lotes cromossômicos provenientes do parental materno.

Estes ginogênicos mitóticos produzidos pela supressão da primeira clivagem são homozigotos para todos os seus locos e apresentam 100% de consangüinidade, mas deve-se lembrar que apresentam baixas taxas de sobrevivência (em torno de 1,5%) devido à expressão dos genes deletérios recessivos, que poderão se apresentar em maior ou menor quantidade nessas linhagens.

3<sup>a</sup> – Consiste na fertilização do “óvulo” de fêmeas tetraplóides com espermatozóides, cujo DNA tenha sido inativado por radiação. Como as fêmeas tetraplóides produzem “óvulos” diplóides, não há necessidade dos “óvulos” serem submetidos a choques precoces para a produção do complemento cromossômico diplóide.

Embora esses tipos de ginogênicos sejam consangüíneos por definição, apresentam níveis consideravelmente maiores de heterose do que os ginogenéticos produzidos a partir de parentais maternos diplóides, pois é conhecido que esse tipo de ginogenético apresenta pouca redução nos níveis de heterozigose.

## **4.4 Androgênese**

A androgênese consiste na produção de linhagens que apresentam somente o genoma paterno, contrário a ginogênese que possuem somente o genoma materno.

### **4.4.1 Produção de Linhagens Androgênicas**

Linhagens androgênicas podem ser obtidas de duas técnicas, sendo que a mais aceita e usada é pela fecundação do “óvulo”, cujo material genético tenha sido destruído por raios X ou raios Gama com um espermatozóide normal; obtendo-se desse processo um androgenético haplóide.

---



Quando o zigoto androgenético haplóide sofre a primeira clivagem mitótica, é dado um choque hiperbárico tardio para impedir a divisão celular, em que os dois núcleos haplóides se fundirão para formar um núcleo diplóide. Todos os cromossomos do peixe androgenético provêm do parental paterno, e os peixes produzidos são altamente consangüíneos.

Como o complemento cromossômico diplóide provém de um único lote que se autoduplicou, os níveis de homozigose e de consangüinidade são da ordem de 100%, tendo essas linhagens taxas de sobrevivência ao redor de 5%, devido à expressão dos alelos serem recessivos deletérios.

Outra técnica consta na fertilização do “óvulo” que teve seu material genético destruído por radiação com espermatozóide de machos tetraplóides, pois os tetraplóides produzem espermatozóides diplóides, fazendo com que os zigotos resultantes sejam diplóides. Essa técnica teve sucesso em 1990 nos EUA em truta arco-íris androgenéticas (TABATA et al., 2000).

#### **4.4.2 Androgênicos e Supermachos**

Quando ocorre a sobrevivência dos androgenéticos até o período da primeira maturação sexual, eles são utilizados para a produção de supermachos (YY) nas espécies cujos sistemas de determinação do sexo sejam do tipo XX/XY. Neste caso, os machos são heterogaméticos fazendo com que metade dos androgenéticos produzidos seja supermachos.

#### **4.4.3 Androgênese e Conservação Genética**

Tratando-se da manutenção do germoplasma e conservação da espécie, os androgenéticos possuem um considerável potencial de interesse no qual, pela androgênese, consegue-se recuperar o material genético de espécies, cujas amostras de esperma tenham sido criopreservadas em bancos de germoplasma.

Portanto, como a preservação de “óvulos” de peixes ainda não é satisfatória, a única via prática para a estocagem e recuperação genética na área ictiológica é fertilizar “óvulos” recém-obtidos com esperma criopreservado, usando-se a androgênese.

---

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FOREST, S. A.; TOLEDO-FILHO, G. Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. **Caderno de Ictiogenética**, [S.l.], v. 1, p. 27, 1996.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 283-301, 2001.

BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 57, p. 299-309, 1986.

CHOURROUT, D. **Genetic manipulation in fish**: selectionh hybridization and genetic engineering in aquaculture. Berlin: Heenemann-Varlag, 1987. v. 11.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. 533 p.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. **Fish Physiology**, [S.l.], v. 9-B, p. 351-413, 1983.

FORESTI, F. P.; FORESTI, F. Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. cap. 7, p. 195-215.

KAVUMPURATH, S.; PADIAN, T. J. The development of all-male sterile triploid fighting fish (*Betta splendens* R) by integration hormonal sex-reversal of broodstock and chromosome-set manipulation. **The Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 44, p. 111-119, 1992.

MAIR, G. C.; ABUCAY, J. S.; BRESDMORE, J. A. Genetic manipulation of sex ratio for large-scale production of all-male tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Canadian Journal os Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v. 54, p. 396-404, 1997.

---

---

PADAO, E. Differenziazione e inversione sessuale (feminizzazione) di avanattidi trota (*Salmo irideus*) trattati con ormoni follocolari. **Monitore Zoológica Italiana**, Firenze, v. 48, p. 195-203, 1937.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 138, p. 1-22, 1995.

PANDIAN, T. J.; VENUGOPAL, T.; KOTEESWARAN, R. Problems and prospects of hormone, chromosome and gene manipulation in fish. **Current Science**, [S.l.], v. 79, p. 369-386, 1999.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 229-281, 2001.

PURDOM, C. E. **Genetic and fish breeding**. London: Chapman & Hall, 1993. v. 1.

TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; NAGATA, M. K. **Produção de fêmeas masculinizadas de truta arco-íris com ductos espermáticos funcionais**. Florianópolis: Aqüicultura Brasil, 2000. CD-ROM.

THORGAARD, G. H. Application of genetic technologies to rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, p. 85-97, 1992.

YAMAMOTO, T. Artificially induced sex-reversal in fenotypic males of the medaka (*Oryzias latipis*) with special reference to YY male. **Journal of Experimental Zoology**, [S.l.], v. 123, p. 571-594, 1953.

YAMAMOTO, T. Progeny of artificially induced sex reversals of male genotype (XY) in the medaka (*Oryzias latipis*) with special reference to YY-male. **Genetics**, [S.l.], v. 40, p. 406-419, 1955.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish physiology**. New York: Academic, 1969. v. 3, p. 58-117.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 33, p. 329-354, 1983.

---