

## 5. PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM DE GÓNADAS PARA AVALIAÇÃO DO RÁCIO SEXUAL

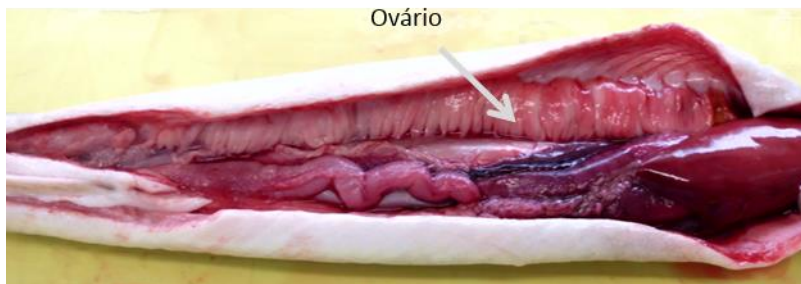
Este protocolo destina-se a amostrar gónadas de enguias amarelas para realizar análises moleculares e histológicas, quando não é possível identificar o sexo através da análise macroscópica. A sua implementação deve ser aplicada a enguias com comprimento compreendido entre 20 e 30 cm (mas algumas enguias < 30 cm podem possuir gónadas suficientemente desenvolvidas para uma identificação macroscópica do sexo). Logo após a sua morte, deve dissecar as enguias e inspecionar as suas gónadas.

### 5.1. Observação macroscópica

Nas enguias amarelas de maiores dimensões e, em particular, nas enguias prateadas, é fácil determinar o sexo (Fig.1):

- Os **ovários** podem ser identificados pela presença de dobras transversais que, quando a gónada está mais desenvolvida, dividem as gónadas em muitos compartimentos alongados;
- Os **testículos** podem ser identificados pela presença de lóbulos individuais, que estão ligados à parte dorsal da gónada.

FÊMEA



MACHO

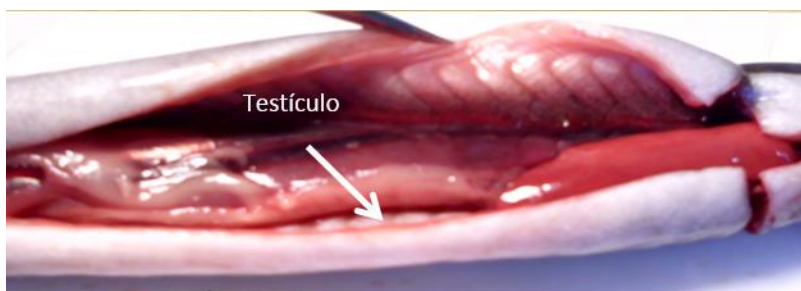


Figura 1. Localização e aspeto macroscópico de um ovário e um testículo na cavidade abdominal de uma fêmea e um macho de enguia.

A distinção morfológica entre testículo e ovário é, no entanto, difícil nas enguias amarelas de pequenas dimensões porque é comum encontrar gónadas indiferenciadas ou intersexuais (Beullens *et al.*, 1997;). Uma vez que o objetivo final é distinguir fêmeas de machos, quando se procede à identificação do sexo dos indivíduos, as três categorias (indiferenciado, macho e fêmea), podem reconhecer-se observando a Fig.2. A separação entre lóbulos (3) não deve ser usada como critério para identificação dos machos

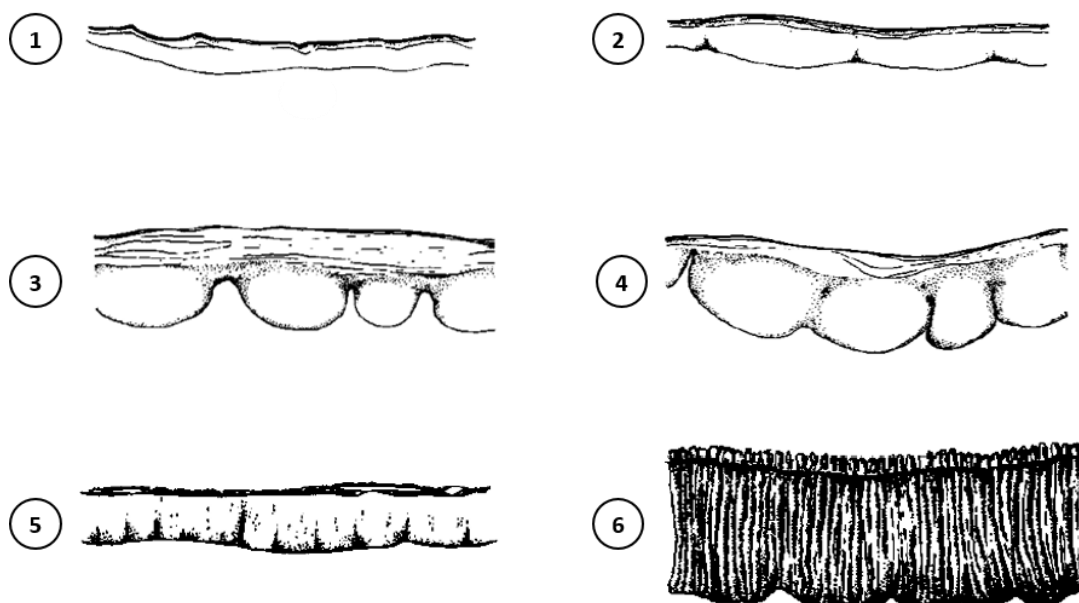


Figura 2. Aspeto morfológico das gónadas de enguia: Indiferenciado (1 e 2) ou intersexual (3); Macho (4); Fêmea (5 e 6) (adaptado de Beullens *et al.*, 1997).

Se a análise macroscópica não permitir a identificação do sexo das enguias amarelas, as gónadas devem ser removidas para análise posterior (ver Fig.3 e secção 5.2.).



Figura 3. Amostragem de gónadas numa enguia juvenil.

## 5.2. Análise molecular e histológica

Devem adotar-se os seguintes procedimentos:

### A- Análise molecular

- Usar pequenas gotas de uma solução de RNA later para limitar a degradação de RNA e tornar a gónada mais visível *in situ*, durante a dissecação;
- Colocar imediatamente **uma das gónadas** ( a primeira que extrair, geralmente a esquerda) num *eppendorf* de 1,5 ml com uma solução de RNA later;
- Manter os *eppendorfs* a baixa temperatura (mas não congelar) e incubar pelo menos uma hora (ou durante a noite) a 4°C;
- Remover RNA later e perfurar a tampa (pequeno orifício) antes de preservar a - 80°C.

### B- Análise histológica

- Colocar a **outra gónada** numa cassete de processamento de tecidos;
- Mergulhar em Bouin por 1 a 3 h;
- Enxaguar 1h com água;
- Transferir para formol 10%.

## Referências

Beullens K., E.H. Eding, P. Gilson, F. Ollevier, J. Komen and C.J.J. Richter. 1997. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture*, 153:135-150.

[illegible]