

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

VANESSA RIBEIRO REIS

ESTUDOS MOLECULARES E AMBIENTAIS SOBRE O SISTEMA DE
DETERMINAÇÃO SEXUAL DE TAMBACUI *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

MANAUS

2023

VANESSA RIBEIRO REIS

**ESTUDOS MOLECULARES E AMBIENTAIS SOBRE O SISTEMA DE
DETERMINAÇÃO SEXUAL DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologias para a área agroflorestal

ORIENTADOR: DR. GILVAN FERREIRA DA SILVA

COORIENTADORA: DRA. FERNANDA LOUREIRO DE ALMEIDA O'SULLIVAN

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R375e Reis, Vanessa Ribeiro
Estudos moleculares e ambientais sobre o sistema de determinação sexual de tabaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) / Vanessa Ribeiro Reis . 2023
84 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gilvan Ferreira da Silva
Coorientadora: Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Determinação Sexual. 2. Tabaqui. 3. Temperatura. 4. Expressão Gênica. 5. Polimorfismo de Nucleotídeo Único, SNP. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*À mulher da minha vida, minha fortaleza
e porto-seguro, minha amada Mãe
Alda*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e sua infinita bondade;

Ao Dr. Gilvan Ferreira, pela orientação, ensinamentos, confiança, amizade, pelo exemplo de competência e ética, e principalmente por não desistir de mim;

A Dra. Fernanda O'Sullivan, pela orientação desde o mestrado até agora, por acreditar em mim, em meu trabalho, por ser meu modelo de competência e ética, e amor pelo que faz, por todo suporte, amparo, amizade que não me permitiram desistir;

Ao Dr. Adalberto Val e ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM/INPA pela disponibilidade de infraestrutura e apoio técnico e intelectual;

Ao Dr. Yann Guiguen e ao Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons - LPGP/INRAE pelas contribuições técnicas fundamentais para esse trabalho;

Aos meus pais e irmão, Olavo e Alda, Lucas, pelo amor incondicional, incentivo e apoio;

Aos amigos Rômulo e Carol pelas valiosas contribuições intelectuais para finalização desse trabalho;

As amigas Iraní e Ingride que sempre estão ao meu lado para o que der e vier;

À Universidade Federal do Amazonas, através PPGBiotec, pelos professores, funcionários e espaço físico para a minha formação;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À EMBRAPA-CPAA, pelos recursos e estrutura para a realização do trabalho;

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa-CPAA, e a sua equipe pelo suporte, sempre solícitos nesses anos de pesquisa;

A todos que fizeram e fazem parte do grupo Reprofish, pelo apoio nas coletas, análises e momentos de descontração;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

A aquicultura brasileira apresenta vários desafios tecnológicos a serem superados para alcançar alta produtividade no intuito de suprir a demanda crescente por proteína animal. Entretanto, atualmente seu maior obstáculo é adaptar-se aos conceitos de sustentabilidade, e isso implica em desenvolver processos e produtos inovadores aplicados ao aumento da produtividade deste setor sem comprometer o meio ambiente e a saúde humana. O desenvolvimento sexual é um processo complexo, de múltiplas etapas, que envolve a determinação, diferenciação e manutenção e funcionalidade do sexo do indivíduo, culminando na produção de espermatozoides ou óvulos férteis, hábeis à perpetuação da linhagem germinativa. Nesse sentido, muitas das tecnologias de vanguarda para a aquicultura dependem do conhecimento prévio de todos esses mecanismos. O tambaqui é a espécie nativa mais produzida no Brasil, em 2021 foi responsável por 16,9% da produção total de peixes cultivados. Apresenta dimorfismo sexual no crescimento em favor das fêmeas, indicativo do grande potencial para uso de populações monosexo. Nesse contexto, essa tese é apresentada em dois capítulos em formato de artigos. O primeiro capítulo traz os resultados de manipulação ambiental e análise de expressão gênica para examinar o efeito de diferentes temperaturas na proporção sexual e no perfil transcricional de genes envolvidos na determinação sexual em tambaqui, artigo publicado pelo *Aquaculture International Journal*. No segundo capítulo, na busca por gene(s) determinantes do sexo na espécie, foram obtidas leituras de genoma completo (whole genome sequence, WGS) de pools de gDNA machos e fêmeas, e mapeados 11.200 SNPs, identificadas duas regiões associadas ao sexo. Embora não tenhamos identificado gene(s) candidato(s) com a abordagem utilizada, apresentamos aqui regiões muito promissoras de estarem associadas ao sexo em tambaqui.

Palavras-chave: Determinação Sexual. Tambaqui. Temperatura. Expressão Gênica. Polimorfismo de Nucleotídeo Único, SNP.

ABSTRACT

The aquaculture industry in Brazil still presents several technological challenges to be overcome to achieve high productivity in order to supply the growing demand for animal protein. However, currently its biggest bottleneck is to adapt to the concepts of sustainability, and this implies developing innovative processes and products applied to increase productivity in this sector at the same time that preserves the natural environment and human health. Sexual development is a complex, multi-step process that involves the determination, differentiation and maintenance of sex, culminating in the production of fertile sperm or eggs for germline transmission. In this sense, the most promising techniques in aquaculture depend on the previous knowledge of all these mechanisms. Tambaqui is the most produced native species in fish farming in Brazil, in 2021 represented 16,9% of the total production of farmed fish. It presents sex dimorphic growth, indicating the great potential for the use of monosex populations in this species. In this context, the present thesis was divided into two chapters. The first chapter brings the results of environmental manipulation and gene expression analysis to examine the effect of different temperatures on the sex ratio and transcriptional profile of genes involved in sex determination in tambaqui. This manuscript is published by Aquaculture International. In the second chapter, aiming at identifying the sex master gene(s) of tambaqui, the whole genome sequence (WGS) readings of male and female gDNA pools were obtained, and 11,200 SNPs were mapped, and two sex-specific male tambaqui genomic regions were identified. We were not able to identify a candidate gene with this approach; however, we present regions that are very promising to host the sex region of tambaqui.

Keywords: Sex Determination. Tambaqui. Temperature. Gene expression. Single Nucleotide Polymorphism, SNP.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Imagens ilustrativas e de espécimes de *Colossoma macropomum*.....15

CAPÍTULO I

Fig. 1 Body standard length (a) and relative expression of vasa (b) of tambaqui *Colossoma macropomum* reared in different water temperatures during the phase of early gonad development. Dotted line points the beginning of sex differentiation in tambaqui. Results are shown as mean \pm SD (n = 6/group). Different letters indicate different mean values of the same group at different ages.....41

Fig. 2 Expression patterns of *amh*, *foxl2*, *wt1b*, and *ar* during growth and early gonadal development of tambaqui *Colossoma macropomum*. Results are presented as mean \pm SD (n = 6).....42

Fig. 3 Section (5 μ m) of *Colossoma macropomum* gonads. a and b) immature ovary; c) immature testis; d) testis in initial maturation; Black asterisk shows nest of oogonia. White asterisk shows spermatozoa. CT: connective tissue; GE: germinal epithelium; PFC: prefollicular cell; Oo: ovogonia; PvO: pre-vitellogenic oocytes; FC: follicular cell; Aund: type A undifferentiated spermatogonia; Adiff: type A differentiated spermatogonia; SC: Sertoli cell; Sc: spermatocyte; St: spermatid. The scale bar represents 25 μ m.....43

CAPÍTULO II

FIGURA 1 Gráficos Manhattan de SNPs-específicos de macho (A) e fêmea (B) e cobertura relativa (cobertura pool machos/ cobertura pool fêmeas) (C). Dados contabilizados através de janelas de 50 kb, com output a cada 1 kb, ao longo dos 27 LG do genoma de *C. macropomum*. Picos acima da linha vermelha são considerados significativos.....58

FIGURA 2 Regiões de interesse com picos significativos de SNPs nas fêmeas, LG6 (a) e LG9 (b). Alinhamento das reads de fêmeas (superior) e machos (inferior). Barras coloridas representam SNPs. Programa Integrative Genomics Viewer (IGV).....61

FIGURA 3 Regiões de interesse com picos significativos de SNPs nos machos, LG1 (a), LG15 (b) e unplaced scaffold NW_023495123.1 (c). Alinhamento das reads de fêmeas (superior) e machos (inferior). Barras coloridas representam SNPs. Programa Integrative Genomics Viewer (IGV).....62

FIGURA 4 Região específica das reads Illumina com cobertura mediana em machos, e nenhuma/pouquíssima reads nas fêmeas, LG2 (a) e LG23 (b). Alinhamento das reads de fêmeas (superior) e machos (inferior). Barras coloridas representam SNPs. Programa Integrative Genomics Viewer (IGV).....63

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Modelos de sistemas de determinação sexual em peixes.....19

Tabela 2. Abordagens transcriptômicas e genômicas para estudos de desenvolvimento sexual em peixes.....25

CAPÍTULO I

Table 1 Primers used for RT-qPCR.....40

Table 2 Physical-chemical parameters of water during the temperature experimente..41

Table 3 Sex ratio of tambaqui *Colossoma macropomum* in the experimente.....43

CAPÍTULO II

TABELA 1 Métodos de sexagem e origem das amostras de *C. macropomum*.....55

TABELA 2 Dados da análise de pool-seq de machos e fêmeas de tambaqui.....60

TABELA 3 Identidade e descrição dos genes encontrados na janela de 1 Mb a jusante e a montante da região no LG2 com maior cobertura em machos.....63

TABELA 4 Identidade e descrição dos genes encontrados na janela de 1 Mb a jusante e a montante da região do LG23 com maior cobertura em machos.....64

TABELA S1. Correspondência dos picos mais relevantes nos gráficos de Manhattan (Figura 1) entre o ID dos LGs em nível cromossômico (Ariede et al., 2022) e o ID do scaffold de genoma de referência (Hilsdorf et al., 2021).....73

TABELA S2. LGs do mapa de ligação de Varela et al. (2021) e o mapa de ligação de Ariede et al. (2022)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REFERENCIAL TEÓRICO	15
O tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>	15
Desenvolvimento sexual em Teleósteos	16
Determinação sexual em Teleósteos.....	17
Diferenciação sexual.....	21
Estudos sobre o desenvolvimento sexual em peixes	21
Genômica.....	22
Trasncriptômica	23
Proteômica	24
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO I	35
EFFECT OF TEMPERATURE ON THE EARLY SEXUAL DEVELOPMENT OF TAMBAQUI <i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i>	36
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	37
MATERIALS AND METHODS	38
Ethics statement	38
Animals, experimental conditions and sampling	38
RNA extraction and cDNA preparation	39
Quantitative PCR	39
Statistical analysis	40
RESULTS	40
Experimental conditions	40
Fish growth and gene expression in early gonadal development	41

Survival, sex ratio and gonad morphology	43
DISCUSSION.....	44
REFERENCES	47
CAPÍTULO II.....	51
IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE SNPS ASSOCIADOS AO SEXO EM TAMBAQUI <i>Collossoma macropomum</i>	52
RESUMO.....	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	54
Amostragem de peixes.....	54
Extração de DNA genômico.....	55
Sequenciamento do genoma completo de pool (Pool-seq).....	56
Identificação de regiões ligadas ao sexo.....	56
RESULTADOS	57
Sequenciamento de pool do genoma completo (Pool-seq).....	57
Identificação de regiões ligadas ao sexo.....	57
DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	68
CONCLUSÃO.....	83

INTRODUÇÃO

Existem mais de 30.000 habitando uma ampla variedade de ambientes aquáticos em todo o mundo (NELSON et al., 2016), fornecendo uma rica fonte de material para estudos acadêmicos e aplicados em todos os campos de conhecimento. A necessidade de compreender como o sexo é definido e conduzido desde o desenvolvimento inicial da gônada até ovários e testículos funcionais nas espécies de peixes aumentou nos últimos anos, principalmente devido à crescente importância do controle do sexo na aquicultura e à avaliação dos possíveis efeitos das mudanças climáticas na razão sexual entre machos e fêmeas em populações selvagens (CURZON et al., 2023; FERNANDINO e HATTORI, 2019).

A via de determinação do sexo pode ser vista como uma série complexa de processos bioquímicos interativos que, em última análise, levam à determinação e diferenciação das células sexuais (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002). Diferentemente de mamíferos, os peixes exibem uma diversidade surpreendente de sistemas de determinação do sexo, variando de um rigoroso controle genético (*genetic sex determination*, GSD) para um controle ambiental (*environmental sex determination*, ESD) ou a ação conjunta de ambos, como por exemplo fatores genéticos sendo amplamente influenciados pela temperatura (*thermal effects on GSD*, GSD+TE) (FERNANDINO e HATTORI, 2019). A diferenciação sexual é o desenvolvimento morfológico de uma gônada indiferenciada e sua transformação em testículo ou ovário. Isto produz o sexo fenotípico numa base individual e a proporção entre os sexos numa base populacional (PIFERRER, 2011). Esse processo tem origem a partir da crista gonadal, e é comum que ocorra primeiro nas fêmeas com a entrada da oogônia em meiose e/ou a proliferação de células somáticas para formar a cavidade ovariana; já nos machos é um processo mais tardio e caracterizado pelo aparecimento do arranjo das espermatogônias e células somáticas em cistos (LAWRENCE, 2013).

Nas espécies que atingiram altos níveis de produção em larga escala, a manipulação da reprodução e das proporções sexuais foram características importantes para a otimização da produtividade (WANG et al., 2019). Todos os avanços em conhecimento e tecnologia foram conquistados por pesquisas intensivas que combinam manipulação ambiental/endócrina, abordagens citogenéticas, transcriptômicas e genômicas para desvendar os mecanismos e eventos-chave no desenvolvimento de testículos ou ovário, a determinação e a diferenciação sexual (CHEN et al., 2022; CURZON et al., 2023; DEVIM e NAGAHAMA, 2002; GUIGUEN et al., 2018).

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818) é a maior espécie nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco da América do Sul (HILSDORF et al., 2022). É um peixe onívoro/frugívoro, migrador e que pode atingir 1,0 m de comprimento total e mais de 30 kg (SANTOS et al., 2009). Foi a primeira espécie de peixe nativo amazônico que atraiu um número relativamente grande de pesquisadores (ecólogos, biólogos, fisiologistas) e piscicultores (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1988). O tambaqui é provavelmente a espécie de aquicultura nativa da América do Sul mais estudada, porém é fundamental refletir sobre o quanto essas pesquisas conseguindo aplicar esses estudos na produção resultaram em técnicas práticas para melhorar o cultivo desta espécie (HILSDORF et al., 2022). Mesmo sendo produzido com padrões básicos de cultivo, atualmente é a espécie nativa com maior destaque na aquicultura nacional (IBGE, 2022). Em revisões recentes sobre os avanços no conhecimento sobre o tambaqui, foi alertada a necessidade urgente de pesquisas que busquem otimizar os sistemas de reprodução e promover a compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos para melhorar a produção e para lidar com as mudanças ambientais (HILSDORF et al., 2022; VAL e OLIVEIRA, 2021).

O tambaqui apresenta dimorfismo sexual em favor das fêmeas, elas são de 16% a 50% mais pesadas que os machos no momento de abate, dependendo da região e sistema de produção apontando uma vantagem econômica de lotes monossexo (ALMEIDA et al., 2016; ARIEDE et al., 2023). Esse fato, aliado à sua importância ecológica frente às mudanças climáticas, fomentaram estudos para o início da compreensão da determinação e diferenciação sexual da espécie. Seus cromossomos são homomórficos e indistinguíveis por análises citológicas (HASHIMOTO et al., 2014; NAKAYAMA et al., 2012). O sequenciamento de bibliotecas transcriptômicas (RNAseq) de juvenis sexualmente indiferenciados mostrou que componentes da via Wnt/ β -catenina direcionam o desenvolvimento das fêmeas, enquanto vias antagônicas e genes para síntese de andrógenos indicam diferenciação de machos (LOBO et al., 2020). O sequenciamento do genoma completo de tambaqui (HILSDORF et al., 2021) impulsionou os mais novos insights sobre características genômicas únicas da espécie. Um mapa de ligação de alta densidade apresentou no LG 26 um QTL fortemente associado ao sexo, e ainda propiciou um grande avanço, a identificação e validação de marcadores sexuais (VARELA et al., 2021). Outro mapa de ligação apontou mais regiões do genoma, LGs 12 e 27, que parecem ter viés sexual e que merecem mais estudos (ARIEDE et al., 2022)

Nesse contexto, a presente tese objetivou analisar a influência da temperatura na determinação sexual, e identificar e caracterizar regiões sexo-específicas em tambaqui. A

tese é composta por dois capítulos em forma de artigos. O Capítulo I traz a combinação de manipulação ambiental e análise de expressão gênica para examinar o efeito de diferentes temperaturas na proporção sexual e no perfil transcricional de genes envolvidos da determinação sexual em tabaqui. No Capítulo II apresentamos os resultados obtidos com o sequenciamento do genoma de pools masculino e feminino em pool-sex, mapeamento de 11.200 SNPs e identificação de duas promissoras regiões genômicas associadas ao sexo.

REFERENCIAL TEÓRICO

O tambaqui *Colossoma macropomum*

Esta espécie foi descrita por George Cuvier em 1818, atualmente pertence a ordem Characiformes, família Serrasalminidae (BUCKUP et al., 2007; HILSDORF et al., 2022). Durante o seu desenvolvimento até chegar à idade adulta, o tambaqui passa por grandes mudanças principalmente na sua morfologia externa e coloração (FIGURA 1). Seu nome científico tem origem no latim, “colossoma” que significa corpo sem chifres, isso porque ele não possui o espinho pré-dorsal, que é muito comum na maioria dos membros da subfamília dos pacus a qual já foi incluído no passado; e “macropomum” significa opérculo grande (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998).

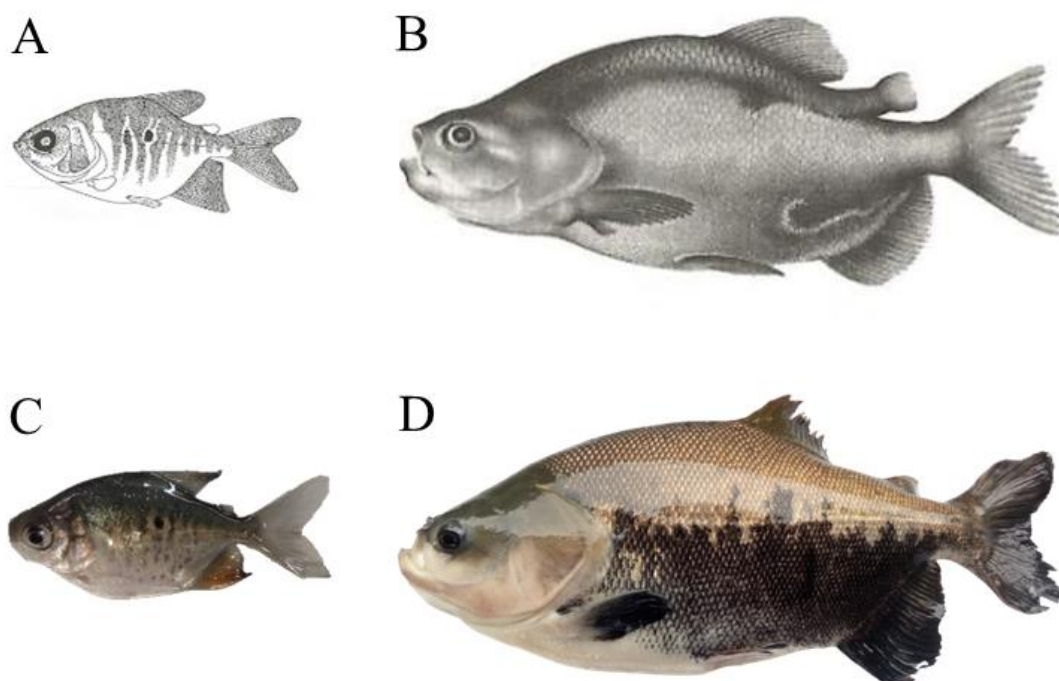


Figura 1 - Imagens ilustrativas e de espécimes de *Colossoma macropomum*. **A**: ilustração de juvenil com 43 mm de comprimento; **B**: primeira ilustração conhecida do tambaqui por Ferreira em 1962; **C**: juvenil de tambaqui com 43 mm de comprimento padrão; **D**: tambaqui com ~27,5 cm de comprimento padrão. **A** e **B** fonte: ARAÚJO-LIMA e GOULDING (1998); **C** e **D** fonte: a autora (2018).

É endêmico das bacias dos rios Solimões/Amazonas e Orinoco e seus afluentes, podendo atingir até 30 kg e 1 m de comprimento (AMANAJÁS e VAL, 2022; ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1988; HILSDORF et al., 2022). Nos lagos, os adultos e jovens são

capturados na água aberta e na floresta alagada e os alevinos, na vegetação aquática. Esta espécie é encontrada livremente na coluna d'água, sendo considerada uma espécie pelágica e abundante nos lagos e rios de águas brancas, claras e pretas (SAINT-PAUL et al., 2000).

É uma espécie de hábito diurno, migradora, com desova total, fecundação externa, que não possui cuidados parentais. Na natureza, as fêmeas iniciam o processo de maturação sexual entre 55 e 61 cm, com idade média entre 3,5 e 5 anos. Machos sexualmente maduros já foram encontrados com o comprimento variando entre 62 e 95 cm. O período reprodutivo desta espécie vai de setembro a fevereiro, com desovas concentradas entre os meses de setembro/outubro até janeiro/fevereiro. Na vazante, os cardumes se organizam para desovar em áreas de pausadas e/ou vegetação marginal nos rios de águas brancas e a reprodução ocorre na enchente (VIEIRA et al., 1999; VILLACORTA-CORREA e SAINT-PAUL, 1999).

O tambaqui é dentre as espécies nativas uma das que possui maior valor comercial na Região Amazônica e por isso foi e é muito explorado pela pesca desde o século XIX. Para suprir a demanda desta espécie, intensos esforços também têm sido investidos para o seu cultivo em cativeiro (MORAIS e O'SULLIVAN, 2017; SANTOS e FERREIRA e ZUANON, 2009). Os dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística estimam que a produção de tambaqui apresentou queda de 5,9%, entretanto, continuou sendo a segunda espécie mais produzida no país com 94,6 mil toneladas que corresponderam a 16,9% do total da piscicultura em 2021 (IBGE, 2022). Em 2022 o faturamento das exportações da piscicultura brasileira registrou aumento de 15%, totalizando U\$S 23,8 milhões, e apesar de uma queda de 51% o tambaqui continuou sendo a espécie nativa mais exportada (PEIXE BR, 2023).

Atualmente muito se tem investido no aperfeiçoamento das técnicas de cultivo, com o objetivo de melhorar o desempenho produtivo e econômico na sua criação. Apesar de tantos esforços, nossos sistemas de produção de peixes em cativeiro ainda estão muito aquém em comparação a países mais desenvolvidos e em relação às outras espécies, principalmente mamíferas (suína, bovina, caprina e ovina) e aves. Pesquisas que fomentem o desenvolvimento e inovação de tecnologias de produção de peixes em cativeiro são necessárias e urgentes no Brasil.

Desenvolvimento sexual em Teleósteos

Os principais eventos fisiológicos responsáveis pela formação das gônadas em peixes são a determinação sexual e a diferenciação gonadal, ambos inseparáveis da pesquisa em reprodução animal (CHEN et al., 2022). Mais de 50 anos se passaram desde a publicação da revisão *Sex differentiation* no livro *Fish Physiology* volume I (YAMAMOTO, 1969). Nessa revisão, Yamamoto (1969) reuniu informações importantes sobre esses eventos, podendo ser descrito como um marco para o início dos estudos sobre determinação sexual (DS) e a diferenciação gonadal. Desde então, uma infinidade de estudos sobre a determinação e/ou diferenciação sexual de várias espécies de peixes foi conduzida a fim de desvendar os mecanismos que influenciam esses eventos.

Os estudos para espécies nativas como o pirarucu *Arapaima gigas* e tambaqui *Colossoma macropomum* tiveram grandes avanços nos últimos anos (ADOLFI et al., 2021; HILSDORF et al., 2021; LOBO et al., 2020; MORAIS et al., 2020; VARELA et al., 2021). Entretanto, muito ainda se tem a desvendar sobre os eventos chave no desenvolvimento sexual dessas espécies, e ainda de outras com grande potencial na aquicultura como matrinxã *Brycon amazonicus*, pintado *Pseudoplatystoma corruscans*, surubim *Pseudoplatystoma fasciatus*.

Determinação sexual em Teleósteos

Os mecanismos de determinação sexual produzem a razão entre os sexos, um parâmetro demográfico fundamental para a viabilidade da população (OSPINA-ÁLVAREZ e PIFERRER, 2008). Os peixes teleósteos exibem uma diversidade surpreendente de sistemas, variando de um rigoroso controle genético (*genetic sex determination*, GSD) para um controle ambiental (*environmental sex determination*, ESD) ou a ação conjunta de ambos (Tabela 1) (BAROILLER et al., 2009; CHEN et al., 2022; HEULE et al., 2014; NAGAHAMA et al., 2021).

O sistema GSD pode ser cromossômico (monofatorial) ou poligênico (polifatorial) envolvendo vários genes ou múltiplos cromossomos (NAGAHAMA et al., 2021). O sistema monofatorial na maior parte das espécies o macho é heterogamético XX/XY, e menos frequentemente homogamético ZZ/ZW (CHEN et al., 2022; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; GUIGUEN et al., 2018). Em peixes com GSD, o sexo primário de um indivíduo é determinado no momento da fertilização por elementos genéticos hereditários que diferem entre os sexos (FERNANDINO e HATTORI, 2019). Em vertebrados pecilotérmicos, incluindo peixes, a maioria dos cromossomos sexuais já

descritos são homomórficos e pouco diferenciados, o que dificulta a identificação citológica (HEULE et al., 2014). Em sistemas poligênicos, o sexo é determinado pela combinação de vários fatores distribuídos ao longo do genoma cada um com um efeito aditivo e difíceis de caracterizar (NAGAHAMA et al., 2021). Nesses casos, os cruzamentos não produzem proporções sexuais 1: 1 de forma consistente, indicando que a segregação mendeliana de cromossomos sexuais não é responsável pela determinação do sexo (CHEN et al., 2022; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; GUIGUEN et al., 2018; KOSSWIG, 1964; NAGAHAMA et al., 2021).

Fatores ambientais como temperatura, fotoperíodo, salinidade ou densidade da população podem ter grande influência no processo de determinação sexual. A determinação sexual ambiental ESD implica na não existência de diferenças genéticas consistentes entre os sexos, que é determinado em momento posterior à fertilização (NAGAHAMA et al., 2021; VALENZUELA, 2008).

A coexistência de GSD e TSD mostrou que, em muitos casos, o que se pensava ser uma hierarquia genética estrita pode ser desviado, ou pelo menos influenciado, por outros gatilhos ou associações de gatilhos ambientais (GUIGUEN et al., 2018). O pejerrey *Odontesthes bonariensis* é um excelente modelo para o estudo de determinação sexual dependente da temperatura. A proporção sexual pode chegar a 100% de machos ou 100% de fêmeas em temperaturas ambientais de 29 e 17 °C, respectivamente (YAMAMOTO et al., 2014). Algumas espécies, como as tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* e azul *O. aureus* com determinação sexual cromossômica podem também sofrer forte influência da temperatura (CHEN et al., 2018).

Tabela 1. Modelos de sistemas de determinação sexual em peixes.

Espécie	Determinação Sexual	Gene marcador sexual ou Gene determinante do sexo	Influência de Fatores Ambientais	Referências
<i>Anoplopoma fimbria</i>	XX/XY	<i>gsdf</i>	-	Herpin et al., 2021
<i>Astyanax mexicanus</i>	Cromossomo B	<i>gdf6b</i>	-	Imarazene et al., 2021
<i>Cinoglossus semilevis</i>	ZZ/ZW	<i>dmrt1</i>	-	Cui et al., 2017
<i>Clupea harengus</i>	XX/XY	<i>bmpr1bbY</i>	-	Rafati et al., 2020
<i>Esox lucius</i>	XX/XY	<i>amhby</i>	-	Pan et al., 2019
<i>Gadus morhua</i>	XX/XY	<i>zkY</i>	-	Kirubakaran et al., 2019
<i>Ictalurus punctatus</i>	XX/XY	<i>bcar1</i>	Temperatura	Wen et al., 2023 Bao et al., 2019
<i>Nothobranchius furzeri</i>	XX/XY	<i>gdf6Y</i>	-	Reichwald et al., 2015
<i>Odontesthes bonariensis</i>	XX/XY	<i>amhy</i>	Temperatura	Yamamoto et al., 2014
<i>Odontesthes hatcheri</i>	XX/XY	<i>amhy</i>	Temperatura	Hattori et al., 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XX/XY	<i>sdY</i>	-	Yano et al., 2012

<i>Oreochromis aureus</i>	ZZ/ZW	<i>banf2w</i>	Temperatura	Curzon et al., 2021
<i>Oreochromis mossambicus</i>	XX/XY	<i>figla-like</i>	Temperatura	Curzon et al., 2022
<i>Oreochromis niloticus</i>	XX/XY	<i>amhy</i>	Temperatura	Li et al., 2015
<i>Oryzias dancena</i>	XX/XY	<i>sox3</i>	-	Takehana et al., 2014
<i>Oryzias latipes</i>	XX/XY	<i>dmrt1</i>	Temperatura	Matsuda et al., 2002
<i>Oryzias luzonensis</i>	XX/XY	<i>gsdfY</i>	-	Myosho et al., 2012
<i>Perca flavescens</i>	XX/XY	<i>amhr2y</i>	-	Feron et al., 2020
<i>Plecoglossus altivelis</i>	XX/XY	<i>amhr2bY</i>	-	Nakamoto et al., 2021
<i>Salmo salar</i>	XX/XY	<i>sdY</i>	-	Yano et al., 2012
<i>Scophthalmus maximus</i>	ZZ/ZW	<i>sox2</i>	Temperatura	Martínez et al., 2021

Fonte: Chen et al., 2022; Curzon et al., 2023; Guiguen et al., 2018; Nagahama et al., 2021. – (traço) significa que não foram encontrados estudos até o momento.

Diferenciação sexual

Diferenciação sexual compreende os eventos morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento gonadal que permitem a expressão do sexo genético para o sexo fenotípico apropriado. Este processo abrange um período em que o primórdio gonadal (indiferenciado) se diferencia e se estabelece como ovário ou testículo (FERNANDINO e HATTORI, 2019). Segundo Bruslé and Bruslé (1983), a diferenciação do sexo abrange todos os eventos que ocorrem na gônada primordial, incluindo a migração de células germinativas primordiais, o estabelecimento de cristas gonadais e a diferenciação morfológica das gônadas em testículos ou ovários.

É muito comum que a diferenciação sexual ocorra primeiro nas fêmeas, com a entrada das oogônias em meiose e/ou alta proliferação de células somáticas para formar a cavidade do ovário (GUIGUEN et al., 2018; RAJENDIRAN et al., 2021). Já nos machos, a diferenciação sexual ocorre mais tardiamente e é caracterizada pela diferenciação das espermatogônias, a partir das células germinativas primordiais, em arranjos específicos com as somáticas células de Sertoli. Essa associação estabelece o início da formação dos cistos espermatogênicos. Concomitantemente ocorre a diferenciação do sistema vascular do testículo, incluindo a veia testicular, a artéria testicular e os canais deferentes (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002).

Estudos sobre o desenvolvimento sexual em peixes

A tecnologia ômica é um termo universal para tecnologias modernas capazes de gerar um panorama amplo sobre eventos que ocorrem em um determinado organismo (MOHANTY et al., 2019). Essas tecnologias proporcionam uma triagem de alto rendimento e ajudam a explorar diferentes níveis de moléculas biológicas que constituem e mantêm um determinado organismo, como por exemplo: genômica, conjunto dos genes; transcriptômica, conjunto de mRNA; proteômica, conjunto de proteínas, metaboloma, conjunto de metabólitos (MIGLIO et al., 2023).

Segundo Mohanty et al. (2019), as principais razões para a crescente popularidade das tecnologias ômicas são a sua capacidade de gerar uma visão compreensível de um sistema biológico complexo como um todo, poder explorar de maneira global molécula(s) biológica(s) dentro da organela/célula/tecido/órgão sob condições específicas, poder identificar moléculas-chave no sistema/processo/amostra

biológica em estudo, e capacidade de compreender os diferentes comportamentos das biomoléculas sob a condição em exame.

Genômica

A genômica fornece dados completos sobre o conjunto de informação genética de um organismo (DNA) (MARTYNIUK et al., 2020). O estudo da determinação do sexo em espécies não-modelo tem sido tecnicamente desafiador, e para isso novas metodologias de sequenciamento têm sido aplicadas, pois permitem a identificação precisa de sequências genômicas específicas do sexo (FERON et al., 2021). Atualmente, abordagens genômicas no estudo das influências genéticas e ambientais sobre a determinação e diferenciação sexual das espécies de peixes tornaram possível a identificação do sistema de determinação sexual, regiões/cromossomo/gene determinante do sexo (Tabela 2) (CHEN et al., 2018; CURZON et al., 2023; GUIGUEN et al., 2018; RAJENDIRAN et al., 2021).

Ainda, o advento das tecnologias de sequenciamento NGS (Next Generation Sequencing) e genotipagem de alto rendimento permitiu a comparação de padrões de polimorfismos em um número muito grande de marcadores. Embora a caracterização da estrutura genética a partir de dados individuais de sequenciamento permaneça cara para muitas espécies não-modelo, o sequenciamento de pools de DNAs (pool-seq) representa uma alternativa atraente e econômica (HIVERT et al., 2018). No *Silurus meridionalis*, por exemplo, com base no sequenciamento do genoma foi possível a identificação do cromossomo sexual, e a comprovação através de nocaute (CRISPR knockout) do gene determinante do sexo, o *amhr2y* (ZHENG et al., 2022). Assim como, uma montagem do genoma em nível cromossômico do *Solea senegalensis*, aliada ao pool-seq masculino e feminino propiciou a identificação, validação e confirmação funcional do *fshry* como um marcador e o gene determinante do sexo (LA HERRÁN et al., 2023).

Nesse sentido existem grandes avanços para espécies nativas de grande destaque como o tambaqui *Colossoma macropomum* e o pirarucu *Arapaima gigas*. Recentemente, para o tambaqui a associação da técnica de sequenciamento ddRAD (double digest restriction-site associated DNA) e a montagem de um mapa ligação de alta densidade permitiram a identificação e validação de quatro marcadores sexuais baseados em SNPs (VARELA et al., 2021). Quase ao mesmo tempo, uma abordagem que combinou uma nova montagem do genoma com o pool-seq masculino e feminino, conseguiu identificar

e validar o gene *id2bbY* como marcador sexual para pirarucu *Arapaima gigas* (ADOLFI et al., 2021).

Transcriptômica

A transcriptômica fornece dados sobre mRNAs e RNAs não codificantes (MARTYNIUK et al., 2020). As características de um organismo são determinadas pelos genes expressos nas células de cada tecido em determinado momento de sua vida. RNA-seq é uma técnica capaz de sequenciar todo o conjunto de RNAs de um organismo ou de determinado tecido, sendo possível analisar o transcriptoma em grande escala e atingir resoluções amplas dos níveis de expressão (TANG et al., 2010). Assim, a análise da expressão gênica é bastante utilizada para entender a complexa diversidade que envolve a formação e o desenvolvimento gonadal em peixes teleósteos (Tabela 2) (BÖHNE et al., 2013; CHEN et al., 2022; FAJKOWSKA et al., 2019; FAN et al., 2019).

Como visto, o transcriptoma ajuda a compreender a função molecular e os processos celulares que estão ativos e inativos em um determinado tecido/tempo. Atualmente diversas vias de desenvolvimento sexual foram descritas, análise do transcriptoma de juvenis de tambaqui indiferenciados, sugere que a diferenciação sexual é regulada pela via Wnt/ β -catenina, que ativa a expressão dos genes *foxl2* e *fst*, levando à formação dos ovários. Por outro lado, um mecanismo antagônico (principalmente *wtl* e *fgfr2*) bloqueia a ação dessa via de sinalização, ativando genes complementares a jusante para o desenvolvimento de testículos (LOBO et al., 2020). Um estudo de análise comparativa do transcriptoma de gônadas masculinas e femininas antes da diferenciação sexual da carpa comum *Cyprinus carpio*, propôs uma regulação da via Dmrt1-Sox9-Fgf9, que ativa os genes complementares a jusante do desenvolvimento de testículos, e o mecanismo antagônico bloqueia a ação do Foxl2, ativando genes complementares a jusante no desenvolvimento ovariano (WANG et al., 2023). O RNA-seq foi usado para identificar genes candidatos envolvidos na determinação do sexo do *Hemibagrus wyckioides*, foram identificados sete genes diferencialmente expressos (DEGs) que estavam envolvidos na biossíntese de hormônios esteróides e na via de sinalização TGF- β , dos quais *amh* e *gdf6a* masculinos, enquanto *foxl2*, *cyp19a1b* e *hsd17b1* femininos (WEI et al., 2023).

Proteômica

A proteômica pode ser entendida como o estudo de todas as formas proteicas de um organismo e suas interações, em função do tempo, idade, estado, fatores externos, dentre outros (MOHANTY et al., 2019). É capaz de explorar as etapas da comunicação intercelular que medeiam vias de sinalização intracelular, através da qual a célula mantém seu destino como proliferação, migração, reconhecimento e diferenciação (TIAN, 2014). Essa tecnologia adiciona uma nova visão da função molecular e os processos, e é uma excelente abordagem nos estudos funcionais de desenvolvimento sexual. Análises proteômicas e metabolômicas integradas de gônadas de *Odontobutis potamophila*, mostraram que o metabolismo lipídico e as proteínas Ctnnb1, Piwil1, Hsd17b1 e Dnal1 desempenham um papel importante na determinação do sexo (WANG et al., 2019).

Tabela 2. Abordagens transcriptômicas e genômicas para estudos de desenvolvimento sexual em peixes

Espécie	Método de investigação	Resposta obtida	Referência
<i>Acipenser ruthenus</i>	Pool-seq	Descoberta de região específica de fêmea (W), consistente com um potencial sistema ZZ/ZW	Kuhl et al., 2021
<i>Acipenser schrenckii</i>	RT-qPCR	miR-34b/c é um miRNA chave envolvido na regulação da diferenciação sexual	Zhang et al., 2022
<i>Acrossocheilus fasciatus</i>	RNA-Seq, RT-qPCR	Genes candidatos à determinante do sexo: <i>abce1</i> , <i>nom1</i> , <i>pkmyt1</i> , <i>ptgir</i> , <i>six1</i> , <i>snrpa</i> , <i>wnt4</i> , <i>dmrt3</i> , <i>e2a</i> e <i>foxl2</i>	Ren et al., 2023
<i>Arapaima gigas</i>	Re-sequenciamento do genoma completo de um macho e uma fêmea, Pool-seq	<i>id2bbY</i> marcador sexo específico e candidato a gene determinante do sexo	Adolfi et al., 2021
<i>Colossoma macropomum</i>	Sequenciamento de DNA associado a sítios de restrição de digestão dupla (ddRAD) (ddRAD)	região associada ao sexo (LG 26) sugerindo determinação do sexo XX/XY, quatro marcadores ligados ao sexo	Varela et al., 2021

<i>Colossoma macropomum</i>	RAD-seq	Wnt/ β -catenina exerce um papel na diferenciação sexual	Lobo et al., 2020
<i>Esox lucius</i>	RAD-Seq, Nocaute gênico	<i>amhby</i> é o gene determinante do sexo.	Pan et al., 2019
<i>Gadus morhua</i>	Re-sequenciamento do genoma de 49 machos e 53 fêmeas	<i>zkY</i> presente na região específica do macho em LG11 está envolvido na determinação do sexo	Kirubakaran et al., 2019
<i>Ictalurus punctatus</i>	Pool-seq	Identificação do cromossomo sexual LG04, e desenvolvimento de um marcador sexo específico.	Wen et al., 2023
<i>Odontesthes hatcheri</i>	Padrão de expressão, Nocaute gênico	<i>amhy</i> candidato a gene determinante do sexo	Hattori et al., 2012
<i>Perca flavescens</i>	Sequenciamento do genoma completo de um macho, Pool-seq,	<i>amhr2by</i> marcador sexo específico e candidato a gene determinante do sexo.	Feron et al., 2020
<i>Plecoglossus altivelis</i>	Sequenciamento do genoma completo de um macho, mapeamento de associação genoma completo populações selvagens.	<i>amhr2</i> no cromossomo Y é o gene candidato a determinante do sexo.	Nakamoto et al., 2021

Scatophagus tetracanthus Sequenciamento do genoma completo de um macho, RNA-seq *dmrt1* é específico do sexo masculino sendo o gene candidato à DS. Peng et al., 2023

REFERÊNCIAS

- ADOLFI, M. C. et al. **A duplicated copy of id2b is an unusual sex-determining candidate gene on the Y chromosome of arapaima (*Arapaima gigas*)**. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 11, nº 1, 2021. ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/s41598-021-01066-z.
- ALMEIDA, F. L. et al. **Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight**. *Aquaculture*, [s.l.], v. 452, p. 224–232, 2016. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.10.031.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília/Tefe: CNPq /Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 1988. 1–198 p.
- ARIEDE, R. B. et al. **Linkage map for chromosome-level genome anchoring and genome-wide association study for resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Colossoma macropomum***. *Aquaculture*, [s.l.], v. 560, p. 738462, 2022. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738462.
- _____. **Computer vision system using deep learning to predict rib and loin yield in the fish *Colossoma macropomum***. *Animal Genetics*, [s.l.], v. 54, nº 3, p. 375–388, 2023. ISSN: 0268-9146, DOI: 10.1111/age.13302.
- BAO, L. et al. **The Y chromosome sequence of the channel catfish suggests novel sex determination mechanisms in teleost fish**. *BMC Biology*, [s.l.], v. 17, nº 1, p. 6, 2019. ISSN: 1741-7007, DOI: 10.1186/s12915-019-0627-7.
- BAROILLER, J. F.; D’COTTA, H.; SAILLANT, E. **Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation**. *Sexual Development*, [s.l.], v. 3, nº 2–3, p. 118–135, 2009. ISSN: 1661-5425, DOI: 10.1159/000223077.
- BÖHNE, A. et al. **Expression and sequence evolution of aromatase *cyp19a1* and other sexual development genes in east african cichlid fishes**. *Molecular Biology and Evolution*, [s.l.], v. 30, nº 10, p. 2268–2285, 2013. ISSN: 07374038, DOI: 10.1093/molbev/mst124.
- BRUSLÉ, J.; BRUSLÉ, S. **La gonadogenèse des Poissons**. *Reproduction Nutrition Developpement*, [s.l.], v. 23, nº 3, p. 453–491, 1983.
- BUCKUP, P. Andreas. et al. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. [s.l.]: Museu Nacional, 2007. 195 p. ISBN: 9788574270180.
- CHEN, Ji; ZHU, Z.; HU, W. **Progress in research on fish sex determining genes**. *Water Biology and Security*, [s.l.], v. 1, nº 1, p. 100008, 2022. ISSN: 27727351, DOI: 10.1016/j.watbs.2022.100008.
- CHEN, Jinlin et al. **A Review of Genetic Advances Related to Sex Control and Manipulation in Tilapia**. *Journal of the World Aquaculture Society*, [s.l.], v. 49, nº 2, p. 277–291, 2018. ISSN: 08938849, DOI: 10.1111/jwas.12479.
- CUI, Z. et al. **Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)**. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, nº 1, p. 42213, 2017. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep42213.
- CURZON, A. Y. et al. **Gene Variant of Barrier to Autointegration Factor 2 (*Banf2w*) Is Concordant with Female Determination in Cichlids**. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 22, nº 13, p. 7073, 2021. ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms22137073.

_____. **Absence of Figla-like Gene Is Concordant with Femaleness in Cichlids Harboring the LG1 Sex-Determination System.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 23, n° 14, p. 7636, 2022. ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms23147636.

_____. **Master-Key Regulators of Sex Determination in Fish and Other Vertebrates—A Review.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 24, n° 3, p. 2468, 2023. ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms24032468.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. **Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences.** *Aquaculture*, [s.l.], v. 208, p. 191–364, 2002.

FAJKOWSKA, M. et al. **Sex-related gene expression profiles in various tissues of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*).** *Aquaculture*, [s.l.], v. 500, p. 532–539, 2019. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.066.

FAN, Z. et al. **Roles of forkhead box protein L2 (*foxl2*) during gonad differentiation and maintenance in a fish, the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Reproduction, Fertility and Development*, [s.l.], v. 31, n° 11, p. 1742–1752, 2019. ISSN: 14485990, DOI: 10.1071/RD18233.

FERNANDINO, J. I.; HATTORI, R. S. **Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment.** *General and Comparative Endocrinology*, [s.l.], v. 273, p. 172–183, 2019. ISSN: 00166480, DOI: 10.1016/j.ygcen.2018.07.002.

FERON, R. et al. **Characterization of a Y-specific duplication/insertion of the anti-Müllerian hormone type II receptor gene based on a chromosome-scale genome assembly of yellow perch, *Perca flavescens*.** *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 20, n° 2, p. 531–543, 2020. ISSN: 1755-098X, DOI: 10.1111/1755-0998.13133.

_____. **RADSex: A computational workflow to study sex determination using restriction site-associated DNA sequencing data.** *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 21, n° 5, p. 1715–1731, 2021. ISSN: 1755-098X, DOI: 10.1111/1755-0998.13360.

FERRARESSO, S. et al. **fshr: a fish sex-determining locus shows variable incomplete penetrance across flathead grey mullet populations.** *iScience*, [s.l.], v. 24, n° 1, p. 101886, 2021. ISSN: 25890042, DOI: 10.1016/j.isci.2020.101886.

GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A.; HERPIN, A. **Sex Determination and Differentiation in Fish.** Em: WANG, H.-P. et al. (Orgs.). *Sex Control in Aquaculture*. 1 ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. v. 1, p. 35–63. DOI: 10.1002/9781119127291.ch2.

HASHIMOTO, D. T. et al. **Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid Juvenile Hybrids in Brazilian Aquaculture.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, n° 3, p. e89902, 2014. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0089902.

HATTORI, R. S. et al. **A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 109, n° 8, p. 2955–2959, 2012. ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1018392109.

HERPIN, A. et al. **Allelic diversification after transposable element exaptation promoted *gsdf* as the master sex determining gene of sablefish.** *Genome Research*, [s.l.], v. 31, n° 8, p. 1366–1380, 2021. ISSN: 1088-9051, DOI: 10.1101/gr.274266.120.

HEULE, C. et al. **Genetics and timing of sex determination in the East African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*.** *BMC Genetics*, [s.l.], v. 15, n° 1, 2014. ISSN: 14712156, DOI: 10.1186/s12863-014-0140-5.

HILSDORF, A. W. S. et al. **Genome assembly and annotation of the tambaqui (*Colossoma macropomum*): an emblematic fish of the Amazon River Basin.** *Gigabyte*, [s.l.], v. 2021, p. 1–14, 2021. DOI: 10.46471/gigabyte.29.

_____. **The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production.** *Reviews in Aquaculture*, [s.l.], v. 14, n° 2, p. 993–1027, 2022. ISSN: 17535131, DOI: 10.1111/raq.12638.

HIVERT, V. et al. **Measuring Genetic Differentiation from Pool-seq Data.** *Genetics*, [s.l.], v. 210, n° 1, p. 315–330, 2018. ISSN: 1943-2631, DOI: 10.1534/genetics.118.300900.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2021.** Rio de Janeiro: [s.n.], 2022. v. 49, 1–12 p.

IMARAZENE, B. et al. **A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pachón cavefish, *Astyanax mexicanus*.** *Current Biology*, [s.l.], v. 31, n° 21, p. 4800-4809.e9, 2021. ISSN: 09609822, DOI: 10.1016/j.cub.2021.08.030.

JASONOWICZ, A. J. et al. **Generation of a chromosome-level genome assembly for Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and characterization of its sex-determining genomic region.** *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 22, n° 7, p. 2685–2700, 2022. ISSN: 1755-098X, DOI: 10.1111/1755-0998.13641.

KIRUBAKARAN, T. G. et al. **Characterization of a male specific region containing a candidate sex determining gene in Atlantic cod.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 116, 2019. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/s41598-018-36748-8.

KOSSWIG, C. **Polygenic sex determination.** *Experientia*, [s.l.], v. 20, n° 4, p. 190–199, 1964. ISSN: 0014-4754, DOI: 10.1007/BF02135395.

KOTTLER, V. A. et al. **Independent Origin of XY and ZW Sex Determination Mechanisms in Mosquitofish Sister Species.** *Genetics*, [s.l.], v. 214, n° 1, p. 193–209, 2020. ISSN: 1943-2631, DOI: 10.1534/genetics.119.302698.

KUHL, H. et al. **A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, [s.l.], v. 376, n° 1832, p. 20200089, 2021. ISSN: 0962-8436, DOI: 10.1098/rstb.2020.0089.

LA HERRÁN, R. DE et al. **A chromosome-level genome assembly enables the identification of the follicle stimulating hormone receptor as the master sex-determining gene in the flatfish *Solea senegalensis*.** *Molecular Ecology Resources*, [s.l.], v. 23, n° 4, p. 886–904, 2023. ISSN: 1755-098X, DOI: 10.1111/1755-0998.13750.

LAWRENCE, C. **Genetic sex differentiation in fish.** *Lab Animal*, [s.l.], v. 42, n° 10, p. 363–363, 2013. ISSN: 0093-7355, DOI: 10.1038/lab.320.

LI, M. et al. **A Tandem Duplicate of Anti-Müllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *PLOS Genetics*, [s.l.], v. 11, n° 11, p. e1005678, 2015. ISSN: 1553-7404, DOI: 10.1371/journal.pgen.1005678.

LOBO, I. K. C. et al. **Transcriptome of tambaqui *Colossoma macropomum* during gonad differentiation: Different molecular signals leading to sex identity.** *Genomics*, [s.l.], v. 112, n° 3, p. 2478–2488, 2020. ISSN: 10898646, DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.01.022.

MARTÍNEZ, P. et al. **A genome-wide association study, supported by a new chromosome-level genome assembly, suggests *sox2* as a main driver of the undifferentiated ZZ/ZW**

sex determination of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genomics*, [s.l.], v. 113, n° 4, p. 1705–1718, 2021. ISSN: 08887543, DOI: 10.1016/j.ygeno.2021.04.007.

MARTYNIUK, C. J. et al. **Twenty years of transcriptomics, 17alpha-ethinylestradiol, and fish.** *General and Comparative Endocrinology*, [s.l.], v. 286, p. 113325, 2020. ISSN: 00166480, DOI: 10.1016/j.ygcen.2019.113325.

MATSUDA, M. et al. **DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish.** *Nature*, [s.l.], v. 417, n° 6888, p. 559–563, 2002. ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature751.

MIGLIO, A. et al. **Omics Technologies in Veterinary Medicine: Literature Review and Perspectives in Transfusion Medicine.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, [s.l.], v. 50, n° 3, p. 198–207, 2023. ISSN: 1660-3796, DOI: 10.1159/000530870.

MOHANTY, B. P. et al. **OMICS TECHNOLOGY IN FISHERIES AND AQUACULTURE.** Em: MOHANTY, B. P. (Org.). *Advances in Fish Research*. Delhi: Narendra Publishing House, 2019. v. VII, p. 1–30.

MORAIS, I. da S. De; O’SULLIVAN, F. L. de A. **Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816).** *Scientia Amazonia*, [s.l.], v. 6, n° 1, p. 81–93, 2017.

MORAIS, I. da S. De; REIS, V. R.; ALMEIDA, F. L. de. **The influence of the water pH on the sex ratio of tambaqui *colossoma macropomum* (CUVIER, 1818).** *Aquaculture Reports*, [s.l.], v. 17, 2020. ISSN: 23525134, DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100334.

MYOSHO, T. et al. **Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias luzonensis*.** *Genetics*, [s.l.], v. 191, n° 1, p. 163–170, 2012. ISSN: 1943-2631, DOI: 10.1534/genetics.111.137497.

NAGAHAMA, Y. et al. **Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species.** *Physiological Reviews*, [s.l.], v. 101, n° 3, p. 1237–1308, 2021. ISSN: 15221210, DOI: 10.1152/physrev.00044.2019.

NAKAMOTO, M. et al. **A Y-linked anti-Müllerian hormone type-II receptor is the sex-determining gene in ayu, *Plecoglossus altivelis*.** *PLOS Genetics*, [s.l.], v. 17, n° 8, p. e1009705, 2021. ISSN: 1553-7404, DOI: 10.1371/journal.pgen.1009705.

NAKAYAMA, C. M. et al. **Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalminidae (Characiformes) from the Amazon basin.** *Neotropical Ichthyology*, [s.l.], v. 10, n° 1, p. 53–58, 2012.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World.** 5 ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2016. 1–752 p. ISBN: 9781119174844, DOI: 10.1002/9781119174844.

OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. **Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 3, n° 7, 2008. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0002837.

PAN, Q. et al. **Identification of the master sex determining gene in Northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation.** *PLOS Genetics*, [s.l.], v. 15, n° 8, p. e1008013, 2019. ISSN: 1553-7404, DOI: 10.1371/journal.pgen.1008013.

- PENG, Y.-X. et al. **Identification of sex-linked marker and candidate sex determination gene in ornamental fish, African scat (*Scatophagus tetracanthus*)**. *Aquaculture*, [s.l.], v. 563, p. 739023, 2023. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.739023.
- PIFERRER, F. **HORMONAL CONTROL OF REPRODUCTION AND GROWTH | Endocrine Control of Sex Differentiation in Fish**. *Encyclopedia of Fish Physiology*. [s.l.]: Elsevier, 2011. p. 1490–1499. DOI: 10.1016/B978-0-12-374553-8.00162-3.
- PONNIKAS, S. et al. **Why Do Sex Chromosomes Stop Recombining?** *Trends in Genetics*, [s.l.], v. 34, n° 7, p. 492–503, 2018. ISSN: 01689525, DOI: 10.1016/j.tig.2018.04.001.
- RAFATI, N. et al. **Reconstruction of the birth of a male sex chromosome present in Atlantic herring**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 117, n° 39, p. 24359–24368, 2020. ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.2009925117.
- RAJENDIRAN, P. et al. **Sex Determination and Differentiation in Teleost: Roles of Genetics, Environment, and Brain**. *Biology*, [s.l.], v. 10, n° 10, p. 973, 2021. ISSN: 2079-7737, DOI: 10.3390/biology10100973.
- REICHWALD, K. et al. **Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish**. *Cell*, [s.l.], v. 163, n° 6, p. 1527–1538, 2015. ISSN: 00928674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.071.
- REN, Y. et al. **dmrt3, nom1, abce1, and pkmyt1 play key roles in gonadal sex determination in *Acrossocheilus fasciatus***. *Aquaculture International*, [s.l.], v. 31, p. 317–332, 2023. ISSN: 1573143X, DOI: 10.1007/s10499-022-00976-7.
- SAINT-PAUL, U. et al. **Fish Communities in Central Amazonian White- and Blackwater Floodplains**. *Environmental Biology of Fishes*, [s.l.], v. 57, n° 3, p. 235–250, 2000. ISSN: 0378-1909, DOI: 10.1023/A:1007699130333.
- SANTOS, G. M. Dos; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Em: FERRAZ, I. D. K.; COHN-HAFT, M. (Orgs.). 2 ed. Manaus: INPA, 2009. 1–144 p.
- SUN, D. et al. **Comparative study of candidate sex determination regions in snakeheads (*Channa argus* and *C. maculata*) and development of novel sex markers**. *Aquaculture*, [s.l.], v. 575, p. 739771, 2023. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2023.739771.
- TAKEHANA, Y. et al. **Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena***. *Nature Communications*, [s.l.], v. 5, n° 1, p. 4157, 2014. ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/ncomms5157.
- TANG, F. et al. **RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell**. *Nature Protocols*, [s.l.], v. 5, n° 3, p. 516–535, 2010. ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/nprot.2009.236.
- TAO, W. et al. **A Chromosome-Level Genome Assembly of Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Reveals the Structure of Sex Determining Regions**. *Frontiers in Genetics*, [s.l.], v. 12, 2021. ISSN: 1664-8021, DOI: 10.3389/fgene.2021.796211.
- TIAN, R. **Exploring intercellular signaling by proteomic approaches**. *PROTEOMICS*, [s.l.], v. 14, n° 4–5, p. 498–512, 2014. ISSN: 16159853, DOI: 10.1002/pmic.201300259.
- VAL, A. L.; OLIVEIRA, A. M. ***Colossoma macropomum* —A tropical fish model for biology and aquaculture**. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, [s.l.], v. 335, n° 9–10, p. 761–770, 2021. ISSN: 2471-5638, DOI: 10.1002/jez.2536.

- VALENZUELA, N. **Sexual development and the evolution of sex determination.** *Sexual Development*, [s.l.], v. 2, n° 2, p. 64–72, 2008. ISSN: 16615425, DOI: 10.1159/000129691.
- VARELA, E. S. et al. **A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*.** *BMC Genomics*, [s.l.], v. 22, n° 1, 2021. ISSN: 14712164, DOI: 10.1186/s12864-021-08037-8.
- VIEIRA, E. F.; ISAAC, V. J.; FABRÉ, N. N. **Biologia reprodutiva do Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalmidae), no baixo Amazonas, Brasil.** *Acta Amazonica*, [s.l.], v. 29, n° 4, p. 625–638, 1999. ISSN: 0044-5967, DOI: 10.1590/1809-43921999294638.
- VILLACORTA-CORREA, M. A.; SAINT-PAUL, U. **Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil.** *Revista brasileira de biologia*, [s.l.], v. 59, n° 4, p. 637–652, 1999. ISSN: 00347108, DOI: 10.1590/S0034-71081999000400013.
- WANG, H. P.; PIFERRER, F.; CHEN, S. L. **Sex Control in Aquaculture.** Em: WANG, H. P. et al. (Orgs.). 1 ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2019. v. 1, 888 p. ISBN: 9781119127291, DOI: 10.1002/9781119127291.
- WANG, M. et al. **Comparative transcriptome analysis of early sexual differentiation in the male and female gonads of common carp (*Cyprinus carpio*).** *Aquaculture*, [s.l.], v. 563, p. 738984, 2023. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738984.
- WANG, T. et al. **Integrated analysis of proteomics and metabolomics reveals the potential sex determination mechanism in *Odontobutis potamophila*.** *Journal of Proteomics*, [s.l.], v. 208, p. 103482, 2019. ISSN: 18743919, DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103482.
- WEI, W.-Y. et al. **Gonadal transcriptomes reveal sex-biased expression genes associated with sex determination and differentiation in red-tail catfish (*Hemibagrus wyckii*).** *BMC Genomics*, [s.l.], v. 24, n° 1, p. 183, 2023. ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/s12864-023-09264-x.
- WEN, M. et al. **Sex chromosome and sex locus characterization in goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758).** *BMC Genomics*, [s.l.], v. 21, n° 1, p. 552, 2020. ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/s12864-020-06959-3.
- WEN, M.; ZHANG, Y.; WANG, S.; WANG, Y. et al. **Characterization of sex locus and sex-specific sequences in the mandarin fishes.** *Aquaculture*, [s.l.], v. 561, p. 738650, 2022. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738650.
- WEN, M.; ZHANG, Y.; WANG, S.; HU, F. et al. **Sex locus and sex markers identification using whole genome pool-sequencing approach in the largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.).** *Aquaculture*, [s.l.], v. 559, p. 738375, 2022. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738375.
- WEN, M. et al. **Characterization of the sex determining region of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and development of a sex-genotyping test.** *Gene*, [s.l.], v. 850, p. 146933, 2023. ISSN: 03781119, DOI: 10.1016/j.gene.2022.146933.
- YAMAMOTO, T. **Sex differentiation.** Em: HOAR, W.; RANDALL, D. (Orgs.). *Fish Physiology*. [s.l.]: Academic Press, 1969. v. 1, p. 117–175. ISSN: 00209309, DOI: 10.1002/iroh.19710560141.
- YAMAMOTO, Y. et al. **Coexistence of Genotypic and Temperature-Dependent Sex Determination in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, n° 7, p. e102574, 2014. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0102574.

YANO, A. et al. **An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*.** *Current Biology*, [s.l.], v. 22, n° 15, p. 1423–1428, 2012. ISSN: 09609822, DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.045.

ZHANG, A. et al. **Computational identification of Y-linked markers and genes in the grass carp genome by using a pool-and-sequence method.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, n° 1, p. 8213, 2017. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/s41598-017-08476-y.

ZHANG, X. et al. **MiR-34b/c play a role in early sex differentiation of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*.** *Frontiers in Zoology*, [s.l.], v. 19, n° 1, p. 23, 2022. ISSN: 1742-9994, DOI: 10.1186/s12983-022-00469-6.

ZHENG, S. et al. **Identification of sex chromosome and sex-determining gene of southern catfish (*Silurus meridionalis*) based on XX, XY and YY genome sequencing.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, [s.l.], v. 289, n° 1971, 2022. ISSN: 0962-8452, DOI: 10.1098/rspb.2021.2645.

_____. **Characterization of the male-specific region containing the candidate sex-determining gene in Amur catfish (*Silurus asotus*) using third-generation- and pool-sequencing data.** *International Journal of Biological Macromolecules*, [s.l.], v. 248, p. 125908, 2023. ISSN: 01418130, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125908.

CAPÍTULO I

Effect of temperature on the early sexual development of tambaqui *Colossoma macropomum*



Effect of temperature on the early sexual development of tambaqui *Colossoma macropomum*

Vanessa Ribeiro Reis¹ · Rômulo Veiga Paixão² · Irani da Silva de Moraes³ · Izabel Correa Bandeira¹ · Adalberto Luís Val⁴ · Gilvan Ferreira da Silva^{1,2} · Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan²

Received: 17 March 2023 / Accepted: 2 August 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

Abstract

Sex development is a multi-step process involving determination, differentiation, and maintenance of the gonads, which culminates in producing fertile sperm and eggs. In teleosts, candidate genes mastering this process can be thermosensitive before or just at the beginning of differentiation, the sensitive period in fish. The knowledge of these mechanisms may be useful for the production of monosex populations in aquaculture. Here we investigated the influence of temperature on survival, growth, expression profiles of genes involved in early sexual development, and sex ratio. 5-day-old (undifferentiated) larvae were reared at 26, 28 and 31 °C for 90 days, and expression of genes involved in testis- (*wt1b* and *ar*) and ovary-determining (*amh* and *foxl2*) pathways, and *vasa*, were analysed four times from 20 to 90 days post-hatching, and the resulting sex ratios were estimated. Only *foxl2* showed a thermosensitive transcription at 20 dph, decreasing at the highest temperature. None of the male-bias genes were regulated by temperature. Still, both *wt1b* and *ar* were upregulated in some individuals long after sex differentiation, suggesting the importance of testis-skewed genes not only at testis establishment but also at later stages. The sex ratio was not affected by temperature. Our study also revealed an unusual *vasa* expression profile before and after gonadal differentiation; in some fish increasing expression values were recorded while others presented low *vasa* expression even after differentiation. Our results support a strict genetic control in the sex determination of tambaqui, despite thermosensitivity of some genes involved in its sexual development.

Handling Editor: Pierre Boudry.

✉ Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan
fernanda.almeida@embrapa.br

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

² Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil

³ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁴ Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil

Keywords Temperature · Sex determination · Neotropical fish · Sex ratio · Gene expression.

Introduction

The establishment of the sex of an individual depends on the close relationship between the mechanisms of sex determination and gonad differentiation. Among vertebrates, fish are the most diverse group regarding both processes, which generally occurs in species-specific and even strain-specific ways (Kossack and Draper 2019; Nagahama et al. 2021). In aquaculture species, the manipulation of reproduction and sex ratio are important features to optimize fish production (Taranger et al. 2010; Martínez et al. 2014).

In short, teleost present genetic (GSD) and environmental (ESD) sex determination systems, with the possibility of mixed systems (Nagahama et al. 2021). In species displaying ESD, there are no consistent genetic differences between males and females and the sex ratio is rarely 1:1 (Valenzuela et al. 2003; Sarre et al. 2004; Valenzuela 2008). In these cases, the sex can be influenced by temperature, pH, photoperiod, hypoxia, density, and social interactions that somehow overlap the genetic background (reviewed by Fernandino et al. 2013). One of the most important environmental factors driving sex differentiation in fish is temperature (temperature-dependent sex determination, TSD). In such cases, the water temperature during the phase of undifferentiated gonads permanently and irreversibly influences the phenotypic sex of sensitive individuals (Valenzuela et al. 2003; Ospina-Álvarez and Piferrer 2008). Even in some GSD species the exposure to extreme temperatures can alter the sex by epigenetic regulation (Shao et al. 2014; Miyoshi et al. 2020; Geffroy et al. 2021).

It is assumed that the thermal master switch, which directs the undifferentiated gonads to follow the male or female pathway, is the main gene(s) activated during the thermosensitive period that drives specific responses during this developmental time window (Shen and Wang 2014). Candidates for this role are genes expressed prior to, or exactly at, the onset of the sensitive period. Genes such as *hsd11b2*, *gr1*, *ar*, *sox9*, *sox8*, *fgf9*, *amh* (mis), *wt1* and *dmrt1* (generally involved in the testis-determining pathway) and *foxl2*, *cyp19a1a*, *wt4*, *rspo1* (implicated in the ovary-determining pathway) have been found to be sex-biased expressed and thermo-sensitive in fish (Fernandino et al. 2012; Heule et al. 2014; Shen et al. 2018; Shen and Wang 2018). In addition, the germ cells are important in mediating the direction of gonadal development in some species, and the degeneration or inhibition of germ cells by thermal stress are related to masculinization in many species (Shen and Wang 2018). Vasa have been reported to play pivotal roles in germ cell development and differentiation both in vertebrates (Tanaka et al. 2000; Hartung et al. 2014) and invertebrates (Hay et al. 1990; Yang et al. 2023). It is expressed only in germline cells and is a molecular marker gene in several fish species, such as medaka *Oryzias latipes* (Shinomiya et al. 2000), orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (Qu et al. 2020) and tambaqui *Colossoma macropomum* (Vasconcelos et al. 2019).

The tambaqui *Colossoma macropomum* is the second largest scaled fish from the Amazon basin, can reach up to 30 kg and up to 1 m in length (Araújo-Lima and Goulding 1988). It represents the most prominent native species in fish farming and consumption frequency in Brazil (IBGE 2021; Hilsdorf et al. 2022; St. Louis et al. 2022) and exhibits a sex-linked growth dimorphism (Almeida et al. 2016). Tambaqui is a gonochoristic species with a female homogametic system (XX/XY) and no sex-sensitivity to different pHs, in spite of originally living in basic and acidic waters (Morais et al. 2020; Varela et al. 2021).

The gonad differentiation occurs in 40 mm total length juveniles and is characterised by a sex biased gonad gene expression in which the Wnt/ β -catenin pathway directs the ovarian differentiation process, without the involvement of *cyp19a1a* (Lobo et al. 2020; Paixão et al. 2022). Among other genes, *foxl2* and *wt1*, a classic antagonist of the Wnt/ β -catenin pathway, are exclusively expressed in differentiating females and males respectively. And surprisingly the “male-bias” *amh* is differentially over-expressed by the females, being the first teleost to have higher expression of this gene in females during sexual differentiation. Among the classic thermo-sensitive sex-linked genes in teleost, tambaqui express *ar* and *wt1* in developing testis and *amh* and *foxl2* in developing ovaries (Lobo et al. 2020). However, it is still not known if the water temperature can affect sex ratio, which could facilitate sex manipulation in tambaqui farming and help in identifying possible threatness for the wild populations in global warming scenarios. Understanding the basis of tambaqui sexual development is therefore important to support the development of new farming technologies and for conservation biology. Thus, this work aimed to investigate the influence of water temperature on the sex determination and on the expression of genes involved in the sex differentiation of tambaqui.

Materials and methods

Ethics statement

All procedures of this work comply with the ethical of animal experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and were approved by the Local Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – of the Brazilian Institute for Research of the Amazon – INPA (n° 014/2017). The project has an Authorization of Access to Genetic Heritage under register A5784B5.

Animals, experimental conditions and sampling

A newly hatched full-sib progeny was obtained from a commercial hatchery at Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil. They were transported to the Laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution (LEEM), of the National Institute of Research in the Amazon (INPA/MCTI), Manaus, Brazil. During the first five days of acclimatization outdoors, a quick temperature trial was performed to establish the maximum and minimum temperatures tolerated by tambaqui fries. Briefly, we tested temperatures ranging from 31 to 33 °C and from 24 to 26 °C for 24 h in groups of 20 fries. Based on the mortality registered in each group, the lowest and highest water temperatures tolerated were 26 and 31 °C, respectively. Tambaqui larvae did not survive at the other temperatures tested.

On the 5th day, we gathered nine groups containing 60 larvae each, which were installed into 250 L tanks with aeration and water flow. Based on the pilot test of thermotolerance, the treatments consisted of three temperatures: 26 °C, 28 °C and 31 °C, carried out in triplicates. To ensure the temperature stability of the experiment, a cooling system was used for the lowest temperature and thermostats heaters applied for the highest. For the third group (average 28 °C), there was no manipulation of the temperature, and the temperature followed the natural fluctuations of the water source of LEEM. The water temperature was monitored three times daily. To assure that treatment would cover the differentiation period of tambaqui, the treatments were applied during three months. Dissolved oxygen and pH

were recorded twice and once a day, respectively. Every two weeks water samples were collected from each tank for analyses of ammonia, nitrite, alkalinity and hardness.

During the experiment, a total of 72 juveniles were sampled (on the days 20, 35, 65 and 95 post hatching; $n = 6/\text{treatment}$). For this, the fish were deeply anesthetized in a solution of buffered benzocaine (300 mg L^{-1}) (pH 7) followed by sectioning of the spinal cord. The juvenile trunks (after the removal of the head and region posterior to the urogenital papilla) were rapidly immersed in RNA later for total RNA isolation.

At the end of the treatment, the temperature of all tanks was stabilized at 28°C and the fish were transported to the facilities of EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus. Each group was allocated in a net-cage, all placed in a common earthen pond. The fish were maintained there for 8 months when the final sampling took place. At this sampling, the gonads were dissected, immediately fixed in Bouin's solution for 24 h and included in paraffin or methacrylate for histology, according to routine procedures. Microscopic analyzes were performed using the Zeiss Axio Imager 2 integrated optical microscopy system.

RNA extraction and cDNA preparation

Total mRNA from trunks ($n = 6/\text{treatment}$) was isolated using Trizol reagent (Ambion RNA by life technologies), according to the manufacturer's protocol. RNA integrity was confirmed by electrophoresis. The RNA quantity and purity were assessed by spectrophotometry on a nanodrop ND-1000 instrument (ThermoFisher Scientific). After quantification the samples were treated with DNase using the RQ1 RNase-free DNase kit (Promega). After DNase treatment, mRNA samples were again quantified by fluorimetry with the aid of Qubit 3.0 (Thermo Fisher). Complementary DNA was prepared by reverse transcription of $6 \mu\text{g}$ of total RNA using the GoScript™ Reverse Transcriptase System Kit (Promega) according to the manufacturer's recommendations.

Quantitative PCR

We chose two genes involved in the female pathway (*foxl2* and *amh*) and two from the male pathway (*wt1b* and *ar*), known to play roles during early tambaqui differentiation (Lobo et al. 2020). In addition, we evaluated the transcription of *vasa*, a key gene for germline survival and development.

The qPCR primers were designed from mRNA sequences retrieved from the NCBI database (No. GSE130895), avoiding regions of conserved domains, and looking for intron-exon junctions to avoid amplification of genomic DNA (Table 1). The Primer-BLAST (NCBI National Center for Biotechnology Information) and OligoAnalyzer Tool and PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies) were used for primer design and analysis, respectively.

Quantitative PCR was performed in duplicates in 96-well optical plates, each well containing $10 \mu\text{L}$ of Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems), 100 ng of cDNA and 200 nM of each forward and reverse primer to a final volume of $20 \mu\text{L}$. Thermocycling was conducted in a 7500 Fast Real-Time PCR System v2.3 (Applied Biosystems). The following thermal profile for qPCR was used: initial denaturation step of 95°C for 10 min, followed by 3-step cycling for a total of 40 cycles of denaturation for 15 s at 95°C , annealing for 1 min at 60°C and extension for 30 s at 72°C . No template controls for each gene were run in all qPCR plates. To validate the assays, the amplification efficiency was first estimated using serial dilutions of a pool of ovary and testes

Table 1 Primers used for RT-qPCR

Gene	Primer (5' → 3')	Product size	Accession number
<i>vasa</i>	AGTGGCGATGGTGATTTTGG ATTTCCACCACCACTGTTC	147 pb	DN199605_c6_g11_i1
<i>amh</i>	AGAGCTGCTGTCTGTGCTGA CATCTGCAGTTTGTCCA	97 pb	DN202592_c6_g1_i1
<i>foxl2</i>	GAGTGTAGCAGAAACGGAGAC CACGTACGAGTAAGGAGGTTTC	120 pb	DN147551_c0_g2_i1
<i>wt1b</i>	TTGGTGTTCTGGCTGTTGC GGATAGTGGGCACACGGGG	122 pb	DN194293_c1_g1_i1
<i>ar</i>	TTAACGCTGGACCAACAGTC GCGATTCACTAATCTCCCTT	169 pb	DN179200_c1_g1_i1
<i>β-actin</i>	CGTGATGGACTCTGGTGATG TCACGGACAATTTCCCTCTC	169 pb	DN200938_c19_g2_i1

cDNA (1:4, 1:16, 1:64, 1:256) and the determination coefficient (R^2) were all above 0.98. The melt curve was analysed at the end of each assay. The relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. All values were normalized to *β-actin* (Nascimento et al. 2016) and calibrated to the average ΔCt of the group maintained at 28 °C.

Statistical analysis

All results were checked for homogeneity of variances by the Shapiro-Wilk test, and are presented as mean \pm sd. For the analysis of the physical-chemical parameters of the water and the mortality rate, one-way ANOVA was used, followed by Tukey test for multiple comparisons of means when necessary. For expression analysis, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's multiple comparison, since the assumption of homogeneity of variances was not met. Differences in sex ratio between the groups and deviation from 1:1 sex ratio were analysed using the chi-square test. All statistical analyses were performed in GraphPad Prism 9.4.1.

Results

Experimental conditions

The water temperature of the treatments was stable during the experiment. The highest variation was -2.7 degrees in the temperature 28 °C, and the standard deviation was 0.30, 0.94 and 0.29 for the treatments of 26, 28 and 31 °C, respectively (Table 2). Dissolved oxygen decreased along with the increase of water temperature but did not reach the lower limit of tolerance for tambaqui (3 mg L^{-1}). The other physical-chemical parameters analysed did not differ during the experiment ($p < 0.05$; Table 2).

Table 2 Physical-chemical parameters of water during the temperature experiment

Water parameters	26 °C	28 °C	31 °C
Temperature (°C)	26.4±0.30 ^a	28.1±0.94 ^b	31.3±0.29 ^c
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	6.19±1.07 ^a	6.38±1.20 ^b	5.38±0.98 ^c
pH	6.2±0.60	6.2±0.60	6.3±0.47
Ammonia (mg L ⁻¹)	0.63±0.29	0.63±0.21	0.98±0.51
Nitrite (mg L ⁻¹)	0.32±0.47	0.14±0.21	0.15±0.21
Alkalinity (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	2.57±0.72	2.29±0.73	2.50±0.71
Hardness (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	19.67±7.55	15±6.41	16.45±8.69

Data are presented as means and ±SD. Different letters on the same line indicate significant difference by Tukey's 5% test ($p < 0.05$)

Fish growth and gene expression in early gonadal development

At the first sampling (20 dph), the fish had a mean standard length of 21 ± 1.0 , 22 ± 2.1 and 34 ± 2.35 mm in the groups of 26 °C, 28 and 31 °C, respectively. At 95 days post hatching (dph), standard length was 55 ± 3.0 , 55 ± 1.9 , 79 ± 4.5 mm at 26 °C, 28 and 31 °C, respectively, indicating that the treatment started before and finished after the period of sex differentiation (Lobo et al. 2020) (Fig. 1a). *vasa* transcripts were detected in all samples. In each sampling, there was no difference in the mean *vasa* expression between the groups. However, the transcription increased with fish growth, most likely owing to their gonad growth and constant multiplication of germ cells (Fig. 1b). Interestingly, in all samplings there was a group of fish that presented low *vasa* expression, irrespective of the water temperature. On the contrary, there were other fish with higher expression of this gene, mainly around the differentiation period (40 mm; at approximately 40 dph; Fig. 1).

At 15 days of treatment, when undifferentiated larvae were 20 dph, only the female-biased genes showed some regulation in transcription (Fig. 2). At this age, *amh* expression showed two groups at 31 °C, one with higher transcription than the other, while

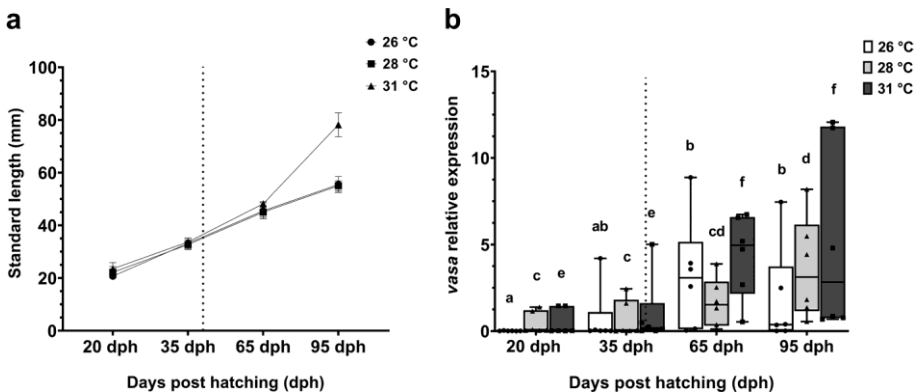


Fig. 1 Body standard length (a) and relative expression of *vasa* (b) of tambaqui *Colossoma macropomum* reared in different water temperatures during the phase of early gonad development. Dotted line points the beginning of sex differentiation in tambaqui. Results are shown as mean ± SD ($n = 6$ /group). Different letters indicate different mean values of the same group at different ages

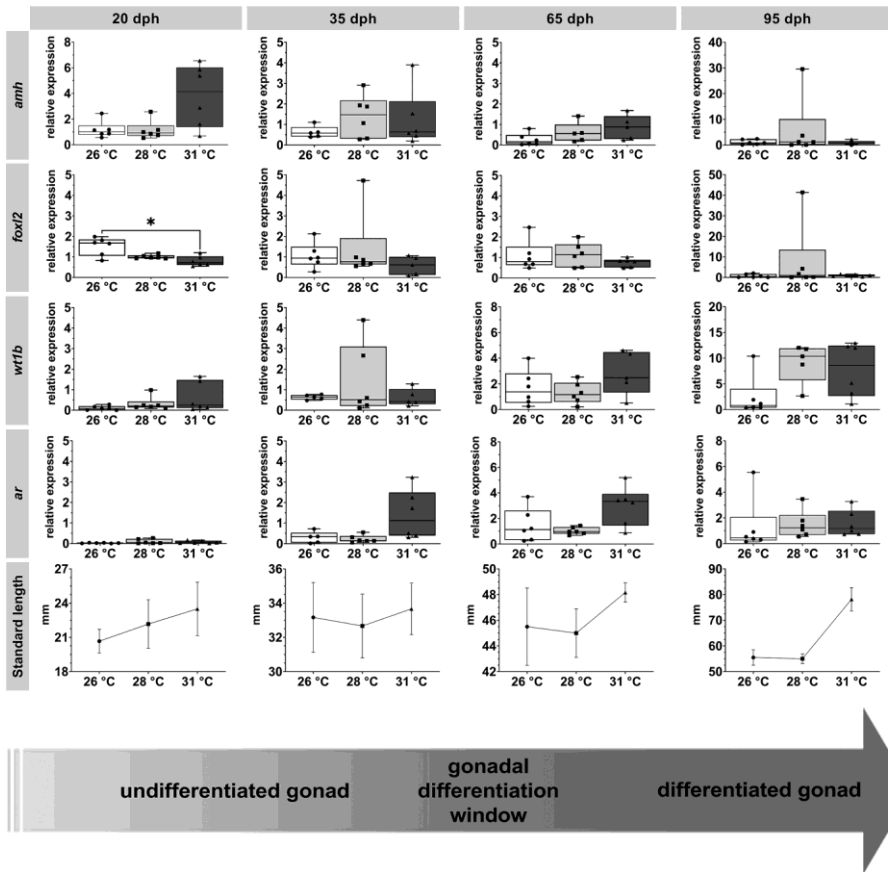


Fig. 2 Expression patterns of *amh*, *foxl2*, *wt1b*, and *ar* during growth and early gonadal development of tambaqui *Colossoma macropomum*. Results are presented as mean ± SD (n=6)

foxl2 expression decreased along with elevating temperatures. With further growth of the fish, and entering differentiation, *amh* maintained the expression pattern of two clusters in all the temperatures, with exception that after differentiation (95 dph) the expression was very low in the fish (already immature juveniles) reared at 31 °C, with exception of one sample (Fig. 2). In contrast, *foxl2* did not display temperature or age regulation from 35 to 95 dph, except for one fish, in which it was upregulated at 28 °C at 95 dph. The same individual also displayed high *amh* expression and low *wt1b* and *ar* transcriptions, i.e., mostly likely it was a developing female.

The expression of the genes involved in the male development displayed a later regulation. *wt1b* and *ar* mRNA were detected at baseline levels in all larvae with no changes related to temperature up to 35 dph, when at 28 °C two out of six fish showed upregulation of *wt1b* and at 31 °C half of the group presented *ar* upregulated. Soon after the morphological gonad differentiation (65 dph), the expression of *wt1b* and *ar* were divided into two groups at 31 °C, probably biased in favour of the males. *wt1b* and *ar* mRNAs were regulated in immature juveniles (95 dph) as different individuals presented different relative expression values, without any temperature effect on these transcriptional levels (Fig. 2).

Table 3 Sex ratio of tambaqui *Colossoma macropomum* in the experiment

Temperature	Male		Female		p value (χ^2 considering 1:1)
	N	%	N	%	
26 °C	43	46.7	49	53.3	0.620
28 °C	43	50.0	43	50.0	1.000
31 °C	41	44.1	52	55.9	0.300
Total	127	-	144	-	-

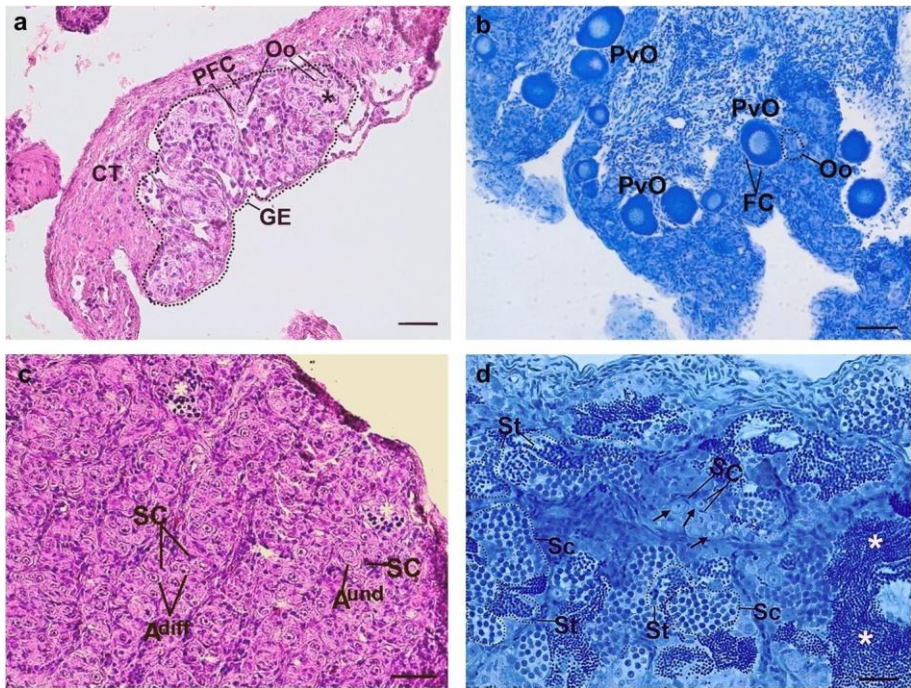


Fig. 3 Section (5 μ m) of *Colossoma macropomum* gonads. **a** and **b**) immature ovary; **c**) immature testis; **d**) testis in initial maturation; Black asterisk shows nest of oogonia. White asterisk shows spermatozoa. CT: connective tissue; GE: germinal epithelium; PFC: prefollicular cell; Oo: ovogonia; PvO: pre-vitellogenic oocytes; FC: follicular cell; Aund: type A undifferentiated spermatogonia; Adiff: type A differentiated spermatogonia; SC: Sertoli cell; Sc: spermatocyte; St: spermatid. The scale bar represents 25 μ m

Survival, sex ratio and gonad morphology

The survival ratio at the end of the study was similar in all groups and ranged from 75.7 to 81.6%. The sex of 271 (86 to 93/treatment) juveniles was histologically identified at 11 months old, and the sex ratio was similar in all groups. Table 3 shows the number and percentage of males and females in each group.

No relevant difference was observed in the gonadal parenchyma of fish at 11 months of age in all groups. The females presented immature ovaries (Fig. 3a and b). Some ovaries

were characterized by the presence of nests of oogonia surrounded by pre-follicular cells in the germinal epithelium; the majority (74%) were characterized by the onset of meiosis with the individualization of pre-vitellogenic oocytes surrounded by follicular cells. Males had testis in two stages, immature or at the beginning of maturation (Fig. 3c and d); a small number of males had testes with germinal epithelium containing cysts of undifferentiated and differentiated type A spermatogonia. Most males (72%) had maturing testis, characterized by the presence of cysts of spermatocytes, spermatids and some free spermatozoa in the lumen of the tubules.

Discussion

Tambaqui is traditionally the main source of animal protein in the north of Brazil and northern-neighbouring countries. Additionally, it is farmed as pure or in the formation of interspecific hybrids, being important for the native aquaculture industry (Hilsdorf et al. 2022). A possible sex ratio susceptibility of this species to different water temperatures represents a risk in the face of global climate changes. Besides, knowing the forces that drive sex differentiation in a farmed species is always fundamental for the development of new technologies based on sex manipulation to increase production at harvest. The sensitivity of tambaqui to thermal variations, particularly in its reproduction, growth, metabolism, and physiology was reviewed by Amanajás and Val (2022), and shows that the species grows and seems to regulate its metabolism more effectively between 25 and 32 °C. In an effort to fully characterize the system of sex determination of tambaqui, in this study we raised undifferentiated larvae at three different temperatures, two of them being the extremes tolerated by the species at larval stage, during sex differentiation, i.e., up to 3 months of age. As *Colossoma macropomum* forms a single large panmictic population over the broadrange in the Amazon basin of Brazil, Bolivia, and Peru (Farias et al. 2010) and the breeding stocks and wild populations display similar genetic diversity (Aguiar et al. 2013), we performed our study using a single population, assuming that there are no subpopulations nor family differences on the sex determination or sex sensitivity to temperature in tambaqui, as seen in other worldwide distributed species such as tilapia (Baroiller et al. 2009) and zebrafish (Valdivieso et al. 2022). The results show that water temperature does not influence tambaqui sex ratio, which exhibited the proportion of 1:1 at all temperatures analysed, which is also similar to that found in wild populations (Villacorta-Correa and Saint-Paul 1999). Hence a possible gene dose effect for environmentally induced sex reversal (Quinn et al. 2007) can be ruled out since the larvae would not survive at higher temperatures. Furthermore, they are within the temperature range of thermal comfort and the natural environment of the species. Similarly, tambaqui sex ratio is not changed by water pH (Morais et al. 2020). A possible environmental susceptibility could lead to changes in the gene pathway culminating in switches on the phenotypic sex of the fish (Fernandino et al. 2013). Instead, our results reinforce the monofactorial sex determination system hypothesis in tambaqui, where the single or strongly (inter)linked genetic factors located on a single chromosome overlap the environmental factor temperature in gonadal differentiation and consequently indicates a genetic sex termination (GSD; Devlin and Nagahama 2002). Although chromosomal dimorphism between tambaqui males and females has not been identified by karyotype (Nakayama et al. 2012), there is still the possibility of the presence of homomorphic sex chromosomes similar to autosomes.

In tambaqui *foxl2* and *amh* are upregulated in pre-differentiating females, while *wt1b* and *ar* are more expressed by the future males (Lobo et al. 2020). Hence, we analysed the expression of these genes in the present study to investigate a possible transcription regulation by water temperature. *foxl2*, *amh*, *ar* and *wt1b* were detected from undifferentiated larvae to immature juvenile tambaqui (from 20 to 95 dph). Surprisingly, only *foxl2* showed a thermo-sensitive expression before sex differentiation (20 dph), when transcription decreased from the lowest to the highest temperature before the onset of tambaqui morphological sex differentiation. The *foxl2* gene belongs to the female pathway and promotes ovarian development by upregulating *cyp19a1a* expression, the key enzyme involved in the synthesis of estrogens, increasing germ cell number, and repressing male pathway gene expression (Zhang et al. 2017). In teleosts, *foxl2* transcription can be thermosensitive and downregulated at high temperatures, such as in olive sole GSD/TE *Paralichthys olivaceus*, whose expression of *foxl2* is repressed during masculinization at high temperature (Fan et al. 2019) and bluegill *Lepomis macrochirus* that prior to sexual differentiation the expression of *foxl2* was also repressed at higher temperature, however there was no significant difference in sex ratio (Shenet et al. 2018). Recently, it was discovered that high water temperature also decreases *foxl2* expression in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* (Liu et al. 2022). However, the effects on sex change are controversial and species-specific (Yamaguchi et al. 2010; Yamaguchi and Kitano 2012; Shen et al. 2018). In this study, the effect of temperature on *foxl2* expression follows that observed in other teleosts, i.e., downregulation at higher temperatures. However, this effect was not sufficient to affect ovary differentiation, as the sex ratio was not altered. A similar response was recently observed in juvenile tambaqui treated with anti-estradiol compounds; the treatments influenced gene expression (including *cyp19a1a*) and reduced E2 plasma levels without changing sex ratio (Paixão et al. 2022). This result strengthens the hypothesis of a strict genetic sex determination of the species. On the other hand, it must be further investigated if the role of *foxl2* does not involve TSD in tambaqui as it does in other species. Furthermore, in contrast to the most species studied to date, *foxl2* transcription profile seems not to be positively correlated with *cyp19a1a* in tambaqui, as its transcription was identified by real-time quantitative PCR (qPCR) during the early stages of sex development that increased in fishes with 2 to 4 cm with an important inter-individual variability (Paixão et al. 2022). The unexpected expression of genes related to ovarian differentiation have been reported, especially in characids, such as *Astyanax mexicanus* in which none of the ovarian differentiation genes, i.e., *foxl2a*, *cyp19a1a*, and *wnt4b* displayed an early sexually dimorphic expression (Imarazene et al. 2021). Controversial findings have also been reported in cyprinids, such as in *Acrossocheilus fasciatus* where the level of *foxl2* expression was significantly lower in females during the sex determination period, which in this species is very long and late from 4 to 12 months (Ren et al. 2023).

All four genes analysed here presented a bimodal expression either before (mostly the female-bias *amh* and *foxl2*), during, or after sex differentiation (only male-bias genes *wt1b* and *ar*). At 20 dph the expression of *amh* was high and displayed into two clusters. This was more pronounced in the group with the longest body length (mean of 23 mm) reared at 31 °C. On the other hand, at 65 dph when mean fish length was from 45 to 48 mm, both *wt1b* and *ar* were highly expressed in average, but with some individuals showing high other low transcription, which can be interpreted as sex-biased expression favouring the males. This is in agreement with the length of sex differentiation of the species, as ovaries differentiate earlier at approximately 40 mm of total length, while testis remains as undifferentiated gonads until later on (Lobo et al. 2020).

In three months, old immature juveniles, only *wt1b* and *ar* showed bimodal expression profiles. *amh* and *foxl2* transcriptions were almost null, except for one fish that presented very high relative expression of both genes. The fact that only testis-supporting genes remained upregulated in these juveniles suggests that their role is not restricted during male differentiation, but also crucial for testis maintenance. Similarly, during sex differentiation of the Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* *ar* expression was relatively late (Zhang et al. 2022). In mammals *wt1* is essential for the development of the urogenital system (Gao et al. 2014). In teleost fish two paralogs have been identified, namely *wt1a* and *wt1b*, as being involved in the maintenance of primordial germ cells, regulatory mechanisms at differentiation and maintenance of the gonads, but not in sex determination (Perner et al. 2007; Jiang et al. 2017). The expression of *wt1b* in tambaqui juvenile trunks was marked by high values in fish of 45 to 48 mm standard length, i.e., just after the beginning of sex differentiation. Similar results were found for trunks of juveniles and adult males of the African cichlid *Astatotilapia burtoni* (Böhne et al. 2013; Heule et al. 2014) and in males of yellow croaker *Larimichthys crocea* (Xiao et al. 2019), suggesting that *wt1b* is an important gene not only for the testis development, but also maintenance.

The present study revealed a peculiar expression profile of *vasa* in trunks of juveniles before and after the window of gonadal differentiation. In all four samplings, there were always individuals with low *vasa* expression while others presented high relative transcription values. From 20 to 35 dph, coinciding with the period of gonadal differentiation in the species, that starts at 40 mm standard length (Lobo et al. 2020), the *vasa* expression increased up to three fold in some fish, while it remained low in others. After this period, the expression persisted increasing in some and low in others, even when differentiation was completed (95 dph). In teleost, the female differentiation occurs first than that in males, and ovarian differentiation is generally marked by a higher number of germ cells (Kobayashi et al. 2000; Xu et al. 2005; Imarazene et al. 2021). Hence, the clear variability on *vasa* expression among individuals can be associated with the sex dimorphic number of germ cells in tambaqui. *Vasa* is essential for the development of the germline in vertebrates and invertebrates (Begum et al. 2022), and *vasa* expression is restricted to gonads (Vas-concelos et al. 2019). Although temperature did not produce any significant effect on *vasa* transcript abundance, the increase from 20 to 95 dph was more accentuated in fish reared at 31 °C compared to 26 and 28 °C. This result disagrees from those obtained for tilapia *Oreochromis niloticus* and pufferfish *Takifugu rubripes* in which higher temperatures induced germ cell degeneration and masculinization of ovarian somatic cells (Lee et al. 2009; Pandit et al. 2015). However, in turtle *Mauremys mutica* the level of *vasa* mRNA in female-producing temperature (FPT) embryos at 33 °C was significantly higher than that of male-producing temperature (MPT) embryos at 25 °C (Liu et al. 2021). In the bluegill *Lepomis macrochirus*, thermal stress delayed proliferation and reduced numbers of germ cells in the low-temperature treatment (17 °C) and morphological sex differentiation had not been detected up to 97 dph (Shen et al. 2018). In this study, the expression of *vasa* at the lowest temperature treatment (26 °C) exhibited a similar pattern to 28 and 31 °C from 20 to 65 dph, but with a decrease at 95 dph.

In conclusion, our results showed that tambaqui sexual development was not sensitive to temperature, in spite of an early disturbance in *foxl2* transcription (downregulated by higher temperature). Although some regulation can be observed in the expression of *amh*, *wt1*, *foxl2* and *ar* in all treated groups, this seems to be more related to the genetic sex of each individual than to temperature. While the female-bias genes are expressed earlier (before morphological sex differentiation), the male-bias genes are upregulated later and seems to be required for testis maintenance. As TSD species can be threatened

by scenarios of climate change, our results strongly reinforce the idea that tambaqui present a strict genetic sex determination system, which, on the other hand, can facilitate the development of efficient techniques to produce monosex population of the species.

Author contributions Vanessa Ribeiro Reis performed the investigation, analysed, and interpreted the data, and wrote the article. Rômulo Veiga Paixão analysed the data and wrote the article. Iraní da Silva de Moraes and Izabel Correa Bandeira were responsible for data collection and technical support in the lab. Adalberto Luís Val provided resources, infrastructure, and technical support to carry out the experiment, and review and comment the manuscript. Gilvan Ferreira da Silva conceived and supervised the study, was responsible for conceptual advice, review and editing of the article and Fernanda Loureiro de Almeida O’Sullivan was responsible for conceptualization, supervision, funding acquisition, project administration, resources, data curation, writing - review and editing.

Funding This work was financially supported by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) (SEG 12.16.05.018.00.01.00), INCT ADAPTA (465540/2014-7) / FAPEAM (062.1187/2017) / CAPES (finance code 001) and supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) with a scholarship for Vanessa Ribeiro Reis.

Data Availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Declarations

Ethics approval All procedures of this work comply with the ethical of animal experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and were approved by the Local Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – of the Brazilian Institute for Research of the Amazon – INPA (nº 014/2017). The project has an Authorization of Access to Genetic Heritage under register A5784B5.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Aguiar J, Schneider H, Gomes F et al (2013) Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. *An Acad Bras Ciênc* 85(04):1439–1447. <https://doi.org/10.1590/0001-376520130007>
- Almeida FL, Lopes JS, Crescencio R 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.2015.10.031>
- Amanajás RD, Val AL (2022) Thermal biology of tambaqui (*Colossoma macropomum*): General insights for aquaculture in a changing world. *Rev Aquac* 15:380–390. <https://doi.org/10.1111/raq.12732>
- Araújo-Lima C, GOULDING M (1988) Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. CNPq / Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Brasília/Tefe
- Baroiller JF, D’Cotta H, Bezault E, Wessels S, Hoerstgen-Schwark G (2009) Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comp Biochem Physiol Part A* 153:30–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>
- Begum S, Gnanasree SM, Anusha N, Senthilkumaran B (2022) Germ cell markers in fishes - a review. *Aquac Fish* 7:540–552. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2022.03.015>
- Böhne A, Heule C, Boileau N, Salzburger W (2013) Expression and sequence evolution of aromatase *cyp19a1* and other sexual development genes in east African cichlid fishes. *Mol Biol Evol* 30:2268–2285. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst124>
- de Moraes IS, Reis VR, de Almeida FL (2020) The influence of the water pH on the sex ratio of tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Aquac Rep* 17:100334. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100334>
- Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)

- Fan Z, Zou Y, Liang D et al (2019) Roles of forkhead box protein L2 (*foxl2*) during gonad differentiation and maintenance in a fish, the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Reprod Fertil Dev* 31:1742–1752. <https://doi.org/10.1071/RD18233>
- Farias IP, Torrico JP, García-Dávila C et al (2010) Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Mol Phylogenet Evol* 56(3):1129–1135. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.028>
- Fernandino JI, Hattori RS, Kishii A et al (2012) The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology* 153:6003–6011. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1517>
- Fernandino JI, Hattori RS, Moreno Acosta OD et al (2013) Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. *Gen Comp Endocrinol* 192:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.024>
- Gao F, Zhang J, Wang X et al (2014) *Wtl* functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation. *Hum Mol Genet* 23:333–341. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt423>
- Geffroy B, Besson M, Sánchez-Baizán N et al (2021) Unraveling the genotype by environment interaction in a thermosensitive fish with a polygenic sex determination system. *Proc Natl Acad Sci* 118(50):e2112660118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112660118>
- Hartung O, Forbes MM, Marlow FL (2014) Zebrafish *vasa* is required for germ-cell differentiation and maintenance. *Mol Reprod Dev* 81:946–961. <https://doi.org/10.1002/mrd.22414>
- Hay B, Yeh Jan L, Nung Jan Y (1990) Localization of *vasa*, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* 109(2):425–433. <https://doi.org/10.1242/dev.109.2.425>
- Heule C, Göppert C, Salzburger W, Böhne A (2014) Genetics and timing of sex determination in the east african cichlid fish *Astatotilapia burtoni* *BMC Genet* 15(1):1–17. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0140-5>
- Hilsdorf AWS, Hallerman E, Valladão GMR et al (2022) The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: from amazonian waters to sustainable production. *Rev Aquac* 14:993–1027. <https://doi.org/10.1111/raq.12638>
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021) Produção da Pecuária Municipal 2021. Rio de Janeiro
- Imarazene B, Beille S, Jouanno E et al (2021) Primordial germ cell Migration and histological and molecular characterization of gonadal differentiation in Pachón Cavefish *Astyanax mexicanus* *Sex Dev* 14:80–98. <https://doi.org/10.1159/000513378>
- Jiang D, Chen J, Fan Z et al (2017) CRISPR/Cas9-induced disruption of *wtl1a* and *wtl1b* reveals their different roles in kidney and gonad development in Nile tilapia. *Dev Biol* 428:63–73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.017>
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y (2000) Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus* *Mech Dev* 99:139–142. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00464-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00464-0)
- Kossack ME, Draper BW (2019) Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). In: Capel B (ed) *Sex Determination in Vertebrates*, pp 119–149
- Lee KH, Yamaguchi A, Rashid H et al (2009) Germ cell degeneration in high-temperature treated pufferfish, *Takifugu rubripes* *Sex Dev* 3:225–232. <https://doi.org/10.1159/000228723>
- Liu X, Zhu Y, Zhao Y et al (2021) *Vasa* expression is associated with sex differentiation in the asian yellow pond turtle, *Mauremys mutica* *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 336:431–442. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23064>
- Liu T, Li R, Liu L et al (2022) The Effect of temperature on gonadal sex differentiation of Yesso Scallop *Patinopecten yessoensis* *Front Cell Dev Biol* 9:3850. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.803046>
- Lobo IKC, do Nascimento AR, Yamagishi MEB et al (2020) Transcriptome of tambaqui *Colossoma macropomum* during gonad differentiation: different molecular signals leading to sex identity. *Genomics* 112:2478–2488. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.022>
- Martínez P, Viñas AM, Sánchez L et al (2014) Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture. *Front Genet* 5:340. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00340>
- Miyoshi K, Hattori RS, Strüssmann CA et al (2020) Phenotypic/genotypic sex mismatches and temperature-dependent sex determination in a wild population of an Old World atherinid, the cobaltcap silverside *Hypoatherina tsurugae* *Mol Ecol* 29:2349–2358. <https://doi.org/10.1111/mec.15490>
- Nagahama Y, Chakraborty T, Paul-Prasanth B et al (2021) Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiol Rev* 101:1237–1308. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2019>
- Nakayama CM, Feldberg E, Antonio L, Bertollo C (2012) Karyotype differentiation and cytotoxic considerations in species of Serrasalminae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyol* 10:53–58. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252012000100005>

- Nascimento AR, Silva GF, Gualberto GF, Almeida FL (2016) Validation of reference genes for real-time quantitative PCR in tambaqui (*Colossoma macropomum*). Genet Mol Res 15(4):gmr15049228. <https://doi.org/10.4238/gmr15049228>
- Ospina-Álvarez N, Piferrer F (2008) Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. PLoS ONE 3(7):e2837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002837>
- Paixão RV, Silva GF, Caetano AR et al (2022) Phylogenomic and expression analysis of *Colossoma macropomum cyp19a1a* and *cyp19a1b* and their non-classical role in tambaqui sex differentiation. Gene 843:146795. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146795>
- Pandit NP, Bhandari RK, Kobayashi Y, Nakamura M (2015) High temperature-induced sterility in the female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Gen Comp Endocrinol 213:110–117. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.028>
- Perner B, Englert C, Bollig F (2007) The Wilms tumor genes *wt1a* and *wt1b* control different steps during formation of the zebrafish pronephros. Dev Biol 309:87–96. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.06.022>
- Qu L, Wu X, Liu M et al (2020) Identification and characterization of germ cell genes *vasa* and *dazl* in a protogynous hermaphrodite fish, orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Gene Expr Patterns 35:119095. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2020.119095>
- Quinn AE, Georges A, Sarre SD et al (2007) Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. Science 316(5823):411–411. <https://doi.org/10.1126/science.1135925>
- Ren Y, Mu Y, Zhao B et al (2023) *dmrt3*, *nom1*, *abce1*, and *pkmyt1* play key roles in gonadal sex determination in *Acrossocheilus fasciatus*. Aquaculture International 31:317–332. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00976-7>
- Sarre SD, Georges A, Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. BioEssays 26:639–645. <https://doi.org/10.1002/bies.20050>
- Shao C, Li Q, Chen S et al (2014) Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. Genome Res 24:604–615. <https://doi.org/10.1101/gr.162172.113>
- Shen ZG, Wang HP (2014) Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in Teleost fish. Genet Selection Evol 46(1):26. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-26>
- Shen Z-G, Wang H-P (2018) Environmental sex determination and sex differentiation in Teleosts - How sex is established. In: Sex control in aquaculture, pp 85–115
- Shen ZG, Eissa N, Yao H et al (2018) Effects of temperature on the expression of two ovarian differentiation-related genes *foxl2* and *cyp19a1a*. Front Physiol 9:1208. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01208>
- Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T et al (2000) The *vasa-like* gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes* Dev Growth Differ 42:317–326. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.2000.00521.x>
- St. Louis TJ, Pedroza Filho MX, Flores RMV (2022) Consumption frequencies, determinants, and habits of aquaculture species in Brazil. Aquacult Int 30:919–936. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00838-2>
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R et al (2000) The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. Genes Dev 14:841–853. <https://doi.org/10.1101/gad.14.7.841>
- Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW et al (2010) Control of puberty in farmed fish. Gen Comp Endocrinol 165:483–515. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.004>
- Valdivieso A, Wilson CA, Amores A et al (2022) Environmentally-induced sex reversal in fish with chromosomal vs. polygenic sex determination. Environ Res 213:113549. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113549>
- Valenzuela N (2008) Sexual development and the evolution of sex determination. Sex Dev 2:64–72. <https://doi.org/10.1159/000129691>
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? Am Nat 161:676–683. <https://doi.org/10.1086/368292>
- Varela ES, Bekaert M, Ganeco-Kirschnik LN et al (2021) A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum* BMC Genomics 22(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08037-8>
- Vasconcelos ACN, Streit DP, Octavera A et al (2019) Isolation and characterization of a germ cell marker in teleost fish *Colossoma macropomum* Gene 683:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.027>
- Villacorta-Correa MA, Saint-Paul U (1999) Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. Rev Bras Biol 59:637–652. <https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000400013>
- Xiao J, Cao K, Zou Y et al (2019) Sex-biased gene discovery from the gonadal transcriptomes of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Aquac Fish 4:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.01.001>
- Xu H, Gui J, Hong Y (2005) Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing

- vertebrate. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 233(3):872–882. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20410>
- Yamaguchi T, Kitano T (2012) High temperature induces *cyp26b1* mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder. *Biochem Biophys Res Commun* 419:287–292. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.012>
- Yamaguchi T, Yoshinaga N, Yazawa T et al (2010) Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* 151:3900–3908. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0228>
- Yang X, Chen D, Zheng S et al (2023) The Prmt5-Vasa module is essential for spermatogenesis in *Bombyx mori*. *PLoS Genet* 19:e1010600. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010600>
- Zhang X, Li M, Ma H et al (2017) Mutation of *foxl2* or *cyp19a1a* results in female to male sex reversal in XX Nile tilapia. *Endocrinology* 158:2634–2647. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00127>
- Zhang X, Wu W, Zhou J et al (2022) MiR-34b/c play a role in early sex differentiation of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Front Zool* 19(1):23. <https://doi.org/10.1186/s12983-022-00469-6>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

CAPÍTULO II

Mapeamento e identificação de SNPs associados ao sexo em tambaqui *Colossoma macropomum*

Identificação e mapeamento de SNPs associados ao sexo em tambaqui *Colossoma macropomum*

Vanessa Ribeiro Reis¹, Carolina Heloisa de Souza Borges², Yann Guiguen³, Diogo Teruo Hashimoto², Gilvan Ferreira Silva^{1,4}, Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan⁴

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil

²Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, Brasil

³Research for Agriculture, Food and Environment, INRAE, LPGP, Rennes, França

⁴Embrapa Amazônia Ocidental, Amazonas, Brasil

Autor para correspondência: fernanda.almeida@embrapa.br

Resumo

A compreensão dos mecanismos de desenvolvimento do sexo nos peixes contribui para o entendimento sobre a evolução da determinação do sexo nos vertebrados, e lança luz sobre a aquicultura. Uma grande variedade de sistemas de determinação sexual (DS) já foi relatada para Teleosteos. Ainda assim, especialmente em espécies não modelo a DS permanece total ou parcialmente desconhecida. É nesse cenário que se encontram os estudos sobre o mecanismo determinante do sexo em tambaqui *Colossoma macropomum*. Essa espécie é nativa da Bacia Amazônica, culturalmente importante para a população do Norte do Brasil e principal espécie da piscicultura nativa do país. Utilizando a abordagem de sequenciamento do genoma completo de pools (pool-seq) de machos e fêmeas separadamente, identificamos e mapeamos regiões e polimorfismos associados ao sexo em tambaqui. Encontramos cinco regiões com alta densidade de polimorfismo de um único nucleotídeo (single nucleotide polymorphism, SNP) com tendência masculina. O mais elevado número de SNPs (~2.500) foi encontrado em uma região dos machos, não inserida (*unplaced*) em nenhum dos LGs montados a nível cromossômico ancorados ao genoma de referência, que é de uma fêmea. Nas fêmeas, duas regiões com picos de SNPs foram identificadas, a mais expressiva (~ 2.200 SNPs) inserida no final do LG 6. Análises comparativas das reads genômicas de machos e fêmeas apontaram duas pequenas regiões, LG2 (10kb) e LG23 (15Kb), com média/alta

cobertura em machos e baixa/nenhuma cobertura nas fêmeas. Para investigar candidatos a gene master de determinação sexual, abrimos uma janela ampla, 1 Mb a jusante e a montante deste ponto específico. Foram anotados 53 genes, entretanto não foi encontrado nenhum gene clássico de determinação sexual já relatado em peixes teleósteos nesta região. Fica implícito que, em tambaqui, um gene inusitado (de vias não envolvidas na reprodução) pode ter evoluído como o principal determinante do sexo. Esse estudo contribui para o entendimento dos aspectos moleculares sobre a determinação do sexo em *C. macropomum* e suas aplicações na aquicultura Neo-tropical.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, pool-sequencing, determinação do sexo, região associada ao sexo, SNPs associados ao sexo.

Introdução

O sexo em vertebrados é determinado por uma rede gênica hierárquica e é considerado um dos processos mais variáveis da evolução (Chen et al., 2022). Os mecanismos de determinação do sexo em peixes são diversos e complexos, variando de um rigoroso controle genético (genetic sex determination, GSD) a um controle ambiental (environmental sex determination, ESD), ou ainda, a ação conjunta de ambos (GSD + ESD) (Baroiller et al., 2009; Rajendiran et al., 2021). Essa plasticidade na determinação sexual (sex determination, SD) em teleósteos os torna modelos interessantes para estudar a evolução de SD em vertebrados (Wen et al., 2023). Além disso, estudos sobre a determinação sexual em teleósteos têm aplicações comerciais para a piscicultura devido ao dimorfismo sexual para muitas características econômicas como, por exemplo, a taxa de crescimento em peixes de corte e a coloração corporal em espécies ornamentais (Mei & Gui, 2015). Apesar de comumente existir dimorfismo sexual em características fenotípicas, os cromossomos sexuais na maioria dos peixes são homomórficos e indistinguíveis por análises citológicas (Chen et al., 2022).

A identificação de sexo a partir de dados genéticos é cada vez mais importante à medida que os pesquisadores buscam reduzir impactos do monitoramento científico de populações selvagens ou substituir métodos indiretos de sexagem (Trenkel et al., 2020). Regiões específicas ligadas ao sexo e marcadores de DNA específicos do sexo já desenvolvidos em várias espécies de peixes foram baseados principalmente em mutações de inserção/deleção (insertion/deletion, indels) e polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism, SNP) (Li et al., 2022). O advento das tecnologias de sequenciamento e

genotipagem de alto rendimento permite a comparação de padrões de polimorfismos em um número muito grande de marcadores. Embora a caracterização da estrutura genética a partir de dados individuais de sequenciamento permaneça cara para muitas espécies não-modelo, o sequenciamento de pools de DNAs (genome pool-sequencing, Pool-seq) representa uma alternativa atraente e econômica (Hivert et al., 2018). Em peixes, investigações recentes por meio de Pool-seq identificaram regiões genômicas diferenciadas entre os sexos e até mesmo master genes determinantes do sexo (Wen et al., 2020, 2022a, 2023; Ferrareso et al., 2021; Pan et al., 2021; Kuhl et al., 2021)

O tambaqui *Colossoma macropomum*, descrito por George Cuvier em 1818, pertence à ordem Characiformes, família Serrasalminidae (Araújo-Lima & Goulding, 1988). Na última década consolidou-se como a espécie de peixe nativa mais produzida no Brasil (IBGE, 2021). Foi introduzido para fins de cultivo ou até mesmo por fugas acidentais em diversos países, como EUA, China, Indonésia, Mianmar, Malásia, Vietnã, Cingapura e Taiwan (Fao, 2017; Nico & Neilson, 2018).

Na natureza ou em cultivo, o tambaqui apresenta dimorfismo sexual de crescimento; as fêmeas atingem tamanhos maiores que os machos (Villacorta- Correa, et al., 1999; Almeida et al., 2016). Assim, o estabelecimento de populações monossexo de fêmeas aumentaria a produtividade dessa cadeia. Estudos recentes apontam que esta espécie possui um rigoroso controle genético de determinação do sexo (Morais et al., 2020; Paixão et al., 2022; Reis et al., 2023). Além disso, regiões genômicas associadas ao sexo foram recentemente identificadas, sugerindo a presença de um sistema monogamico feminino (XX) (Varela et al., 2021). Entretanto, diversos aspectos sobre os mecanismos genéticos envolvidos no estabelecimento dos fenótipos feminino e masculino ainda precisam ser esclarecidos para a total elucidação da determinação sexual em tambaqui.

No presente estudo, usamos a abordagem de Pool-seq para identificar variações genéticas ligadas ao sexo em tambaqui, aproveitando o recente genoma montado da espécie (Hilsdorf et al., 2021).

Material e métodos

Amostragem de peixes

Os peixes usados neste experimento são de diferentes cidades do estado do Amazonas, discriminadas na Tabela 1. O sexo fenotípico de 30 machos e 30 fêmeas foi identificado

através de: i) observação de características macroscópicas de ovário ou testículo, sendo que ovários foram identificados por serem volumosos, com vasos sanguíneos bem evidentes e oócitos individuais perceptíveis a olho nu, e os testículos por serem grandes, firmes, opacos e lisos; ii) histologia de fragmento gonadal, para isso foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas e incluídas em parafina ou metacrilato para histologia, conforme procedimentos de rotina. As análises microscópicas foram realizadas usando o sistema integrado de microscopia óptica Zeiss Axio Imager 2; iii) observação de desova ou espermição, nesse caso a coleta de fragmento de barbatana ocorreu no momento da reprodução artificial de tambaquis em cativeiro. Os fragmentos de barbatanas foram armazenados em etanol 95% até a extração do DNA genômico (gDNA).

TABELA 1 Métodos de sexagem e origem das amostras de *C. macropomum*.

Origem	Método de sexagem	Fêmeas	Machos
Rodovia BR 174 Km 26 Manaus, Amazonas, Brasil	Histologia	2	4
Rodovia AM 270, Km 82, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil	Desova ou Espermição	10	8
	Histologia	6	10
Boa Vista, Roraima, Brasil	Características macroscópicas de ovário ou testículo	9	3
Rodovia AM 010, km 29, Manaus, Amazonas, Brasil	Espermição	3	5
	Total	30	30

Extração de DNA genômico

O gDNA de fragmentos de barbatanas foi extraído individualmente e em rodadas distintas para as 30 fêmeas e os 30 machos fenotípicos, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, AM. Para a extração, foi utilizado o Kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System® (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e quantidade de DNA foram mensuradas usando o NanoDrop (Thermo) e Qubit3 (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectivamente, e a integridade avaliada em

gel de agarose de 1%. O gDNA de cada indivíduo foi normalizado para atingir a concentração equimolar de 60 ng/ μ L. Os gDNA normalizados foram então agrupados de acordo com o sexo para produzir pools de gDNA equimolares de machos e fêmeas.

Sequenciamento do genoma completo de pool (Pool-seq)

A construção das bibliotecas e o sequenciamento foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Genômica de Peixes (Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons, LPGP) do Instituto Nacional de Pesquisas Agropecuárias, Alimentares e Ambientais da França (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, INRAE), usando uma plataforma Illumina NovaSeq 150 bp PE. As bibliotecas Pool-seq (pool masculino e pool feminino) foram construídas usando o Kit Illumina TruSeq Nano DNA HT Library Prep (Illumina, San Diego, CA), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, 200 ng de gDNA de cada amostra (pool masculino e pool feminino) foi sonicada usando um Bioruptor (Diagenode, Liège, Bélgica). O gDNA sonicado foi selecionado por tamanho por filtragem com beads magnéticas para um tamanho de inserto de 550 bp e adenilado em suas extremidades 3'. O gDNA adenilado foi ligado aos adaptadores específicos da Illumina e, após purificação por beads magnéticas, foi amplificado em uma PCR de 8 ciclos. As bibliotecas foram verificadas em um Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc., Ankeny, IA). As bibliotecas foram novamente purificadas usando beads magnéticas, verificadas em um Fragment Analyzer (Agilent) usando o kit HS NGS Fragment (DNF-474-33) e quantificadas por qPCR usando o kit de quantificação KAPA Library (Roche, ref. KK4824). Por fim, foram geradas 2 leituras pareadas de 150 x para os pools masculino e feminino.

Identificação de regiões ligadas ao sexo

Para alinhar as sequências genômicas dos pools de macho e fêmea foi utilizado o genoma de referência da espécie (NCBI RefSeq assembly accession: GCA_904425465.1; Hilsdorf et al., 2021) em nível cromossômico (Ariede et al., 2022). Para isso, foi utilizado o programa BWA-MEM versão 0.7.17 (Li & Durbin, 2009), com parâmetros padrões. Em cada arquivo BAM resultante do alinhamento ao genoma, as sequências foram classificadas, agrupadas e mescladas, e tiveram duplicadas de PCR removidas usando a ferramenta Picard versão 2.18.2 (<http://broadinstitute.github.io/picard>). O samtools mpileup versão 1.8 (LI et al.,

2009) foi usado para gerar um arquivo *pileup* combinando os dois arquivos BAM, usando o parâmetro qualidade de alinhamento por base desativada (-B). Um arquivo *sync* contendo a composição de nucleotídeos em cada pool para cada posição na referência foi gerado a partir do arquivo *pileup* usando o popoolation mpileup2sync versão 1.201 (KOFLEER et al., 2011) com uma qualidade mínima de 20 (--min-qual 20). Com este arquivo *sync* o índice de fixação (F_{ST}), os SNPs e a cobertura entre os dois sexos em todas as posições de referência foram calculados em uma janela de 50 kb com um *output* a cada 1.000 bp para identificar regiões enriquecidas com SNPs específicos do sexo. Os gráficos foram construídos com os pacotes R sgtr (<https://github.com/SexGenomicsToolkit/sgtr>).

As reads Illumina dos pool masculino e feminino foram inspecionadas visualmente pelo Integrative Genomics Viewer (IGV), tendo como referência uma montagem do genoma a nível cromossômico (Hilsdorf et al., 2021; Ariede et al., 2022). Foram procuradas inserções ou exclusões curtas, caracterizadas por uma cobertura por read alta em um sexo e nenhuma ou pouquíssimas reads no sexo oposto. E ainda para identificar os genes presentes nessas regiões, abriu-se uma janela de 1 Mb a jusante e a montante de cada ponto específico, as sequências foram blastadas contra o genoma de referência (Hilsdorf et al., 2021).

Resultados

Sequenciamento de pool do genoma completo (Pool-seq)

Após a remoção de duplicatas e sequências com baixa qualidade de alinhamento, obteve-se 11,9 Gb do pool de gDNA de fêmeas e 7,54 Gb do pool de gDNA de machos. Como as sequências de gDNA foram organizadas a partir da montagem de um mapa de ligação em nível cromossômico (Ariede et al. 2022), as que não foram agrupadas em nenhum grupo de ligação (linkage group, LG) foram classificadas como “*unplaced*”. A equivalência entre a identificação (identity, ID) dessas regiões no mapa de ligação em nível de cromossomo (Ariede et al., 2022) e o ID dos scaffolds do genoma (Hilsdorf et al., 2021) (dos picos mais relevantes na Figura 1) são apresentados na Tabela S1.

Identificação de regiões ligadas ao sexo

A análise da distribuição de SNPs sexo-específicos evidenciou a presença de vários picos, em diferentes LGs, tanto nos machos quanto nas fêmeas (Figura 1). Foram considerados os picos mais significativos aqueles com um número de SNPs sexo-específicos maior que 1.000.

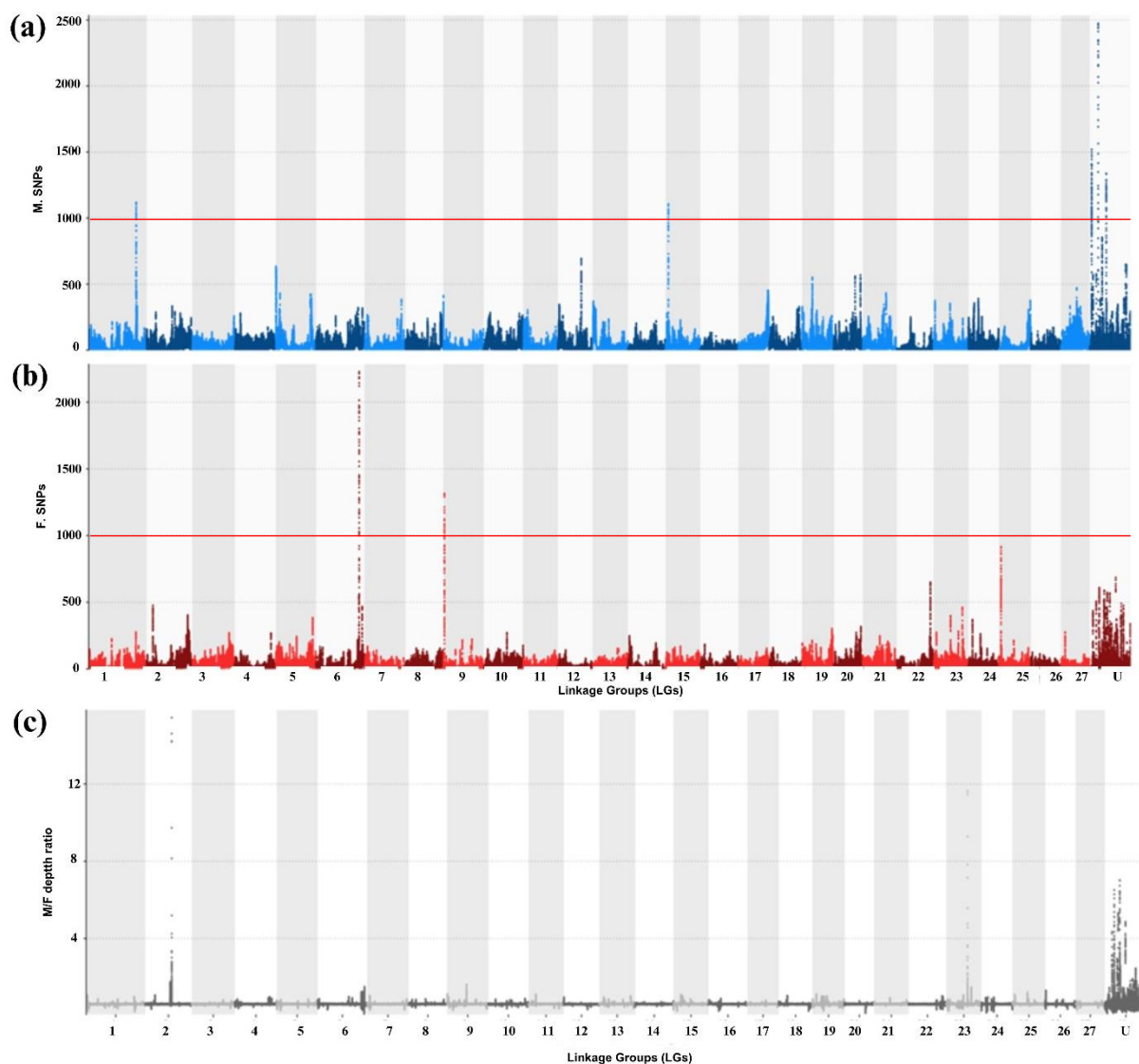


FIGURA 1 Gráficos Manhattan de SNPs-específicos de macho (a) e fêmea (b) e cobertura relativa (cobertura pool machos/ cobertura pool fêmeas) (C). Dados contabilizados através de janelas de 50 kb, com output a cada 1 kb, ao longo dos 27 LG do genoma de *C. macropomum*. Picos acima da linha vermelha são considerados significativos.

Nos machos, o pico mais significativo, com cerca de 2.500 SNPs, foi localizado em uma sequência de gDNA do genoma não inserida em nenhum dos grupos de ligação (*unplaced*), denominado *scaffold* NW_023495272.1. Outros picos também eram *unplaced*, um com ~ 1.500 SNPs, no *scaffold* NW_023495123.1, e outro com ~ 1.300 SNPs, no *scaffold* NW_023495652.1. O *scaffold* NW_023495123.1 apresentou o maior F_{ST} (0,8). Os grupos de ligação 1 e 15 também apresentaram picos significativos, ambos com ~ 1.200 SNPs (Figura 1a). Já nas fêmeas, o pico mais significativo foi localizado no final do LG 6, com ~ 2.200 SNPs. Seguido de um pico no início do LG 9, com ~ 1.300 SNPs. No caso do delas, nenhum pico significativo foi localizado nas sequências *unplaced* (Figura 1b). A visualização e

verificação manual (utilizando o IGV) dessas regiões confirmou o que foi apontado nos gráficos de Manhattan: os LG 6 e 9, apresentaram alta concentração de SNPs específicos de fêmea (Figura 2) e os LGs 1 e 15 (Figura 3), alta concentração de SNPs específicos de macho. A Tabela 2 mostra um resumo da análise dos picos de SNPs sexo-específicos encontrados.

A análise de cobertura relativa (depth do pool machos/ depth do pool fêmeas) mostrou discrepância significativa de cobertura no LG2 e LG23 (Figura 1c), porém não correlacionada aos picos de SNPs sexo-específicos encontrados. A visualização apontou pequenos pontos isolados com uma cobertura média/alta nas reads dos machos, e nenhuma read nas fêmeas (Figura 4). Verificando amplamente a região a jusante e a montante de cada um desses pontos, identificamos 22 genes no LG2 e 28 genes no LG23 (Tabelas 3 e 4).

TABELA 2 Resumo da análise dos picos de SNPs sexo-específicos encontrados, e da análise de cobertura relativa por reads em *C. macropomum*.

Grupo de ligação (LG)	Tamanho (Mb)	<i>Unplaced scaffold</i>	Posição do pico de SNP no LG ou <i>scaffold</i> (Mb)	Atributo	F_{ST}
6	56,806	-	50,266 – 50,312	SNPs específicos de F	0,230
9	47,315	-	1,398 – 1,439	SNPs específicos de F	0,040
1	67,868	-	55,540 – 55,560	SNPs específicos de M	0,170
15	40,359	-	3,187 – 3,198	SNPs específicos de M	0,110
-	0,573	NW_023495123.1	0,194 – 0,200	SNPs específicos de M	0,800*
2	53,234	-	30,316 – 30,370	Ponto isolado em M**	0,002
23	40,660	-	24,462 – 24,514	Ponto isolado em M**	0,490

A letra F significa fêmeas, a letra M significa machos. Um asterisco (*) destaca mais alto F_{ST} encontrado. Dois asteriscos (**) destacam os pontos isolados com uma cobertura por read mediana nos machos, e nenhuma cobertura nas fêmeas.



FIGURA 2 Regiões de interesse com picos significativos de SNPs nas fêmeas, LG6 (a) e LG9 (b). Alinhamento das reads de fêmeas (superior) e machos (inferior). Barras coloridas representam SNPs. Programa Integrative Genomics Viewer (IGV).

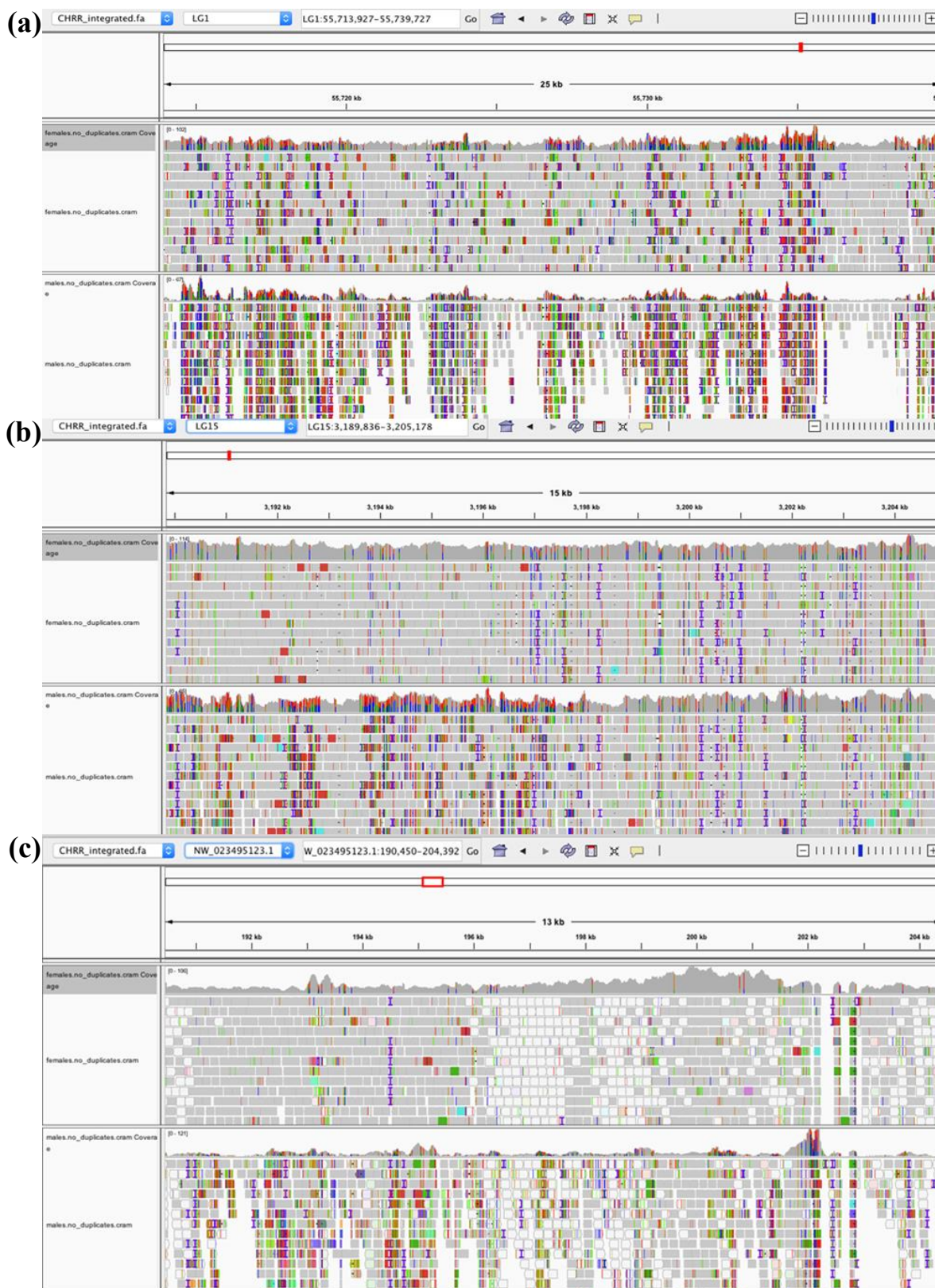


FIGURA 3 Regiões de interesse com picos significativos de SNPs nos machos, LG1 (a), LG15 (b) e *unplaced* scaffold NW_023495123.1 (c). Alinhamento das reads de fêmeas (superior) e machos (inferior). Barras coloridas representam SNPs. Programa Integrative Genomics Viewer (IGV).

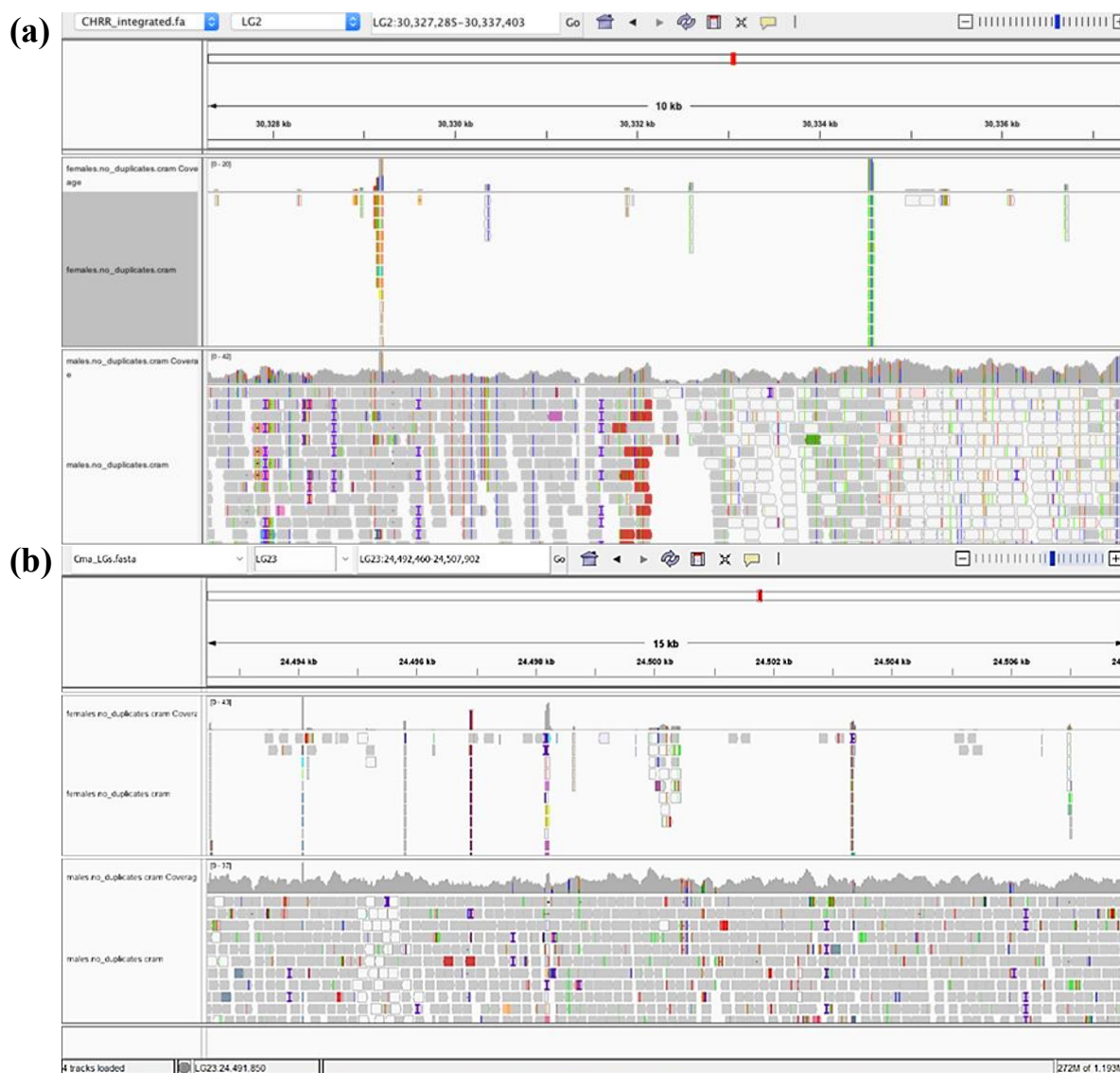


FIGURA 4 Região específica das reads Illumina com cobertura mediana em machos, e nenhuma/pouquíssima reads nas fêmeas, LG2 (a) e LG23 (b). Alinhamento das reads de fêmeas (superior) e machos (inferior). Barras coloridas representam SNPs. Programa Integrative Genomics Viewer (IGV).

TABELA 3 Genes encontrados na janela de 1 Mb a jusante e a montante da região com maior cobertura relativa em machos no LG2.

ID Gene	Descrição
<i>igfbp5a</i>	insulin-like growth factor binding protein 5a
<i>igfbp2a</i>	insulin-like growth factor binding protein 2a
<i>inhale</i>	inhibin subunit alpha
<i>spega</i>	striated muscle enriched protein kinase a

<i>obs11a</i>	obscurin like cytoskeletal adaptor 1a
<i>coll8a1b</i>	collagen type XVIII alpha 1 chain b
<i>slc19a1</i>	solute carrier family 19 member 1
<i>nomo</i>	nodal modulator
<i>mtif2</i>	mitochondrial translational initiation factor 2
<i>tnrc6c2</i>	trinucleotide repeat containing adaptor 6C2
<i>sept9b</i>	septin 9b
<i>zgc:174863</i>	zgc:174863
<i>jpt1a</i>	Jupiter microtubule associated homolog 1a
<i>sumo2a</i>	small ubiquitin like modifier 2a
<i>gga3a</i>	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3a
<i>mif4gda</i>	MIF4G domain containing a
<i>grb2a</i>	growth factor receptor-bound protein 2a
<i>mchr1a</i>	melanin-concentrating hormone receptor 1a
<i>usp43a</i>	ubiquitin specific peptidase 43a
<i>cfap52</i>	cilia and flagella associated protein 52
<i>stx8</i>	syntaxin 8
<i>ntn1a</i>	netrin 1 ^a

TABELA 4 Genes encontrados na janela de 1 Mb a jusante e a montante da região com maior cobertura relativa em machos do LG23.

ID Gene	Descrição
<i>etaa1</i>	ETAA1 activator of ATR kinase
<i>ppp3r1b</i>	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory s1ubunit B, alpha isoform, b
<i>cnrip1a</i>	cannabinoid receptor interacting protein 1a

<i>socs1b</i>	suppressor of cytokine signaling 1b
<i>grin2ab</i>	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A, b
<i>zgc:77849</i>	<i>zgc:77849</i>
<i>abcg2b</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2b
<i>fscn1b</i>	fascin actin-bundling protein 1b
<i>actb1</i>	actin, beta 1
<i>fbxl18</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 18
<i>fga</i>	fibrinogen alpha chain
<i>fgb</i>	fibrinogen beta chain
<i>si:dkeyp-75b4.10</i>	<i>si:dkeyp-75b4.10</i>
<i>trim2b</i>	tripartite motif containing 2b
<i>rnf175</i>	ring finger protein 175
<i>si:dkeyp-75b4.8</i>	<i>si:dkeyp-75b4.8</i>
<i>pdia2</i>	protein disulfide isomerase family A, member 2
<i>pgap6</i>	post-glycosylphosphatidylinositol attachment to proteins 6
<i>rgs11</i>	regulator of G protein signaling 11
<i>zgc:136472</i>	<i>zgc:136472</i>
<i>ubn1</i>	ubiquitin 1
<i>uncx4.1</i>	Unc4.1 homeobox (<i>C. elegans</i>)
<i>micall2b</i>	mical-like 2b
<i>si:ch73-12o23.1</i>	<i>si:ch73-12o23.1</i>
<i>elfn1b</i>	extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 1b
<i>mad11l</i>	mitotic arrest deficient 1 like 1
<i>pmm2</i>	phosphomannomutase 2
<i>lratb.2</i>	lecithin retinol acyltransferase b, tandem duplicate 2

Discussão

O tambaqui, pertencente a ordem dos Caraciformes, família Serrasalminidae, é uma espécie nativa da América do Sul e mundialmente conhecido. Possui 27 cromossomos, e assim como outras espécies de peixes, não possui cromossomos sexuais heteromórficos (Hashimoto et al., 2014; Nakayama et al., 2012). A total compreensão do seu sistema de determinação sexual teria um impacto prático e teórico importante na aquicultura e conservação da espécie. A maior disponibilidade de genomas completos, especialmente de espécies de peixes não modelo, e a utilização da abordagem de sequenciamento do genoma completo de pool (pool-seq) possibilitaram a identificação do sistema de determinação sexual e/ou de polimorfismos/especificidades genéticas ligadas ao sexo em peixes das mais diversas ordens, Esociformes (PAN et al., 2019), Cyprinodontiformes (KOTTLER et al., 2020), Mugiliformes (FERRARESSO et al., 2021), Perciformes (FERON et al., 2020; SUN et al., 2023; WEN; ZHANG; WANG; HU et al., 2022; WEN; ZHANG; WANG; WANG et al., 2022), Siluriformes (SUN et al., 2023; WEN et al., 2023; ZHENG et al., 2022), Cipriniformes (WEN et al., 2020; ZHANG, A. et al., 2017), Cicliformes (TAO et al., 2021), Pleuronectiformes (JASONOWICZ et al., 2022).

Neste estudo, realizamos o sequenciamento do genoma completo de pool de gDNA de ambos os sexos de tambaqui. Para realizar o mapeamento das sequências do pool-seq de machos e fêmeas utilizamos o mapa de ligação em nível de cromossomos de maior densidade relatado até o momento para a espécie (Ariede et al., 2022), ancorado ao genoma de referência proveniente de um indivíduo fêmea (Hilsdorf et al., 2021). A distribuição de polimorfismos de nucleotídeos sexo específicos no genoma de tambaqui apontou 11.200 SNPs distribuídos em sete diferentes picos. Os dois picos de SNPs específicos das fêmeas foram localizados no LG6 e LG9, diferentemente dos machos, nos quais cinco picos de SNPs estavam distribuídos em diferentes LGs e ainda em sequências *unplaced*. Varela et al. (2021) identificaram no LG26 um forte QTL (*quantitative trait locus*), e com base em 27 SNPs dessa região desenharam e validaram quatro marcadores com precisão de 90,0 a 96,7%. E de mesmo modo, as *unplaced* também foram encontradas por esses autores. A ausência de um possível cromossomo Y no genoma de referência pode ter feito com que as sequências do provável cromossomo Y se alinhassem às regiões com maior similaridade, ou ainda, não se alinhassem a nenhuma região genômica. Ao que parece, ambas as situações acabam por mascarar o sinal biológico verdadeiro. Isso é evidenciado pela presença de picos de SNPs machos específicos em diferentes locais. Interessantemente, os LGs do mapa de ligação de Varela et al. (2021) e o

mapa de ligação utilizado no presente estudo (Ariede et al. 2022), alinhados ao genoma de referência Hilsdorf et al. (2021) mostram divergências (Tabela S2). Com exceção do LG1, os demais grupos de ligação não foram correspondentes. A região fortemente associada ao sexo no LG26 (Varela et al., 2021) corresponde ao LG20 em nosso estudo, a qual não possui picos elevados de SNPs. Em espécies com determinação sexual monogênica/cromossômica, regiões específicas presentes nos machos são indicativas de um sistema XX/XY, enquanto regiões específicas nas fêmeas apontam para um sistema ZZ/ZW (PONNIKAS et al., 2018). Analisar a cobertura das reads pode ser útil para investigar o sistema de determinação e encontrar regiões associadas ao sexo. Para o *Silurus asotus* por exemplo, a região determinante do sexo, é relativamente pequena (~400 Kb) e macho específica com alta cobertura no pool-seq, localizada no Chr5 do genoma masculino, e completamente ausente no pool-seq feminino (ZHENG et al., 2023). A região determinante do sexo no *Micropterus Salmoides* é macho específica, foi caracterizada por diferenças significativas de cobertura entre pool-seq masculino e feminino no Chr7, usando um genoma de referência de um indivíduo com sexo não identificado (WEN; ZHANG; WANG; HU et al., 2022). Em tambaqui, identificamos duas regiões com pequenos fragmentos associados ao sexo, localizadas no LG2 (10 kb) e no LG23 (15Kb), porém não estão associadas aos picos de SNPs. Surpreendentemente, quando alinhados ao genoma de referência feminino, esses fragmentos têm cobertura média para alta nas reads do pool-seq masculino, e são ausentes no pool-seq feminino. Diferenças na base genética entre famílias podem causar divergência de sequência de cromossomos sexuais, e afetar os estudos sobre determinação sexual das espécies. Populações de cativeiro de *Ctenopharyngodon idellus* possuem 16 fragmentos ligados ao Y validados com uma precisão de 94, 12%, dos quais apenas 6 foram confirmados em populações selvagens (ZHANG, A. et al., 2017).

A determinação genética do sexo inclui sistemas monofatoriais envolvendo um único gene mestre como *Dmy* em medaka (Matsuda et al., 2002), e sistemas polifatoriais onde múltiplos loci estão presentes nos indivíduos e suas interações epistáticas então determinam o sexo, como no ciclídeo africano *Metriacroma mbenjii* (Moore et al., 2022). Uma alta diversidade de gene master foi relatada em teleostes, e algumas famílias gênicas são conhecidas como “candidatos habituais” da GSD (Rajendiran et al., 2021), como a do hormônio Anti-Mülleriano, *amhr2* em baiacu-tigre *Takifugu rubripes* (Kamiya et al., 2012) e *amhy* em pejerrey *Odontestes hatcheri* (Hattori et al., 2012); ao fator de transcrição doublesex and mab-3, *dmrt1* em linguado chinês *Cynoglossus semilaevis* (Cui et al., 2017); ao domínio

DM no cromossomo Y, *dmy/dmrt1by* (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002). Por outro lado, em salmonídeos, o gene determinante do sexo está relacionado à imunidade de peixes, codificando uma proteína relacionada ao interferon (Yano et al., 2012), e na tilápia azul *Oreochromis aureus* o gene determinante do sexo, *paics*, tem funções relacionadas à biossíntese de purinas (Tao et al., 2021). Para o tambaqui, não encontramos nenhum gene dentre os candidatos habituais para a SD na ampla janela verificada a partir dos pontos específicos com alta cobertura em machos. Cinquenta genes foram anotados nessa região, entretanto, nenhum aparenta ser candidato óbvio, em se considerando os genes clássicos de determinação sexual em teleósteos. Isso indica que outro gene inesperado possa atuar como o gene mestre ou ainda que outra(s) região(ões) possa(m) ser determinante(s) do sexo.

Em nosso estudo revelamos duas regiões associadas ao sexo com alta cobertura em machos, localizadas nos grupos de ligação LG2 e LG23 e anotamos 53 genes em torno dessas regiões. Identificamos as mais altas concentrações de SNPs sendo macho específicas, localizadas em sequências *unplaced*, que não se alinham a nenhum grupo de ligação. O sequenciamento e montagem a nível cromossômico do genoma completo de um indivíduo macho são urgentes e necessários para investigações mais completas sobre o sexo em tambaqui. Em conclusão, nossos resultados fortalecem as bases moleculares dos recentes estudos sobre a determinação sexual de tambaqui, e apoiam a hipótese de um sistema sexual heterogamético masculino (XX/XY) para espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Yann Guiguen (Institut National de Recherche Pour L'Agriculture, L'Alimentation Et L'Environnement, INRAE) pela construção de bibliotecas e genotipagem do tambaqui. VRR recebeu bolsa da CAPES e CHSB recebeu bolsa do CNPq.

Referências

- Almeida, F. L., Lopes, J. S., Crescencio, R., Izel, A. C. U., Chagas, E. C., & Boijink, C. (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.2015.10.031>
- Amanajás, R. D., & Val, A. L. (2022). Thermal biology of tambaqui (*Colossoma macropomum*): General insights for aquaculture in a changing world. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 15, Issue 2, pp. 380–390). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/raq.12732>
- Araújo-Lima, C., & Goulding, M. (1988). *Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. CNPq/Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá.
- Ariede, R. B., Freitas, M. V., Lira, L. V. G., Agudelo, J. F. G., Borges, C. H. S., Mastrochirico-Filho, V. A., Cáceres, P., Yáñez, J. M., & Hashimoto, D. T. (2022). Linkage map for

- chromosome-level genome anchoring and genome-wide association study for resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 560, 738462. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738462>
- Baroiller, J. F., D’Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sexual Development*, 3(2–3), 118–135. <https://doi.org/10.1159/000223077>
- Borges, C. H. de S. (2022). *Recursos genômicos para Megaleporinus macrocephalus: subsídios para aquicultura* [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual Paulista.
- Chen, J., Zhu, Z., & Hu, W. (2022). Progress in research on fish sex determining genes. *Water Biology and Security*, 1(1), 100008. <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100008>
- Cui, Z., Liu, Y., Wang, W., Wang, Q., Zhang, N., Lin, F., Wang, N., Shao, C., Dong, Z., Li, Y., Yang, Y., Hu, M., Li, H., Gao, F., Wei, Z., Meng, L., Liu, Y., Wei, M., Zhu, Y., ... Chen, S. (2017). Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, 7(1), 42213. <https://doi.org/10.1038/srep42213>
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191–364. www.elsevier.com/locate/aqua-online
- Fao. (2017). *Colossoma macropomum Introduced to Thailand from Hong Kong, Singapore*. Food and Agriculture Organization of The United Nations. <http://www.fao.org/fishery/introsp/3885/en>
- Feron, R., Zahm, M., Cabau, C., Klopp, C., Roques, C., Bouchez, O., Eché, C., Valière, S., Donnadieu, C., Haffray, P., Bestin, A., Morvezen, R., Acloque, H., Euclide, P.T., Wen, M., Jouano, E., Schartl, M., Postlethwait, J.H., Schraidt, C., Christie, M.R., Larson, W.A., Herpin, A., Guiguen, Y. (2020). Characterization of a Y-specific duplication/insertion of the anti-Mullerian hormone type II receptor gene based on a chromosome-scale genome assembly of yellow perch, *Perca flavescens*. *Mol Ecol Resour* 20, 531–543.
- Ferraresso, S., Bargelloni, L., Babbucci, M., Cannas, R., Follesa, M. C., Carugati, L., Melis, R., Cau, A., Koutrakis, M., Sapounidis, A., Crosetti, D., & Patarnello, T. (2021). *fshr*: a fish sex-determining locus shows variable incomplete penetrance across flathead grey mullet populations. *IScience*, 24(1), 101886. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101886>
- Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., Martínez, P., & Porto-Foresti, F. (2014). Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid Juvenile Hybrids in Brazilian Aquaculture. *PLoS ONE*, 9(3), e89902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089902>
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M., & Strüssmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8), 2955–2959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018392109>
- 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. de S., Venturieri, R. L. L., Moreira, R. G., & Cyrino, J. E. P. (2022). The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. *Reviews in Aquaculture*, 14(2), 993–1027. <https://doi.org/10.1111/raq.12638>
- Hilsdorf, A. W. S., Uliano-Silva, M., Coutinho, L. L., Montenegro, H., Almeida-Val, V. M. F., & Pinhal, D. (2021). Genome assembly and annotation of the tambaqui (*Colossoma*

- macropomum): an emblematic fish of the Amazon River Basin. *Gigabyte*, 2021, 1–14. <https://doi.org/10.46471/gigabyte.29>
- Hivert, V., Leblois, R., Petit, E. J., Gautier, M., & Vitalis, R. (2018). Measuring Genetic Differentiation from Pool-seq Data. *Genetics*, 210(1), 315–330. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300900>
- IBGE. (2021). *Produção da Pecuária Municipal 2021* (Vol. 49).
- Jasonowicz, A.J., Simeon, A., Zahm, M., Cabau, C., Klopp, C., Roques, C., Iampietro, C., Lluch, J., Donnadiou, C., Parrinello, H., Drinan, D.P., Hauser, L., Guiguen, Y., Planas, J. V., 2022. Generation of a chromosome-level genome assembly for Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and characterization of its sex-determining genomic region. *Mol Ecol Resour* 22, 2685–2700.
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., & Kikuchi, K. (2012). A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, Takifugu rubripes (Fugu). *PLoS Genetics*, 8(7), e1002798. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002798>
- Kottler, V.A., Feron, R., Nanda, I., Klopp, C., Du, K., Kneitz, S., Helmprobst, F., Lamatsch, D.K., Lopez-Roques, C., Lluch, J., Journot, L., Parrinello, H., Guiguen, Y., Scharl, M., 2020. Independent Origin of XY and ZW Sex Determination Mechanisms in Mosquitofish Sister Species. *Genetics* 214, 193–209.
- Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E. S., Ciorpac, M., Gessner, J., Holostenco, D., Kleiner, W., Kohlmann, K., Lamatsch, D. K., Prokopov, D., Bestin, A., Bonpunt, E., Debeuf, B., Haffray, P., ... Stöck, M. (2021). A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1832), 20200089. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0089>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, X.-Y., Mei, J., Ge, C.-T., Liu, X.-L., & Gui, J.-F. (2022). Sex determination mechanisms and sex control approaches in aquaculture animals. *Science China Life Sciences*, 65(6), 1091–1122. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-2075-x>
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C. E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature751>
- Mei, J., & Gui, J.-F. (2015). Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. *Science China Life Sciences*, 58(2), 124–136. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4797-9>
- Moore, E. C., Ciccotto, P. J., Peterson, E. N., Lamm, M. S., Albertson, R. C., & Roberts, R. B. (2022). Polygenic sex determination produces modular sex polymorphism in an African cichlid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.2118574119>

- Morais, I. da S. de, Reis, V. R., & Almeida, F. L. de. (2020). The influence of the water pH on the sex ratio of tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Aquaculture Reports*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100334>
- Nakayama, C. M., Feldberg, E., Antonio, L., & Bertollo, C. (2012). Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalminidae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 10(1), 53–58.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M., & Schartl, M. (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11778–11783. <https://doi.org/10.1073/pnas.182314699>
- Nico, L., & Neilson, M. (2018). *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816): U.S. Geological Survey. Nonindigenous Aquatic Species Database. <https://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.aspx?speciesID=418>
- Paixão, R. V., Silva, G. F., Caetano, A. R., Cintra, L. C., Varela, E. S., & O'Sullivan, F. L. A. (2022). Phylogenomic and expression analysis of *Colossoma macropomum* cyp19a1a and cyp19a1b and their non-classical role in tambaqui sex differentiation. *Gene*, 843. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146795>
- Pan, Q., Feron, R., Jouanno, E., Darras, H., Herpin, A., Koop, B., Rondeau, E., Goetz, F. W., Larson, W. A., Bernatchez, L., Tringali, M., Curran, S. S., Saillant, E., Denys, G. P., von Hippel, F. A., Chen, S., López, J. A., Verreycken, H., Ocalewicz, K., Guiguen, Y. (2021). The rise and fall of the ancient northern pike master sex-determining gene. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.62858>
- Pan, Q., Feron, R., Yano, A., Guyomard, R., Jouanno, E., Vigouroux, E., Wen, M., Busnel, J.-M., Bobe, J., Concordet, J.-P., Parrinello, H., Journot, L., Klopp, C., Lluch, J., Roques, C., Postlethwait, J., Schartl, M., Herpin, A., Guiguen, Y. (2019). Identification of the master sex determining gene in Northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation. *PLoS Genet*, 15, e1008013.
- Ponnikas, S., Sigeman, H., Abbott, J. K., & Hansson, B. (2018). Why Do Sex Chromosomes Stop Recombining? *Trends in Genetics*, 34(7), 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.04.001>
- Rafati, N., Chen, J., Herpin, A., Pettersson, M. E., Han, F., Feng, C., Wallerman, O., Rubin, C.-J., Péron, S., Cocco, A., Larsson, M., Trötschel, C., Poetsch, A., Korsching, K., Bönigk, W., Körschen, H. G., Berg, F., Folkvord, A., Kaupp, U. B., ... Andersson, L. (2020). Reconstruction of the birth of a male sex chromosome present in Atlantic herring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(39), 24359–24368. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009925117>
- Rajendiran, P., Jaafar, F., Kar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B., & Parhar, I. S. (2021). Sex Determination and Differentiation in Teleost: Roles of Genetics, Environment, and Brain. *Biology*, 10(10), 973. <https://doi.org/10.3390/biology10100973>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 2011 29:1, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Sun, D., Wen, H., Qi, X., Li, C., Sun, C., Wang, L., Zhu, M., Jiang, T., Zhang, X., Li, Y., 2023. Comparative study of candidate sex determination regions in snakeheads (*Channa argus* and *C. maculata*) and development of novel sex markers. *Aquaculture* 575, 739771.

- Tao, W., Cao, J., Xiao, H., Zhu, X., Dong, J., Kocher, T.D., Lu, M., Wang, D., 2021. A Chromosome-Level Genome Assembly of Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Reveals the Structure of Sex Determining Regions. *Front Genet* 12.
- Tao, W., Xu, L., Zhao, L., Zhu, Z., Wu, X., Min, Q., Wang, D., & Zhou, Q. (2021). High-quality chromosome-level genomes of two tilapia species reveal their evolution of repeat sequences and sex chromosomes. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 543–560. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13273>
- Trenkel, V. M., Boudry, P., Verrez-Bagnis, V., & Lorance, P. (2020). Methods for identifying and interpreting sex-linked SNP markers and carrying out sex assignment: application to thornback ray (*Raja clavata*). *Molecular Ecology Resources*, 20(6), 1610–1619. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13225>
- Varela, E. S., Bekaert, M., Ganeco-Kirschnik, L. N., Torati, L. S., Shiotsuki, L., de Almeida, F. L., Villela, L. C. V., Rezende, F. P., da Silva Barroso, A., de Freitas, L. E. L., Taggart, J. B., & Migaud, H. (2021). A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. *BMC Genomics*, 22(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12864-021-08037-8/TABLES/4>
- Wen, M., Feron, R., Pan, Q., Guguin, J., Jouanno, E., Herpin, A., Klopp, C., Cabau, C., Zahm, M., Parrinello, H., Journot, L., Burgess, S. M., Omori, Y., Postlethwait, J. H., Scharfl, M., & Guiguen, Y. (2020). Sex chromosome and sex locus characterization in goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). *BMC Genomics*, 21(1), 552. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06959-3>
- Wen, M., Pan, Q., Larson, W., Ech e, C., & Guiguen, Y. (2023). Characterization of the sex determining region of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and development of a sex-genotyping test. *Gene*, 850, 146933. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146933>
- Wen, M., Zhang, Y., Wang, S., Hu, F., Tang, C., Li, Q., Qin, Q., Tao, M., Zhang, C., Zhao, R., Wang, S., Liu, Q., Tang, C., & Liu, S. (2022a). Sex locus and sex markers identification using whole genome pool-sequencing approach in the largemouth bass (*Micropterus Salmoides* L.). *Aquaculture*, 559, 738375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738375>
- Wen, M., Zhang, Y., Wang, Siyu, Wang, Y., Qin, Q., Tao, M., Zhang, C., Zhao, R., Wang, Shi, Hu, F., Liu, Q., Wei, Z., Gu, Q., Tang, C., Liu, S. (2022b). Characterization of sex locus and sex-specific sequences in the mandarin fishes. *Aquaculture* 561, 738650.
- Zhang, A., Huang, R., Chen, L., Xiong, L., He, L., Li, Y., Liao, L., Zhu, Z., Wang, Y., 2017. Computational identification of Y-linked markers and genes in the grass carp genome by using a pool-and-sequence method. *Sci Rep* 7, 8213.
- Zheng, S., Tao, W., Tao, H., Yang, H., Wu, L., Shao, F., Wang, Z., Jin, L., Peng, Z., Wang, D., Zhang, Y., 2023. Characterization of the male-specific region containing the candidate sex-determining gene in Amur catfish (*Silurus asotus*) using third-generation- and pool-sequencing data. *Int J Biol Macromol* 248, 125908.
- Zheng, S., Tao, W., Yang, H., Kocher, T.D., Wang, Z., Peng, Z., Jin, L., Pu, D., Zhang, Y., Wang, D., 2022. Identification of sex chromosome and sex-determining gene of southern catfish (*Silurus meridionalis*) based on XX, XY and YY genome sequencing. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 289.

TABLE S1. Correspondência dos picos mais relevantes nos gráficos de Manhattan (Figura 1) entre o ID dos LGs em nível cromossômico (Ariede et al., 2022) e o ID do scaffold de genoma de referência (Hiltsdorf et al., 2021)

LG (linkage group) (Ariede et al., 2022)	LG (Mb)	scaffold (Hiltsdorf et al., 2021)	scaffold (Mb)	Região de picos de SNPs		sex-specific SNPs	F _{ST}
				chr (Mb)	scaffold (pb)		
		NW_023495346.1	0.250		1 - 250,004		
6*	56.806	NW_023495904.1	0.178	50.266 – 50.312	1 - 128,458	F	0.230
		NW_023496050.1	2.572		1 - 21,338		
9	47.315	NW_023494874.1	0.164	1.398 – 1.439	54,562 - 64,561	F	0.040
1	67.868	NW_023494792.1	63.817	55.540 – 55.560	54,447,797 - 54,900,796	M	0.170
15	40.359	NW_023494801.1	36.862	3.187 – 3.198	34,764,257 - 34,784,256	M	0.110
unplaced	0.573	NW_023495123.1	0.573	0.194 – 0.200	-	M	0.800
2	53.234	NW_023494789.1	52.905	30.316 – 30.370	22,534,933 - 22,588,932	M**	0.002
23	40.660	NW_023494808.1	21.701	24.462 – 24.514	13,157,447 - 13,209,446	M**	0.490

* Três scaffolds alinhados com 100% de similaridade em relação à região de interesse no LG 6. ** região específica de machos. F: fêmeas; M: macho.

TABELA S2. LGs do mapa de ligação de Varela et al. (2021) e o mapa de ligação de Ariede et al. (2022).

LGs (Varela et al., 2021)	LGs (Ariede et al., 2022)	Scaffold (Hilsdorf et al., 2021)	Orientação	Início (pb)	Final (pb)
1	1	NW_023495331.1	+	1	108448
1	1	NW_023495292.1	+	1	81518
1	1	NW_023495992.1	+	1	104938
1	1	NW_023495317.1	+	1	208150
1	1	NW_023495893.1	+	1	77293
	1	NW_023495268.1	+	1	367045
1	1	NW_023495666.1	+	1	4112
1	1	NW_023494792.1	+	1	63817184
	1	NW_023495274.1	-	396337	1
	1	NW_023494837.1	+	1	100688
	1	NW_023495930.1	+	1	107632
	1	NW_023495878.1	+	1	2493980
1		NW_023495928.1			
1		NW_023494817.1			
1		NW_023495723.1			
1		NW_023495663.1			
1		NW_023495066.1			
1		NW_023495766.1			
1		NW_023495123.1			
1		NW_023495241.1			
2	2	NW_023494789.1	-	52904932	1
	2	NW_023495271.1	+	1	328509
9	3	NW_023494791.1	+	1	49677613
6	4	NW_023495946.1	-	610588	1
6	4	NW_023494827.1	+	1	480010
6	4	NW_023495382.1	+	1	101913

	4	NW_023495690.1	+	1	63027
6	4	NW_023495514.1	+	1	417284
	4	NW_023495088.1	+	1	108693
	4	NW_023494862.1	+	1	327100
	4	NW_023495743.1	-	83928	1
	4	NW_023495351.1	+	1	704976
6	4	NW_023494795.1	-	45137478	1
6		NW_023495883.1			
	5	NW_023495936.1	+	1	62999
16	5	NW_023494784.1	+	1	43104138
	5	NW_023495280.1	-	2856822	1
16	5	NW_023495290.1	+	1	526657
16	5	NW_023496038.1	+	1	282589
16	5	NW_023495379.1	-	150416	1
	6	NW_023495463.1	+	1	298097
3	6	NW_023494787.1	+	1	49651834
	6	NW_023495904.1	-	178327	1
	6	NW_023495346.1	+	1	250004
	6	NW_023496050.1	+	1	2572088
	6	NW_023495942.1	+	1	722643
3	6	NW_023495456.1	+	1	3132700
22		NW_023494796.1			
22		NW_023495233.1			
	7	NW_023495257.1	+	1	251475
8	7	NW_023495248.1	+	1	142351
8	7	NW_023495319.1	-	508624	1
	7	NW_023494875.1	-	741936	1
	7	NW_023495829.1	+	1	25326

8	7	NW_023494785.1	+	1	46126215
	8	NW_023496045.1	+	1	790011
	8	NW_023495298.1	+	1	101851
6	8	NW_023495915.1	+	1	326092
15	8	NW_023494788.1	+	1	42853313
5	9	NW_023495286.1	+	1	254538
5	9	NW_023495397.1	+	1	53537
	9	NW_023495375.1	+	1	243947
	9	NW_023495312.1	-	545840	1
	9	NW_023495203.1	+	1	267077
	9	NW_023494874.1	+	1	163951
	9	NW_023495366.1	+	1	186526
	9	NW_023495247.1	+	1	825120
	9	NW_023495821.1	+	1	179189
	9	NW_023495858.1	+	1	25535
	9	NW_023496013.1	+	1	151591
	9	NW_023495615.1	+	1	7023
5	9	NW_023494805.1	+	1	44409508
5		NW_023495362.1			
5		NW_023495864.1			
5		NW_023495373.1			
5		NW_023495894.1			
5		NW_023495356.1			
4	10	NW_023494793.1	-	45648328	1
	10	NW_023495516.1	+	1	194877
	10	NW_023495188.1	+	1	75569
	10	NW_023495279.1	+	1	38249
	10	NW_023495291.1	+	1	142952

	11	NW_023495737.1	-	378846	1
20	11	NW_023494790.1	-	40163545	1
	12	NW_023495506.1	+	1	104204
19	12	NW_023494799.1	+	1	40668426
7	13	NW_023495515.1	-	3106895	1
7	13	NW_023495545.1	+	1	1415048
	13	NW_023495326.1	-	114717	1
	13	NW_023494887.1	+	1	80274
7	13	NW_023494786.1	+	1	36037407
	13	NW_023495783.1	+	1	133963
	13	NW_023496046.1	-	329787	1
14	14	NW_023494798.1	-	36781461	1
	14	NW_023495414.1	+	1	201318
	14	NW_023495266.1	-	167933	1
	14	NW_023495267.1	-	4306593	1
	14	NW_023496020.1	+	1	2528392
13	15	NW_023494903.1	+	1	1101954
13	15	NW_023494801.1	-	36862202	1
13	15	NW_023495254.1	-	1327992	1
13	15	NW_023495899.1	+	1	91155
13	15	NW_023495887.1	+	1	208171
13	15	NW_023495588.1	-	453628	1
13	15	NW_023495311.1	-	307280	1
	15	NW_023495245.1	+	1	5933
13		NW_023495176.1			
13		NW_023495681.1			
13		NW_023495881.1			
	16	NW_023495870.1	+	1	783381

18	16	NW_023494803.1	+	1	43836131
	17	NW_023495943.1	+	1	72354
17	17	NW_023494810.1	-	35500406	1
	17	NW_023494883.1	+	1	359263
	17	NW_023495998.1	+	1	109404
17		NW_023495166.1			
17		NW_023495611.1			
17		NW_023494872.1			
	18	NW_023495625.1	-	347124	1
	18	NW_023495596.1	+	1	191263
12	18	NW_023494800.1	-	38025399	1
	19	NW_023495348.1	+	1	59127
	19	NW_023495350.1	+	1	203265
	19	NW_023495948.1	+	1	294533
	19	NW_023496040.1	+	1	760867
	19	NW_023495958.1	-	466594	1
	19	NW_023495334.1	+	1	145483
	19	NW_023494796.1	+	1	34377557
	19	NW_023495932.1	+	1	565651
	19	NW_023495933.1	+	1	102637
26	20	NW_023494809.1	-	31836560	1
	20	NW_023494894.1	+	1	2102189
	20	NW_023495828.1	+	1	15522
11	21	NW_023495353.1	+	1	338138
	21	NW_023494851.1	+	1	165193
11	21	NW_023494804.1	-	37226397	1
	21	NW_023495007.1	+	1	1854648
10	22	NW_023494802.1	+	1	42604281

10	22	NW_023495330.1	-	393586	1
10	22	NW_023495747.1	+	1	138925
	22	NW_023496005.1	+	1	31938
10		NW_023495161.1			
10		NW_023495140.1			
10		NW_023495106.1			
10		NW_023494845.1			
10		NW_023494880.1			
10		NW_023495528.1			
10		NW_023495261.1			
10		NW_023495700.1			
10		NW_023495218.1			
10		NW_023495219.1			
10		NW_023496000.1			
10		NW_023495458.1			
10		NW_023494849.1			
21	23	NW_023496024.1	-	753807	1
21	23	NW_023496048.1	+	1	211553
21	23	NW_023495846.1	+	1	290346
	23	NW_023495265.1	+	1	341523
21	23	NW_023495901.1	+	1	364045
21	23	NW_023495872.1	-	676777	1
	23	NW_023494915.1	+	1	98632
	23	NW_023495283.1	+	1	64792
21	23	NW_023494816.1	+	1	731958
	23	NW_023495052.1	+	1	43345
	23	NW_023495377.1	+	1	65073
21	23	NW_023494821.1	-	603058	1

21	23	NW_023496043.1	+	1	1949065
	23	NW_023495385.1	-	338268	1
21	23	NW_023495818.1	-	1413761	1
21	23	NW_023495761.1	+	1	3356951
21	23	NW_023494808.1	+	1	21701227
	23	NW_023495392.1	+	1	445840
21	23	NW_023495343.1	+	1	201186
21	23	NW_023495530.1	+	1	1237288
21	23	NW_023494908.1	+	1	174883
21	23	NW_023496042.1	-	863153	1
21	23	NW_023495199.1	+	1	68201
21	23	NW_023495922.1	+	1	1862826
21	23	NW_023494825.1	-	1372459	1
21	23	NW_023495260.1	+	1	386131
21	23	NW_023495344.1	-	196537	1
21	23	NW_023494911.1	+	1	844699
21		NW_023495938.1			
21		NW_023495819.1			
21		NW_023496044.1			
21		NW_023495461.1			
21		NW_023495877.1			
21		NW_023495834.1			
21		NW_023495171.1			
21		NW_023495921.1			
21		NW_023495281.1			
21		NW_023495466.1			
21		NW_023495950.1			
21		NW_023495296.1			

21		NW_023494856.1			
21		NW_023495908.1			
	24	NW_023495159.1	+	1	92509
25	24	NW_023495902.1	-	513454	1
	24	NW_023495792.1	+	1	69825
	24	NW_023495989.1	+	1	220863
25	24	NW_023494806.1	-	34655536	1
25		NW_023494893.1			
25		NW_023495200.1			
25		NW_023495492.1			
25		NW_023495497.1			
25		NW_023494864.1			
25		NW_023495301.1			
25		NW_023494901.1			
25		NW_023496014.1			
	25	NW_023495808.1	+	1	394731
	25	NW_023495386.1	-	1534250	1
	25	NW_023495845.1	+	1	462418
	25	NW_023495168.1	+	1	187780
	25	NW_023495259.1	-	470866	1
23	25	NW_023494807.1	+	1	34369132
23		NW_023496001.1			
	26	NW_023495476.1	+	1	87898
27	26	NW_023495304.1	-	86595	1
27	26	NW_023496039.1	+	1	620366
27	26	NW_023495967.1	+	1	1113474
	26	NW_023495565.1	-	2419510	1
27	26	NW_023494794.1	+	1	30823758

27		NW_023494899.1			
27		NW_023494854.1			
27		NW_023495369.1			
27		NW_023495727.1			
27		NW_023495294.1			
27		NW_023495898.1			
24	27	NW_023494797.1	-	21922986	1
24	27	NW_023495660.1	-	1397283	1
24	27	NW_023495014.1	-	1906443	1
24	27	NW_023496051.1	+	1	3944963
24	27	NW_023495275.1	-	744905	1
24	27	NW_023494814.1	-	177740	1
24	27	NW_023495303.1	-	1573292	1
24	27	NW_023495965.1	+	1	1773076
24		NW_023495926.1			
24		NW_023495622.1			
24		NW_023495465.1			
24		NW_023495954.1			

CONCLUSÃO

A presente tese analisou a influência da temperatura no desenvolvimento sexual inicial, na proporção entre os sexos, e traçou o perfil transcricional de genes pró-femininos e pró-masculinos antes e após a diferenciação sexual, identificou e mapeou regiões e polimorfismos associados ao sexo em tambaqui. O estudo revelou que a temperatura não influencia a proporção sexual no tambaqui *Colossoma macropomum*. O único gene que apresentou termossensibilidade foi o *foxl2* (gene pró-feminino), antes da diferenciação sexual a expressão foi regulada negativamente na temperatura mais alta. Após a diferenciação sexual, os genes *wt1b* e *ar* (genes pró-masculinos) foram regulados positivamente em apenas alguns indivíduos, indicando uma possível importância no estabelecimento dos testículos e na sua manutenção. Da pré até a pós diferenciação o perfil de expressão de *vasa* foi crescente, com exceção de alguns peixes, nos quais foram registrados valores baixos de expressão mesmo após a diferenciação. Esse estudo sequenciou o genoma de tambaqui e gerou 11,9 GB do pool de fêmea e 7,54 GB do pool de macho. Foram mapeados 11200 SNPs com viés sexual. Foram encontradas cinco regiões com alta densidade de SNPs com tendência masculina e duas com tendência feminina. O mais alto pico de SNPs foi localizado em uma sequência de gDNA *unplaced* do genoma, que continha ~ 2.500 SNPs masculinos. Duas regiões com alta cobertura relativa machos e sem cobertura nas fêmeas, pontos isolados nos LGs 2 e 23, se revelaram como candidatas a regiões de determinação sexual.

Os resultados desse estudo fortalecem a hipótese de um forte controle genético na determinação do sexo do tambaqui na via de desenvolvimento sexual. As novas informações trazidas aqui contribuem para as recentes discussões e compreensão sobre mecanismos de desenvolvimento sexual em tambaqui. Contribui ainda com os estudos sobre a biologia da espécie frente os cenários de aquecimento global, e apoiando o avanço da aquicultura baseado no desenvolvimento de tecnologias voltadas para o controle de características reprodutivas.