Bruno Cavalheiro Araújo

**Aspectos morfométricos e metabólicos de ovos e
larvas de *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae)
provenientes de fêmeas de ambiente natural e
cativeiro**

São Paulo

2011

Bruno Cavalheiro Araújo

**Aspectos morfométricos e metabólicos de ovos e
larvas de *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae)
provenientes de fêmeas de ambiente natural e
cativeiro**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata
Guimarães Moreira

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Araújo, Bruno Cavalheiro

Aspectos morfométricos e metabólicos de ovos e larvas de *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae) provenientes de fêmeas de ambiente natural e cativeiro. 71 páginas.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. *Salminus hilarii* 2. Metabolismo 3. Ácidos graxos
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).
Orientador(a)

Dedico este trabalho:

*aos meus pais Moisés e Piedade, minhas irmãs Fernanda e Márcia e a
minha querida Cláudia, por todo amor e companheirismo de todos até aqui.*

...com muito carinho!

Agradecimentos

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

São tantas as pessoas que me guiaram até esse momento tão feliz que não teria como não ser injusto não me lembrando de todas elas.

- Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por tudo de tão maravilhoso que esta acontecendo em minha vida.

- A professora, orientadora, terapeuta e principalmente amiga Dra. Renata Guimarães Moreira, pela oportunidade, pela presença, pelo conhecimento, e por toda a confiança depositada em mim durante este tempo, a realização de tudo isso se deve, e muito a você, muito obrigado por sempre estar próxima, e por sempre ser essa pessoa doce e maravilhosa.

- A todos os funcionários, professores e alunos do Instituto de Biociências pelo convívio durante esses anos.

- Ao DAEE (Departamento de Águas e Energia do Estado de São Paulo), em especial ao professor Alexandre Hisldorf, e os funcionários Marcos e Milton, pelos animais cedidos e pela ajuda nas coletas.

- A toda a minha família, principalmente meu pai e minha mãe, meus pilares, quero ser para os meus filhos metade do que vocês foram para mim, obrigado por terem acreditado e me apoiado sempre. Minhas irmãs Fernanda e Márcia, e meus sobrinhos Larissa, Felipe, Thamyres e Thiago, meus orgulhos, vocês sempre conseguem me arrancar um sorriso, independente do meu estado de espírito. Obrigado vocês me fazem muito forte!

- A minha Claudinha, pessoa que mudou a minha vida, meu amor, minha amiga, companheira de todos os momentos. Antes de qualquer coisa uma pessoa pura, justa e correta, que Deus colocou na minha vida, e que agradeço todos os dias. “Antes de você chegar era tudo saudade”.

- Ao LAMEROA, minha segunda família: Aline e Cristiele (obrigado pela amizade e muitas vezes pela estadia), Amanda, Bianca, Carlos Eduardo (Jaboti), Carlos Eduardo (Kadu), Jandyr (Jaja), Larissa (por todos os

ensinamentos), Juliane, Paulo (parceirão de tantas e tantas cervejas e risadas, obrigado por tudo cara), Renato, Thiago e Vanessa, vocês todos fazem mais do que parte disto, obrigado por estarem ao meu lado sempre.

- Ao meu amigo Jajá. Tenho uma dívida eterna com você. Muito obrigado por ter insistido na idéia.

- Em especial ao Honji pela grande ajuda em tudo, por ser sempre prestativo, não tenho palavras para agradecer a grande força.

- Aos meus grandes amigos de faculdade: Alexandre (Jow-Jow), Gabriel, Daniel (amigos de fé irmãos camaradas), Eliza, Cristine, Carol, Thiago, Roberta, e todos os outros, vocês me fazem falta todos os dias.

- Aos meus amigos de vida: Wagner, Thiago, César, Fábio (muito obrigado pela amizade verdadeira e pelo surf).

- A família Henrique-Gil, Ilani, Victor, Dani (Bandido) e Alan, amo vocês de coração, obrigado pela adoção e companheirismo.

Minha eterna gratidão a todos que direta e indiretamente colaboraram com este trabalho e com minha formação.

MUITO OBRIGADO!

Índice

Capítulo 1. Introdução Geral

1. Introdução Geral	01
1.1. Região de estudo	03
1.2. Espécie modelo	04
1.3. Controle hormonal e mobilização de substratos energéticos	08
2. Referências	12

Capítulo 2. Lipídios, proteínas e morfologia de ovos e larvas

Resumo	17
Abstract	18
1. Introdução	19
2. Materiais e métodos	21
2.1. Delineamento experimental	21
2.1.1. Manutenção dos grupos	21
2.1.2. Indução hormonal e reprodução	21
2.2. Coleta das amostras	22
2.3. Análises bioquímicas	23
2.3.1. Extração de lipídios totais	23
2.3.2. Quantificação dos lipídios totais	23
2.3.3. Extração de proteínas totais	23
2.3.4. Quantificação de proteínas totais	24
2.4. Análises morfométricas	24
2.5. Análises dos resultados – Análises estatísticas	24
3. Resultados	25
3.1. Composição de ovos e larvas	25
3.1.1. Peso seco	25
3.1.2. Lipídios totais	26
3.1.3. Proteínas totais	26
3.2. Morfologia	27
3.2.1. Desenvolvimento dos ovos e larvas	27

4. Discussão	35
4.1. Lipídios	35
4.2. Proteínas	36
4.3. Morfologia	38
5. Conclusão	40
6. Referências	41
 Capítulo 3. Composição em ácidos graxos de ovos e larvas	
<i>Abstract</i>	45
1. <i>Introduction</i>	46
2. <i>Materials and methods</i>	48
2.1. <i>Egg and larvae collection</i>	48
2.2. <i>Fatty acid analysis</i>	49
2.3. <i>Data analysis</i>	49
3. <i>Results</i>	50
4. <i>Discussion</i>	61
5. <i>Acknowledgements</i>	64
6. <i>References</i>	65
 Capítulo 4. Discussão geral e conclusões	
1. Discussão geral e conclusões	70
 Resumo (Geral)	 ix
Abstract	x

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Introdução Geral

Segundo Lewinsohn e Prado (2002) 14% das espécies de peixes no mundo são encontradas no Brasil, dessas 2.122 espécies são de peixes de água doce representando 21% das espécies catalogadas no mundo. Cerca de 30 a 40% da fauna de peixes neotropicais de águas interiores ainda não foram descritas, e segundo Schaefer (1998), baseado em tendências históricas esse número pode chegar a 8.000 espécies.

De acordo com Tundisi (2003) dentre as principais ameaças a essa diversidade aquática estão o tratamento inadequado da água, aproximação de grandes áreas urbanas, agricultura, desmatamento e pecuária intensiva. Agostinho (2005) destaca ainda duas ameaças potenciais a espécies dulciaquícolas, o tratamento inadequado de esgoto e a construção de barragens para fornecimento de água e energia.

A construção de usinas hidroelétricas, embora venha evitar vários problemas sociais com o abastecimento energético em grandes centros, afeta adversamente o movimento migratório de diversas espécies de peixes, impedindo que estas espécies se reproduzam, causando assim uma redução acentuada de seus estoques naturais. A intensidade dos impactos causados por processos de barramento pode variar de acordo com algumas peculiaridades da fauna local como, estratégias reprodutivas, padrões de migração, especializações tróficas e grau de pré-adaptações a ambientes lacustres, além das características do reservatório (Agostinho *et al.*, 2004b).

A migração é de fundamental importância no sucesso reprodutivo de peixes reofílicos, pois permite a busca de determinadas condições, classificadas como ideais, para a fertilização de ovos (agregação reprodutiva), desenvolvimento nas fases iniciais de vida (oxigenação elevada e maior disponibilidade alimentar), e condições de baixas taxas de predação, devido à presença de uma água mais turva (Agostinho *et al.*, 2004a). São vários os parâmetros que estimulam as espécies de peixes a realizarem migração. Combinados a uma disposição genética, os principais fatores abióticos que influenciam na migração são luminosidade, temperatura, hidrologia e qualidade da água. O conjunto destes estímulos desencadeia uma corrida por locais mais

aptos aos processos reprodutivos, defensivos ou alimentares, sendo todos estes impedidos pelo barramento (Lucas e Baras, 2001).

A interrupção das rotas migratórias de algumas espécies, com fragmentação dos ambientes naturais, é em grande parte responsável pelo desaparecimento de várias espécies de peixes de piracema. No Brasil espécies com grande potencial para a pesca industrial e esportiva já apresentam uma redução acentuada em seus estoques naturais. Sirol e Britto (2005) destacaram uma depleção significativa de espécies emblemáticas no Alto do Rio Paraná como *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), *Paulicea lutkeni* (jaú), *Salminus brasiliensis* (dourado), *Salminus hilarii* (tabarana), *Megalonema platanus* (bagre prata) e *Hemisorubim platyrhynchus* (jurupoca), que antes eram encontradas por pescadores com certa facilidade, estão gradativamente desaparecendo, e quando capturadas, geralmente estão em suas formas jovens, e que possivelmente ainda não se reproduziram.

Várias alternativas estão sendo propostas nos últimos anos visando mitigar os impactos causados pelas construções de barragens, como por exemplo, a construção de canais artificiais auxiliares, porém este, e outros métodos esbarram em uma série de dificuldades. Para que ocorra o processo de piracema (migração na qual uma espécie sobe o rio, nadando contra a correnteza, para se reproduzir) em canais artificiais, deve se levar em conta parâmetros como, velocidade de deslocamento da água, turbulência, temperatura e concentrações de oxigênio dissolvido, rigorosamente semelhantes ao do ambiente natural, parâmetros estes difíceis de serem controlados em uma massa de água relativamente grande. Outra alternativa proposta foi a construção de escadas nos reservatórios, que facilitam a passagem de algumas espécies de grande porte, mais que impede espécies de pequeno porte de transpor os obstáculos devido a um menor porte físico (Rodriguez *et al.*, 2006). De acordo com Hildebrand *et al.*, (1980) a alternativa mais aceita para minimizar os impactos causados pelo processo de barramento é um maior investimento em pisciculturas de conservação, voltadas a programas de repovoamento.

A CESP (Companhia Energética de São Paulo), consciente dos impactos gerados pelo represamento, realiza trabalhos de repovoamento com espécies nativas desde o ano de 1981. As seis unidades hidroelétricas (Ilha

Solteira, Engenheiro Souza Dias, Engenheiro Sergio Motta, Três Irmãos, Paraibuna e Jaguari) da CESP mantêm duas estações de Hidrobiologia e Aquicultura (Engenheiro Souza Dias e Paraibuna), e no decorrer dos últimos anos introduziram alevinos de oito espécies diferentes de peixes nativos migradores nos rios da sua área de atuação (Torloni *et al.*, 1993).

Mesmo sendo a alternativa mais aceita para redução dos impactos causados pelo represamento, diversos fatores impedem a obtenção de resultados significativos em programas de repovoamento de espécies nativas no Brasil, dentre eles estão o baixo investimento no conhecimento da biologia básica das espécies, o que limita a sua produção em cativeiro. Sendo assim a parceria com centros de pesquisa para o fornecimento de dados da biologia da espécie, além da tecnologia de desenvolvimento e produção em cativeiro, tornam-se imprescindíveis (Sirol e Britto, 2005).

Alguns fatores são de fundamental importância para um programa funcional e efetivo de repovoamento. Para a seleção do período do ano para a soltura dos alevinos deve se levar em consideração as flutuações naturais que ocorrem nos ambientes, especialmente relacionados à sua conectividade com o corpo principal do rio ou reservatório, e as flutuações dos parâmetros físicos, químicos e biológicos. Para a seleção dos melhores locais de soltura, deve ser levada em conta, a biologia da espécie-alvo, a produtividade natural do ambiente em foco, o detalhamento da composição presas/predadores desse ambiente e as inter-relações com a espécie-alvo, exigindo assim um amplo conhecimento não só da biologia e zootecnia, mas também das interações ecológicas da espécie com o meio em que esta será reintroduzida (Sirol e Britto, 2005).

1.1. Região de Estudo

Com uma área de drenagem de 1889 km², a bacia Hidrográfica do Alto do Tiête, é composta pelos rios Tiête, Claro, Paraitinga, Biritiba Mirim, Jundiá e Taiaçupeba e pelos reservatórios Ribeirão do Campo, Ponte Nova, Jundiá, Taiaçupeba, Biritiba Mirim e Paraitinga (Sendacz *et al.*, 2005). O Rio Tiête pode ser considerado um dos rios de maior importância para o Estado de São Paulo, pois em toda sua extensão, suas águas são utilizadas tanto para a geração de energia elétrica, como para a irrigação dos cultivos agrícolas de vários

municípios (Torloni *et al.*, 1993). Toda a bacia forma o Sistema Produtor do Alto Tiête, que transfere a água do reservatório de Ponte Nova (derivada do rio Tiête) para uma estação elevatória, e em seguida por um sistema de canal-túnel, a água é transferida para o reservatório de Jundiaí, e posteriormente para o de Taiaçupeba onde é captada pela SABESP e redistribuída para a população (Sendacz *et al.*, 2005). Esta estrutura de distribuição conta com a presença de seis reservatórios, somente na bacia do Alto Tietê, o que prejudica de forma acentuada a dinâmica aquática nesta região.

1.2. Espécie modelo

A tabarana (*Salminus hilarii*), pertencente à classe Actinopterygii, família Characidae (ordem Characiformes) é uma espécie importante na bacia do Alto Tietê e apresenta um importante foco nos programas de repovoamento. É de hábito carnívoro, médio porte, e habita as bacias do Alto Paraná, São Francisco, Tocantins e do Alto Amazonas. Na bacia do Alto Tiête a tabarana pode ser considerada o teleósteo de maior porte, sendo topo de cadeia alimentar (Godoy, 1975). *S. hilarii* é migradora, potamódroma, piscívora e vive em ambientes bentopelágicos. Sua dinâmica migratória é considerada curta (ocorre em menos de 100 km), e o período reprodutivo ocorre entre os meses de setembro a fevereiro (Honji *et al.*, 2009). Sua estratégia reprodutiva é classificada como sincrônica em grupo, desovando apenas uma vez ao longo do período reprodutivo (Godoy, 1975). De acordo com Agostinho *et al.*, (2003) a migração reprodutiva da tabarana inicia-se com a estação de chuvas, período este em que os animais sobem o rio e se concentram em regiões rasas e claras para se reproduzirem

Devido a estas características migratórias os estoques naturais de tabaranas sofreram uma redução significativa, graças principalmente à construção de barragens no curso de diversos rios da bacia, impedindo o processo de reprodução desta espécie (Honji *et al.*, 2009).

Com seu estoque natural praticamente esgotado, o repovoamento surge como opção direta para a manutenção desta espécie no Alto Rio Tiête, e técnicas e conhecimentos dos processos de reprodução e larvicultura são imprescindíveis para uma maior sobrevivência das larvas, resultando assim em um maior número de alevinos.

Honji *et al.*, (2011) descreveram o processo de desova induzida em cativeiro de *S. hilarii*, utilizando reprodutores de ambiente natural e de cativeiro, e observaram que os oócitos apresentaram coloração diferente nos dois ambientes, sendo que os oócitos das fêmeas nascidas em cativeiro apresentaram uma coloração verde-azulada, enquanto os oócitos obtidos das fêmeas vindas do ambiente natural eram bem esverdeados, indicando possíveis alterações advindas da mobilização de substratos energéticos. Outras diferenças marcantes entre animais de ambiente natural e de cativeiro foram observadas, como as características dos oócitos vitelogênicos, pois tabaranas confinadas em cativeiro produzem um número menor de oócitos, mas de maior diâmetro, quando comparadas com os animais coletados em ambiente natural (Honji *et al.*, 2009). Essas diferenças encontradas nos ovários de fêmeas de tabarana, de ambiente natural e cativeiro, podem refletir diretamente em um maior ou menor sucesso reprodutivo no cativeiro, sendo necessários diversos estudos zootécnicos e fisiológicos para uma maior produção de juvenis desta espécie.

Figura 1 – Rio Tiête, região de coleta do G1.

Figura 2 – Piscicultura da Ponte Nova (DAEE), local de coleta do G2.

Figura 3 – Exemplar adulto de 40 centímetros de *Salminus hilarii* (Linnaeus, 1758).

1.3. Controle hormonal e mobilização de substratos energéticos

A reprodução nos vertebrados é diretamente controlada por uma série de reações hormonais, moduladas por diferentes fatores ambientais, como a temperatura, fotoperíodo e regime pluviométrico. Alterações nessas variáveis são captadas por órgãos sensoriais como os olhos e o órgão da pineal que convertem estes estímulos em sinais eletroquímicos, que via neurônios são transmitidos até uma região encefálica denominada hipotálamo, estimulando a síntese e liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). O GnRH por sua vez estimula as células gonadotrópicas presentes na hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo estimulante (FSH) que via corrente sanguínea chega aos oócitos em desenvolvimento convertendo o colesterol em testosterona. A testosterona é aromatizada pela enzima aromatase em 17 β -estradiol que age no fígado promovendo a síntese da molécula de vitelogenina, que via corrente sanguínea é incorporada no oócito por micropinocitose, promovendo o crescimento e maturação do oócito. Em uma segunda fase do desenvolvimento os altos níveis de 17 β -estradiol e testosterona inibem a síntese de FSH, e juntamente com a ação do GnRH estimulam a síntese do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise. O LH tem ação nos ovários modulando a produção do hormônio indutor da maturação final e da ovulação (MIS), que rompe a folículo ovariano fazendo com que os oócitos sejam liberados e depositados na cavidade abdominal da maioria das espécies de peixes, tornando o animal apto aos processos reprodutivos (Nagahama, 1994; Nagahama, 1999; Peter e Yu, 1997; Blázquez *et al.*, 1998).

Sendo assim um dos processos mais importantes envolvidos na reprodução é a vitelogênese. A vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína, formada principalmente por proteínas e lipídios, que nos oócitos é clivada em proteínas do vitelo, sendo estas a lipovitelina e a fosvitina (Wiley e Wallace, 1981; Davis *et al.*, 2007).

A composição dos substratos energéticos que formam a vitelogenina tem sido utilizada para avaliar o perfil de mobilização energética dos reprodutores para a prole, podendo esta mobilização influenciar no sucesso de vida das larvas, já que estas irão nutrir-se exclusivamente desta reserva durante todo o período de alimentação endógena (saco vitelínico), que pode variar de horas até semanas dependendo da espécie e do ambiente em que

ela vive. Alguns fatores como padrão alimentar dos reprodutores, o confinamento e a bagagem genética, influenciam diretamente no desenvolvimento embrionário, já que determinam a quantidade e qualidade dos substratos mobilizados para a formação da vitelogenina (Bromage, 1995).

Um dos principais substratos mobilizados em condições de demanda energética são os lipídios, que são formados por suas estruturas primárias denominada de ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas contendo de 4 a 36 átomos de carbono, mas a maioria encontrada na natureza apresenta 16 ou 18, chegando até 22 carbonos. Esta cadeia pode ser totalmente saturada (ácidos graxos saturados - SAT), conter uma insaturação (ácidos graxos monoinsaturados - MUFA) ou mais insaturações (ácidos graxos polinsaturados - PUFA) (Kakela *et al.*, 1995; Nelson e Cox, 2005).

Como dito anteriormente os lipídios constituídos pelos ácidos graxos são mobilizados do tecido adiposo dos peixes durante a maturação gonadal e transferidos pelo plasma para o fígado, onde serão reorganizados na vitelogenina (Bromage, 1995). Níveis inadequados de ácidos graxos essenciais em uma dieta podem comprometer a formação de estruturas nas membranas celulares, causando uma maior incidência de deformações nos tecidos das larvas (Hamza *et al.*, 2008). Para um crescimento normal nos peixes, incluindo desenvolvimento e reprodução, são necessários principalmente três tipos de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) com longas cadeias de carbonos, são eles, ácidos docosahexanóico (DHA, C22:6n3), ácido eicosapentanóico (EPA, C20:5n3) e ácido araquidônico (AA, C20:4n6) (Sargent *et al.*, 2001). O AA é precursor de vários eicosanóides como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que em peixes podem influenciar em processos de crescimento, vitelogênese, reprodução e regulação de respostas imune (Bell e Tocher, 1995), já o EPA e o DHA, participam de processos reprodutivos influenciando na concentração de hormônios esteróides gonadais, além de serem importantes componentes de membranas celulares, principalmente de tecidos nervosos e visuais (Sorbera *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002; Schreiner *et al.*, 2005).

Em peixes de águas continentais esses ácidos graxos de cadeia longa e altamente insaturados, como o DHA, EPA e AA, não podem ser obtidos

diretamente da alimentação, pois não são encontrados em sua cadeia trófica, sendo então sintetizados a partir de dois ácidos graxos essenciais, o ácido linoléico (C18:2n6; LA) precursor do AA, e o ácido alfa-linolênico (C18:3n3; LNA) precursor do EPA e DHA. Esta síntese dos ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) a partir de seus precursores é modulada pela atividade de dois grupos enzimáticos, as enzimas dessaturases, que têm como principal função a inserção de insaturações nas moléculas de ácido graxos, e as elongases que inserem um par de átomos de carbonos nestes ácidos graxos (Figura 3). A grande deposição de DHA, EPA e AA nos fosfolipídios de ovos e larvas, evidenciam as funções estruturais desses ácidos graxos, principalmente em fases de desenvolvimento inicial onde ocorrem grande diferenciação e desenvolvimento celular.

Figura 4. Processo de dessaturação e elongação de ácidos graxos a partir dos ácidos alfa-linolênico (C18:3n3) e linoléico (C18:2n6) (Zheng *et al.*, 2004). As enzimas dessaturases são representadas por Δ6, Δ5 e Δ4, e as elongases por E1, E2, E3.

O conhecimento da composição bioquímica dos ovos e larvas, pode inferir nas necessidades nutricionais futuras que esses animais irão demandar ao longo do seu desenvolvimento, além de possibilitar uma avaliação das dietas oferecidas aos reprodutores. Outra grande vantagem da avaliação bioquímica dos períodos da vida iniciais dos peixes com interesse de produção, seja para comercialização ou conservação, é a definição de qual grupo de reprodutores devem ser utilizados na produção de larvas, selvagens ou domesticados, já que de acordo com Araki *et al.*, (2007), os efeitos genéticos

causados pela domesticação, mesmo em poucas gerações, podem influenciar diretamente no sucesso reprodutivo dos animais em cativeiro.

2. Referências

- Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Júlio HF (2003) Migratory fish from the upper Paraná River Basin, Brazil. In: Carosfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A, Ross C (ed) *Migratory Fishes of South America: Biology, Social Importance and Conservation Status*. World Fisheries Trust, Victory
- Agostinho AA, Gomes LC, Latini JD (2004a) Fisheries management in Brazilian reservoirs: lessons from/for South America. *Interciência* 29:334-338
- Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC (2004b) Threats for biodiversity in the floodplain of the Upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. *Ecohydrology & Hydrobiology* 4(3):255-256
- Agostinho AA, Gomes LC (ed) (2005) *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros do Brasil*. EDUEM, Maringá
- Araki H, Cooper B, Blouin MS (2007) Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318:100-103
- Bell MV, Tocher DR (1995) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: General pathways and new directions. In: Arts MT, Bret MT, Kainz MJ (ed) *Lipids in aquatic ecosystems*. 3rd edn. Springer Science. New York
- Blázquez M, Bosma PT, Fraser EJ, Van Look KJW, Trudeau VL (1998) Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp Biochem Physiol* 119(a):345-364
- Bromage N (1995) Broodstock management and seed quality. In: Bromage N and Roberts RJ (ed) *Broodstock management and egg and larval quality*, Blackwell Science Ltd. University Press, Cambridge

- Davis LK, Hiramatsu N, Hiramatsu K, Reading BJ, Matsubara T, Hara A, Sullivan CV, Pierce AL, Hirano T, Grau EG (2007) Induction of three vitellogenins by 17 β -estradiol with concurrent inhibition of the growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Biol of Reprod* 77:614–625
- Godoy MP (1975) Peixes do Brasil – subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi-Guaçu. Piracicaba: Editora Franciscana, São Paulo
- Hamza N, Mhetli M, Khemis IB, Cahu C, Kestemont P (2008) Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture* 275:274-282
- Hildebrand SG, Bell MC, Richey EP, Anderson JJ (1980) Analysis of environmental issues related to small-scale hydroelectric development. In: Design and consideration for passing fish upstream around dams. Environmental Services Division OAK, Battele
- Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG (2009) Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiol Biochem* 35:109-123
- Honji RM, Mello PH, Araújo BC, Rodrigues-Filho JA, Hilsdorf AWS, Moreira RG (2011) Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): Implications for the conservation of this species. *Neotropical Ichthyology* doi: 10.1590/S1679-62252011005000012

- Kakela R, Ackman RG, Hyvarinen H (1995) Very long chain polyunsaturated fatty acids in the blubber of ringed seals (*Phoca hispida botnica*) from lake Saimaa, lake Lladoga, the Baltic Sea, and Spitsbergen. *Lipids* 30:319-325
- Lewinsohn TM, Prado PI (ed) (2002) Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual de conhecimento. Editora Contexto, São Paulo
- Lucas MC, Baras E (ed) (2001) Migration of freshwater fishes. Blackwell Science, London
- Moreira RG, Venturieri RLL, Mimura OM (2002) Lipid and protein alteration in the liver and plasma of the migratory teleost *Salminus maxillosus* during the reproductive cycle. *J Aqua Trop* 17(3):209-219
- Nagahama Y (1994) Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The Internat J Develop Biol* 38:217-229
- Nagahama Y (1999) Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: International Symposium on Reproductive Physiology of fish, 6, Bergen. Proceedings. University of Bergen, Bergen, 1999
- Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger: Principles of Biochemistry. Freeman, New York
- Peter RE, Yu KL (1997) Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. *Rev Fish Biol Fish* 7:173-197
- Rodríguez TT, Agudo JP, Mosquera LP, González EP (2006) Evaluation vertical-slot fishway designs in terms of fish swimming capabilities. *Ecol Engin* 12:37-48

- Sargent JR, Bell MV, Henderson RJ, Tocher DJ (2001) The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. *Aquaculture* 43:103-124
- Schaefer SA (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinho (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (1 ed) *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. 3rd edn EDIPUCRS, Rio Grande do Sul
- Schreiner M, Andrade VXL, Moreira RG, Scorvo-Filho JD, Romagosa E (2005) The influence of diet on the fatty acid composition of lipid storage tissues of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) (Pisces: Teleostei) reared in cages. In: *Proc 26th World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research*. Praga, 2005
- Sendacz S, Junior AJM, Mercante CT, Menezes LCB, Moraes JF (2005) Sistemas em cascata: Concentrações e cargas de nutrientes no Sistema Produtor Alto Tietê, São Paulo. In: Nogueira MG, Henry R, Jorcin A (2 ed) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. 3rd edn. Rima, São Paulo
- Sirol RN, Britto SG (2006) Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira MG, Henry R, Jorcin A (2 ed) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. 3rd edn. Rima, São Paulo
- Sorbera LA, Astuarino JF, Carrilo M, Zanuy S (2001) Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocytes maturation in a marine teleost, the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 64:382-389

- Torloni CEC, Corrêa ARA, Junior AAC, Santos JJ, Gonçalves JL, Gereto EJ, Cruz JA, Moreira JA, Silva DC, Deus EF, Ferreira AS (1993) Produção pesqueira e composição das capturas em reservatórios sob concessão da CESP nos rios Tiête, Paraná e Grande no período de 1986 a 1991. Série Produção Pesqueira CESP, São Paulo
- Tundisi JG (2003) Água no século XXI: enfrentando a escassez. RIMA, São Carlos
- Wiley HS, Wallace RA (1981) The structure of vitellogenin: Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple form of the yolk proteins. J Biochem 258:8626-8634
- Zheng X, Tocher DR, Dickson CA, Bell JG, Teale AJ (2004) Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acids biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 236:467-483

CAPÍTULO 2

Lipídios, Proteínas e morfologia de ovos e larvas

Resumo

Os lipídios e as proteínas são os principais constituintes da vitelogenina, molécula fundamental para o desenvolvimento embrionário e larval em peixes. A composição da vitelogenina pode ser influenciada por diversos fatores como, a alimentação dos reprodutores, as condições de confinamento e o aporte genético, e essas condições influenciam em um adequado desenvolvimento da prole. O principal intuito deste estudo foi de investigar a influência dos processos de domesticação no perfil quantitativo de substratos energéticos (lipídios e proteínas), e no desenvolvimento embrionário e larval da tabarana (*Salminus hilarii*). Para este trabalho foram considerados dois grupos de fêmeas, do ambiente natural (G1), composto por animais capturados no rio Tiête e seus afluentes e mantidos em piscicultura por 3 anos, e cativeiro (G2) composto por animais nascidos em piscicultura com idade de 3 anos. A dieta e a condição de confinamento dos animais foram mantidas padronizadas com intuito de se excluir essas variáveis. Os animais foram induzidos hormonalmente à reprodução e seus ovos e larvas tiveram sua concentração lipídica e protéica quantificadas. O desenvolvimento embrionário e larval foi acompanhado com a intenção de verificar possíveis alterações morfológicas entre os grupos. Foi observada uma alteração estatisticamente significativa na concentração lipídica entre as larvas dos dois grupos, sendo esta diferença atribuída a um maior consumo alimentar das larvas do G1 em 214 horas após a desova (HAD). As larvas do G1 apresentaram um pico elevado na concentração de proteínas em 28 HAD, sugerindo uma grande deposição deste substrato na musculatura das larvas para atividades locomotoras iniciais. Este aumento ocorre também nas larvas do G2, porém tardiamente (32 HAD) quando os ovos já haviam eclodido. As principais alterações morfológicas observadas foram um maior comprimento total (16 e 48 HAD) e da boca (66 HAD) das larvas do G1, podendo essas alterações, juntamente com as alterações metabólicas, estarem relacionadas a uma memória genética diferenciada deste grupo.

Palavras-chave: confinamento, desenvolvimento, metabolismo, morfologia, desenvolvimento, *Salminus hilarii*.

Abstract

The lipids and proteins are the main constituents of vitellogenin, essential for the embryonic and larval development in fish. The composition of vitellogenin can be influenced by several factors such as the broodstock nutrition, the conditions of confinement and the genetic input, and these conditions influence in an adequate development of the offspring. The main purpose of this study was to investigate the influence of the processes of domestication in the quantitative pattern of energetic substrate (lipids and proteins) and in the embryonic and larval development of tabarana (*Salminus hilarii*). For this work we considered two groups of females, the wild (G1), composed of animals caught in the Tietê river and its tributaries and kept for 3 years in fish farm and captivity group (G2) comprised by 3 years old animals born in the fish farm. The diet and the condition of confinement of the animals were kept standardized aiming to exclude these variables. The animals were hormonally induced to reproduce and their eggs and larvae had their lipid and protein concentration quantified. Embryonic and larval developments were accompanied with the intent to investigate possible morphological changes between groups. We observed a significant change in lipid concentration between larvae from both groups, being this difference attributed to higher food consumption of larvae from G1 in 214 hours after spawning (HAS). The larvae from G1 had a high protein concentration peak at (28 HAS) suggesting a high accumulation of this substrate in the muscle necessary to early swimming. This increased protein concentration also occurred in G2 larvae, but lately (32 HAS) when the eggs had already hatched. The main morphologically alterations observed were a greater length of larvae (16 and 48 HAS) and larvae mouth (66 HAS) of G1 and these changes, together with the metabolic alterations, can be related to a genetic memory of this distinguished group.

Keywords: confinement, development, metabolism, morphology, *Salminus hilarii*.

1. Introdução

Dentre os principais processos presentes no período embrionário em peixes pode-se destacar o crescimento, diferenciação tecidual, alterações fisiológicas e consequentemente alterações nas exigências nutricionais e na mobilização de substratos fundamentais. Todos estes processos acompanham e influenciam no padrão das mudanças morfofisiológicas decorrentes do desenvolvimento (Bromage, 1995).

Para uma maior compreensão dos processos ontogenéticos, desde o momento da fertilização até a fase de juvenil se faz necessário o conhecimento dos recursos energéticos mobilizados da fêmea para a prole, assim como a utilização desses recursos pelos ovos e larvas a cada fase do desenvolvimento (Tocher *et al.*, 1989). Durante o processo de maturação gonadal, as fêmeas mobilizam substratos energéticos de vários tecidos como fígado, músculo e tecido adiposo e os reorganizam em uma molécula glicolipofosfoprotéica denominada vitelogenina, que via corrente sanguínea é incorporada no oócito, e irá suprir o embrião em toda a fase de alimentação endógena (Kamler, 2008). Aproximadamente 79% da molécula de vitelogenina é formada por proteínas e 19% formada por lipídios, sendo estes substratos responsáveis pela conversão de energia metabólica, além de fornecer substrato estrutural (formação de tecido) durante estas fases de intensas transformações (Jalabert, 2005).

Para que ocorra um adequado desenvolvimento é necessário um grande aporte protéico, que será depositado na musculatura do animal promovendo o seu crescimento. As proteínas desempenham ainda outra função fundamental, a de geração de energia química na forma de ATP, já que em peixes a mobilização de reservas energéticas se dá primeiramente pelas proteínas, seguidos por lipídios e carboidratos, diferente de mamíferos que mobilizam primeiramente carboidratos (Mommensen, 2001).

Assim como as proteínas, os lipídios desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento de ovos e larvas de peixes. Segundo Watanabe *et al.*, (1985) de todos os componentes da dieta dos reprodutores os lipídios são os substratos que mais interferem na composição e na qualidade dos ovos, podendo interferir diretamente no sucesso da prole.

Os lipídios podem ser divididos em dois grupos: lipídios neutros, que possuem afinidade por solventes neutros, como por exemplo, o clorofórmio e o benzeno, e os lipídios polares, que possuem afinidade por solventes polares como o etanol e o metanol. Os lipídios neutros, também conhecidos como triglicérides são constituídos por três longas cadeias de ácidos graxos ligados a um glicerol e atuam como principal fonte de armazenamento de energia, e também como reserva temporária de importantes ácidos graxos. Os lipídios polares, ou fosfolipídios são formados por duas cadeias de ácidos graxos, geralmente um ácido graxo monoinsaturado e outro polinsaturado, e são os principais responsáveis pela formação das membranas biológicas, e sua composição varia de acordo com a especificidade do tecido em que este se encontra (Tocher *et al.*, 1989).

No decorrer dos últimos anos muito se tem discutido a respeito da mobilização e da utilização de substratos em ovos e larvas de acordo com a dieta oferecida aos reprodutores, e da influência de diversos fatores ambientais como a temperatura, fotoperíodo e pH nas fases iniciais do desenvolvimento em peixes, porém Araki *et al.*, (2007) atentam para outro fator que pode interferir diretamente no processo de produção em cativeiro, a bagagem genética, que mesmo em poucas gerações pode prejudicar o sucesso reprodutivo e consequentemente interferir na sobrevivência larval.

O presente trabalho tem por objetivo analisar a influência dos processos de domesticação no metabolismo e na morfologia dos ovos e larvas de tabarana, provenientes de fêmeas de ambiente natural e cativeiro, excluindo-se a variável alimentação, e fatores ambientais, já que os dois grupos foram mantidos sobre o mesmo regime alimentar, e sobre as mesmas condições de cultivo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Delineamento experimental

2.1.1. Manutenção dos grupos

Para a realização do presente estudo foi utilizado como modelo a espécie tabarana (*Salminus hilarii*), proveniente de ambiente natural (G1) e cativeiro (G2).

As fêmeas do G1 foram capturadas com pesca artesanal no rio Tietê e seus afluentes, entre as cidades de Mogi das Cruzes e Biritiba Mirim, e foram mantidas na Piscicultura da Barragem da Ponte Nova por aproximadamente 3 anos. As fêmeas do G2 (linhagem F2) nasceram na piscicultura da Ponte Nova e possuíam 3 anos de idade. Os dois grupos foram mantidos em tanques escavados de 300m² cada, e receberam o mesmo padrão alimentar constituído de ração comercial extrusada para peixes carnívoros, contendo 40% de proteína bruta. As condições de confinamento também foram padronizadas para os dois grupos.

Todas as coletas foram realizadas na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, localizada na cidade de Salesópolis, São Paulo, sobre responsabilidade do DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica).

2.1.2. Indução hormonal e reprodução

Para o processo de reprodução induzida foi utilizado um grupo de machos provenientes apenas de cativeiro, que foram escolhidos de acordo com a fluidez e a coloração de seu sêmen. Para a seleção das fêmeas foram levadas em conta características externas como, maior rigidez e volume do abdômen, e inchaço do poro urogenital (Baldisserotto, 2005). O período escolhido para a indução à reprodução foi o mês de janeiro de 2009, de acordo com os estágios de maturação gonadal da espécie descrito por Honji *et al.*, (2009).

Uma vez selecionadas, essas matrizes foram transferidas para o laboratório e acomodadas em tanques de 3.600 litros, onde foram submetidas ao protocolo convencional de indução hormonal (Honji *et al.*, 2011), que consiste na aplicação de duas doses intraperitoniais de extrato de hipófise de

carpa (EHC), sendo a primeira dose, considerada preparatória de 0,5 mg de EHC/Kg de fêmea, e a dose efetiva de 5mg de EHC/kg de fêmea, diluídas em solução de cloreto de sódio à 0,9%. O intervalo entre as duas doses foi de 10 horas. Os machos receberam apenas uma dose de 2 a 3 mg EHC/Kg de macho, (dependendo do grau de maturidade), coincidindo com o momento da segunda dose das fêmeas.

Após a segunda dose das fêmeas e a dose única nos machos os animais foram colocados nos tanques em uma proporção de 1 fêmea para 3 machos, o fluxo de água foi aumentado para que ocorresse a liberação dos gametas e consequentemente a fertilização. A temperatura e o pH foram monitorados constantemente.

A desova ocorreu naturalmente nos tanques e os ovos das fêmeas do G1 e G2 foram transferidos para incubadoras cônicas de 60L, onde foram mantidos por 3 dias até o aparente término da reabsorção do saco vitelínico. Após este período as larvas foram transferidas para caixas de 1.000 litros onde permaneceram até o término do experimento (9 dias). Durante todo o período de alimentação exógena as larvas foram alimentadas unicamente com náuplios de *Artemia* sp.

2.2. Coleta das amostras

Com o auxílio de uma peneira as larvas foram coletadas no tanque e transferidas para frascos contendo formol, para posteriormente serem processadas e analisadas por microscopia de luz. Para as análises metabólicas os ovos e larvas foram transferidos para criotubos de 2 ml que eram instantaneamente congelados em nitrogênio líquido, e transferidos para o laboratório onde foram armazenados em freezer -80°C até a data do processamento. Foram coleados 4 criotubos por amostra de cada período experimental.

Foram realizadas 12 coletas de cada grupo divididas em três fases de desenvolvimento:

- a) Fase de ovo: 0, 8, 16 e 28 horas após a desova (HAD);
- b) Fase de alimentação endógena (saco vitelínico): 32, 48, 66 e 96 HAD;
- c) Alimentação exógena: 102, 118, 166 e 214 HAD.

2.3. Análises Bioquímicas

2.3.1. Extração de lipídios totais

As amostras foram pesadas e homogeneizadas em solução contendo clorofórmio, metanol e água em uma proporção de 2:1:0,5 (Folch *et al.*, 1957). O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 rpm por 5 minutos, e através da técnica de dupla pipeta a fase líquida contendo os lipídios foi retirada e transferida para um novo recipiente. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, com adição de mais 1 ml de clorofórmio para remoção completa dos lipídios. Após esta etapa todo o solvente foi evaporado pela exposição da amostra a uma atmosfera de nitrogênio, e o extrato lipídico seco foi armazenado em freezer para análises posteriores.

2.3.2. Quantificação dos lipídios totais

Para a quantificação dos lipídios foi utilizado o método colorimétrico descrito por Frings *et al.*, (1972), utilizando como padrão óleo de fígado de bacalhau (*Cod liver oil fatty acid methyl esters*, SIGMA). A amostra foi ressuspensa com clorofórmio e uma pequena alíquota foi transferida para tubos de ensaios que foram mantidos em estufa a 70°C por 15 minutos para a evaporação completa do solvente. Foi então adicionado ácido sulfúrico concentrado ao extrato lipídico e este colocado em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Após o resfriamento foi acrescentada sulfosfovanilina e os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após estes procedimentos as amostras foram analisadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm.

2.3.3. Extração de proteínas totais

As proteínas totais foram extraídas após precipitação e solubilização segundo Milligan e Girard (1993). As amostras foram pesadas e homogeneizadas com 5 volumes (5 vezes o peso da amostra) da solução de PCA (ácido perclórico) e centrifugadas a 11.100 rpm por 5 minutos. O precipitado foi suspenso em 4 volumes de PCA e o processo de centrifugação foi repetido por 3 vezes. Por fim foram adicionados 14 volumes de KOH

(hidróxido de potássio) e o precipitado foi mantido por 24 horas em agitação constante em temperatura ambiente.

2.3.4. Quantificação das proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais foi utilizado o método colorimétrico de Lowry *et al.*, (1951). O precipitado originado da extração foi diluído de 10 a 200 vezes em água destilada, dependendo da fase de desenvolvimento do ovo e da larva. O volume diluído foi transferido para tubos de 2 ml e adicionado 100 µl de mistura reativa (hidróxido de sódio, carbonato de sódio, tartarato de sódio e potássio e sulfato de cobre), seguido da adição de 100 µl de solução de Folin-Ciocalteu (1:1). Após 30 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 660nm. Para o cálculo da concentração de proteínas totais foi utilizado um padrão de albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*, Sigma Diagnostics).

2.4 Análises morfométricas

Para as análises morfológicas as amostras foram fixadas inicialmente em solução de Bouin acético (75% de ácido pícrico, 20% de formol e 5% de ácido acético glacial) por 24 horas. Após este tempo as amostras foram lavadas em água corrente, para retirara do excesso de Bouin, e armazenadas em álcool 70% até a data do processamento do material. A análise do material foi realizada com um estéreo microscópio (Leica S6D) com sistema de captura de imagens (Leica *Application Suite Professional*).

2.5. Análises dos resultados – Análises estatísticas

As fases do desenvolvimento, assim como comparações entre os grupos foram submetidas a teste de Análise de Variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste *Student Newman-Keuls* do software *Sigma Stat* versão 3.1 para *Windows*.

3. Resultados

3.1. Composição de ovos e larvas

3.1.1. Peso Seco

As amostras de ovos apresentaram uma maior quantidade de água no momento da pesagem, comparado com as amostras de larvas. As tabelas 1, 2 e 3 representam a porcentagem de matéria seca de todas as amostras do experimento.

Tabela 1. Porcentagem de matéria seca nas amostras de ovos de *S. hilarii*.

Horas Após a Desova	G1	G2
	Matéria seca (%)	Matéria seca (%)
0	1,85±0,53	1,87±0,39
8	1,91±0,44	2,01±0,47
16	2,73±0,55	2,43±0,62
28	2,58±0,72	3,27±0,80

Tabela 2. Porcentagem de matéria seca nas amostras de larvas de *S. hilarii* durante o período de alimentação endógena.

Horas Após a Desova	G1	G2
	Matéria seca (%)	Matéria seca (%)
32	13,33±3,21	11,04±2,20
48	10,00±1,92	11,43±2,70
66	6,80±1,20	3,17±1,10
96	5,28±2,10	3,67±0,70

Tabela 3. Porcentagem de matéria seca nas amostras de larvas de *S. hilarii* durante o período de alimentação exógena.

Horas Após a Desova	G1	G2
	Matéria seca (%)	Matéria seca (%)
102	4,95±1,10	6,80±1,40
118	5,50±0,60	4,50±1,20
166	11,11±2,70	11,00±2,30
214	1,24±0,40	5,83±2,00

3.1.2. Lipídios Totais

A figura 5A exibe um padrão semelhante na concentração dos lipídios nos dois grupos em todo o período de desenvolvimento do ovo, não ocorrendo nenhuma diferença significativa nesta fase ($P>0,05$). Na fase de alimentação endógena (saco vitelínico) ocorreu uma alteração significativa ($P<0,05$), na qual as larvas dos dois grupos apresentaram uma queda na concentração de lipídios de 21 para 10 mg/g, de 32 HAD para 48 HAD. Após 48 HAD a concentração lipídica se estabilizou (Figura 5B).

Durante a alimentação exógena, composta unicamente por náuplios de *Artemia* sp., as larvas do G1 não apresentaram nenhuma alteração significativa no decorrer do desenvolvimento. Já nas larvas do G2 houve um aumento de 118 para 166 HAD ($P<0,05$), quando a concentração de lipídios passou de 3 para 5 mg/g, e com 214 HAD os valores neste grupo voltaram a se estabilizar. Em 214 HAD as larvas do G1 apresentaram uma maior concentração lipídica ($P<0,05$) comparada às larvas do G2, sendo esta a única alteração encontrada entre os dois grupos experimentais nos três períodos de desenvolvimento da prole (ovo, saco vitelínico e alimentação exógena) (Figura 5C).

3.1.3. Proteínas totais

Durante a fase de desenvolvimento do ovo o G1 não apresentou nenhuma alteração até 16 HAD, porém em 28 HAD houve um aumento acentuado na concentração protéica neste grupo, sendo que os valores passaram de aproximadamente 30 para 170 mg/g, consistindo em uma alteração estatisticamente significativa ($P<0,05$). Já no G2 os valores não se alteram durante o desenvolvimento ($P>0,05$). Esse grande aumento encontrado no G1 gerou uma diferença entre os dois grupos experimentais ($P<0,05$), sendo esta a única alteração encontrada entre os grupos nas três fases do desenvolvimento (Figura 6A).

Na fase de consumo do saco vitelínico os dois grupos apresentaram uma queda na concentração de proteínas totais das larvas, ($P<0,05$) de 32 HAD para 48 HAD, passando de 151 para 79 mg/g no G1, e 248 para 124mg/g no G2, e a partir deste período os dois grupos não apresentaram flutuações na concentração das proteínas até o término desta fase (96HAD) ($P>0,05$) conforme apresentado na figura 6B.

Durante a fase de alimentação exógena as larvas do G1 apresentaram um aumento ($P<0,05$) na concentração das proteínas totais em 166 HAD, quando os valores passaram de 78 para 171 mg/g, e a partir deste período não foi observada nenhuma alteração neste grupo. No G2 os valores foram estáveis até 166 HAD e com 214 HAD houve uma elevação significativa de 153 para 278 mg/g ($P<0,05$) (Figura 6C.).

3.2. Morfologia

A figura 7A representa o padrão de crescimento durante as três fases de desenvolvimento dos dois grupos de *S. hilarii*. Foram observadas duas diferenças estatisticamente significativas com o decorrer do desenvolvimento ($P<0,05$), em 16 HAD, onde os ovos do G1 apresentaram um maior diâmetro (média de 3,82 mm), quando comparado ao G2 (média de 3,58 mm), e em 48HAD, quando da mesma forma o comprimento das larvas do G1 foi maior que o G2 (5,40 e 5,22 mm respectivamente).

3.2.1. Desenvolvimento dos ovos e larvas

A primeira coleta (0 HAD) ocorreu com os ovos fertilizados, já que a desova foi do tipo semi-natural e foi observado o estágio de 4 blastômeros (Figuras 8A e B). Com 8 HAD o embrião apresentava indício da formação da região cefálica e caudal, sendo possível também a caracterização da região do saco vitelínico (Figuras 8C e D). Na coleta realizada com 16 HAD foi observado o destacamento caudal e a formação bem caracterizada da cabeça e do saco vitelínico (Figuras 8E e F). Em 28 HAD os ovos estavam prestes a eclodir, e as larvas possuíam nadadeiras bem formadas, cabeça e calda prontas e bem delimitadas e com um saco vitelínico relativamente menor do que o observado em 16 HAD (Figuras 8G e H).

Aproximadamente com 32HAD ocorreu a eclosão dos ovos, sendo que as larvas apresentavam todas as nadadeiras bem formadas, e na região cefálica foi possível observar a região ocular pouco pigmentada, e uma região bucal ainda ventral e pouco desenvolvida (Figuras 9A e B). Com 48 HAD as larvas apresentaram maior definição das estruturas cefálicas, principalmente dos olhos, e da boca que passou da região ventral para a região anterior do animal, além da formação do poro urogenital (Figuras 9C e D). Em 66 HAD foi

possível observar a total pigmentação dos olhos, e a abertura da boca, sendo notado ainda um saco vitelínico bem menor em relação à coleta anterior (Figura 9E e F). No último estágio de alimentação endógena (96 HAD) as larvas praticamente não apresentavam mais saco vitelínico, as fendas branquiais estavam bem definidas, indicando funcionalidade, e a região cefálica foi proporcionalmente menor ao da coleta anterior e bem pigmentada (Figura 9G e H).

No início da alimentação exógena (102 HAD) as larvas não apresentaram mais indício de saco vitelínico, os olhos estavam totalmente pigmentados, e houve constatação da presença do trato digestório funcional devido principalmente a presença de conteúdo estomacal, e de excrementos na região do poro urogenital (Figuras 10A e B). Até 214 HAD foram observadas poucas alterações morfológicas, sendo as mais significativas a estruturação da nadadeira caudal, e um afilamento na região bucal. Nesta fase foi observado um crescimento acelerado, principalmente a partir de 118 HAD (Figuras 10C a H).

Não foi observada nenhuma alteração significativa da área do saco vitelínico durante todo o seu consumo, que visualmente ocorreu de 32 HAD até 66 HAD (Figura 7B).

No período de 66 HAD, que foi considerado o início de abertura da boca, as larvas do G1 apresentaram uma média de 0,62 mm de comprimento da boca, enquanto que nas larvas do G2 o comprimento foi em média de 0,47 mm sendo estas diferenças significativas ($P < 0,05$) (Figura 7C).

Figura 5. A) Lipídios totais (miligramas de lipídios/grama de tecido) dos ovos de *Salminus hilarii* do G1 e G2 com 0, 8, 16 e 28 HAD. **B)** Lipídios totais das larvas do G1 e G2 com 32, 48, 66 e 96 HAD. **C)** Lipídios totais das larvas do G1 e G2 com 102, 118, 166, 214 HAD.

^A, ^B, ^{AB} – Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes no mesmo grupo no decorrer do desenvolvimento.

* - Símbolo representa valores estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais G1 e G2 na mesma coleta.

FIGURA 5

Figura 6. A) Proteínas totais (miligramas de lipídios/grama de tecido) dos ovos de *Salminus hilarii* do G1 e G2 com 0, 8, 16 e 28 HAD. **B)** Proteínas totais das larvas do G1 e G2 com 32, 48, 66 e 96 HAD. **C)** Proteínas totais das larvas do G1 e G2 com 102, 118, 166, 214 HAD.

^A, ^B, ^{AB} – Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes no mesmo grupo no decorrer do desenvolvimento.

* - Símbolo representa valores estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais G1 e G2 na mesma coleta.

FIGURA 6

Figura 7. A) Média do comprimento dos ovos e larvas de *Salminus hilarii* com 0, 8, 16, 28, 32, 48, 66, 102, 118, 166 e 214 HAD. **B)** Média da área do saco vitelínico de *Salminus hilarii* (mm²) com 32, 48, 66 e 96 HAD. **C)** Média do comprimento da boca (milímetros) das larvas de *Salminus hilarii* do G1 e G2 com 66 HAD.

^A, ^B, ^{AB} – Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes no mesmo grupo no decorrer do desenvolvimento.

* - Símbolo representa valores estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais G1 e G2 na mesma coleta.

FIGURA 7

Figura 8. **A)** Ovo de *Salminus hilarii* do G1 com 0 HAD. **B)** Ovo do G2 com 0 HAD. **C)** Ovo do G1 com 8 HAD. **D)** Ovo do G2 com 8 HAD. **E)** Ovo do G1 com 16 HAD. **F)** Ovo do G2 com 16 HAD. **G)** Ovo do G1 com 28 HAD. **H)** Ovo do G2 com 28 HAD.

FIGURA 8

Figura 9. **A)** Larva de *Salminus hilarii* do G1 com 32 HAD. **B)** Larva do G2 com 32 HAD. **C)** Larva do G1 com 48 HAD. **D)** Larva do G2 com 48 HAD. **E)** Larva do G1 com 66 HAD. **F)** Larva do G2 com 66 HAD. **G)** Larva do G1 com 96 HAD. **H)** Larva do G2 com 96 HAD.

FIGURA 9

Figura 10. **A)** Larva de *Salminus hilarii* do G1 com 102 HAD. **B)** Larva do G2 com 102 HAD. **C)** Larva do G1 com 118 HAD. **D)** Larva do G2 com 118 HAD. **E)** Larva do G1 com 166 HAD. **F)** Larva do G2 com 166 HAD. **G)** Larva do G1 com 214 HAD. **H)** Larva do G2 com 214 HAD.

FIGURA 10

4. Discussão

4.1. Lipídios

Os lipídios são os principais e mais importantes substratos nutricionais, pois podem afetar o crescimento e a sobrevivência de peixes em suas fases iniciais de vida. Dentre várias contribuições, o estudo da evolução da composição lipídica de ovos e larvas de peixes pode auxiliar na determinação das necessidades nutricionais na primeira alimentação destes animais (Watanabe, 1982; Izquierdo *et al.*, 2000).

O conteúdo lipídico em ovos de peixes pode variar não somente entre diferentes lotes de fêmeas de uma determinada população, mas também entre lotes gerados pela mesma fêmea (McEvoy *et al.*, 1998; Parrish *et al.*, 1994). Isso nos leva a criar a hipótese de que outros fatores, e não só as dietas dos reprodutores podem influenciar diretamente na composição lipídica dos ovos (Rainuzzo *et al.*, 1997). Portanto, efeitos como as condições de confinamento, a caracterização metabólica das fases de desenvolvimento da prole e a heterogeneidade da origem parental, podem servir de base para testes de qualidade, visando um aumento na produção em cativeiro (Samaee, 2010). Com o intuito de investigar a influência da bagagem genética no metabolismo larval, a dieta dos dois grupos (G1 e G2), além das características do cultivo como temperatura e qualidade da água foram padronizadas neste estudo.

Durante toda a fase em que a prole dependeu dos substratos fornecidos pela mãe (fase de ovo e consumo do saco vitelínico), através da incorporação da molécula de vitelogenina no oócito, foi observado um mesmo padrão na concentração lipídica dos dois grupos, indicando que a mobilização quantitativa deste substrato não foi influenciada pelos processos de confinamento, que de acordo com Araki *et al.*, (2007), mesmo em poucas gerações pode exercer até mesmo uma redução de 40% no sucesso reprodutivo da prole, proveniente de fêmeas F1 mantidas em cativeiro. A única alteração significativa encontrada entre os grupos foi em 214 HAD, onde as larvas já se alimentavam de uma fonte exógena, composta por náuplios de *Artemia* sp., podendo essa alteração ser justificada por um maior consumo de alimento nas larvas do G2.

O resultado encontrado na comparação entre os dois grupos nos leva a sugerir a importância do investimento em estudos não apenas de caráter

quantitativo, mas também de ordem qualitativa, além de parâmetros zootécnicos, para averiguar a influência da mobilização dos substratos de fêmeas provindas de ambientes distintos, no sucesso reprodutivo e sobrevivência das larvas, principalmente em espécies dulciaquícolas de ambiente tropical, já que estudos relacionados aos processos de mobilização nestes grupos são escassos (Palácios *et al.*, 2007)

Durante a fase de desenvolvimento do ovo não houve nenhuma alteração significativa nos dois grupos, corroborando com os resultados encontrados por Mello (2010) em experimentos realizados com cachara (*Pseudoplastystoma reticulatum*) e o híbrido (*Pseudoplastystoma corruncans* x *Pseudoplastystoma reticulatum*). No entanto as concentrações lipídicas encontradas para estas espécies foram superiores as encontradas em *S. hilarii*, sendo aproximadamente 30 mg/g no momento da fertilização, e 20 mg/g até 28 horas após a fertilização, enquanto neste estudo foi observada uma concentração de 2,5 mg/g durante todo o desenvolvimento embrionário, aproximando-se de resultados encontrados em *Leucisus rutilis*, *Perca fluviatilis* e *Oreochromis* sp. (Henderson e Tocher, 1987). Estes resultados podem estar relacionados a um maior aporte lipídico na dieta dos reprodutores destes animais, quando comparados a dieta fornecida aos reprodutores de *S. hilarii*.

Após o período de eclosão (32 HAD) houve uma depleção dos lipídios totais, passando de 20 mg/g para aproximadamente 5 mg/g até 96 HAD, sugerindo a utilização destes substratos na conversão de energia, sendo esta uma fase de alta demanda energética, principalmente devido ao início da atividade natatória das larvas (Sargent, 1995). Já durante a fase de alimentação exógena apenas G2 apresentou um leve aumento no conteúdo lipídico em 166 HAD, devido possivelmente a uma maior taxa de canibalismo e captura de alimento, ou uma deposição preferencial deste substrato energético.

4.2. Proteínas

As proteínas, assim como os lipídios, desempenham duas principais funções, a de substrato energético, e também a de estruturação tecidual, sendo estes dois processos elevados durante a organogênese, e são consideradas também o substrato mais abundante em ovos e larvas de peixes (Sargent, 2002). Diferente dos mamíferos que catabolizam primeiramente os carboidratos

em suas atividades, em peixes, durante as atividades de rotina, a contribuição das proteínas para a produção de energia geralmente é maior que 40%, e praticamente todo o metabolismo aeróbico basal é suprido pelo catabolismo protéico (Zhu, 1998)

Diversos trabalhos apontam este perfil no consumo de proteínas durante a embriogênese (Holleland e Finn, 1986; Mangor-Jensen e Finn, 1987; Fyhn, 1989; Ronnestad *et al.*, 1993; Finn *et al.*, 1995), diferentemente do perfil encontrado nos ovos de *S. hilarii*, onde os dois grupos mantiveram-se estáveis até 16 HAD, e o G1 apresentou um grande aumento na concentração protéica em 28 HAD. Como não foi observado uma redução de proteínas e lipídios durante a fase embrionária de *S. hilarii*, possivelmente os substratos catabolizados para a manutenção do embrião foram os carboidratos, corroborando com resultados encontrados por Finn *et al.*, (1995). O aumento encontrado em 28 HAD no G1 pode estar correlacionado com uma maior síntese protéica, principalmente para formação de musculatura para atividade natatória. Este aumento foi observado também no G2, porém com 32 HAD, sugerindo um atraso na síntese protéica neste grupo, já que este aumento surgiu após o período de eclosão, quando as larvas já apresentavam atividades locomotoras.

Após a fase de ovo (consumo do vitelo) houve uma queda na concentração das proteínas totais dos dois grupos, pouco depois do momento da eclosão, devido possivelmente a utilização das proteínas do vitelo para a conversão de energia química (Zhu, 1998), para a utilização em processos de alta demanda energética (Kamler, 2008; Holleland e Finn, 1986; Mangor-Jensen e Finn, 1987; Ronnestad *et al.*, 1993; Finn *et al.*, 1995). Após este período as concentrações se estabilizaram nos dois grupos até o término da fase de alimentação endógena.

Comparando estes dados aos obtidos por Mello (2010) pode-se notar uma maior concentração protéica em *S. hilarii*, (aproximadamente 100 mg/g) quando comparados ao cachara e híbrido (aproximadamente 60 mg/g no mesmo período), justificando a ocorrência de um padrão inverso na concentração lipídica destas mesmas espécies.

Após o período de alimentação endógena pode-se observar também um padrão para os dois grupos, onde em 166 HAD houve um aumento significativo

de proteínas no G1, que ocorreu da mesma forma no G2, porém com 214 HAD. Acredita-se que as flutuações encontradas no conteúdo protéico dos dois grupos, durante a alimentação exógena, se dão principalmente devido à quantidade de alimento ingerido, e também por ser uma fase de intensa deposição protéica na musculatura, e conseqüentemente de intenso crescimento.

4.3. Morfologia

Em todas as fases de desenvolvimento da prole de *S. hilarii* (ovo, saco vitelínico e alimentação exógena) foram observadas duas diferenças estatisticamente significativas no comprimento das larvas dos dois grupos (16 HAD e 48 HAD), quando as larvas do G1 apresentaram um maior comprimento que as larvas do G2. A alteração observada com 16 HAD sugere uma maior hidratação do G1, já que nas fases anteriores não foram observadas alterações no tamanho dos ovos, não sendo então esta diferença atribuída à mobilização de vitelo das fêmeas para a prole. A alteração observada em 48 HAD pode ser um reflexo do pico protéico ocorrido em 28 HAD no G1. Esta maior síntese protéica no G1 pode ter possibilitado uma deposição gradual deste substrato na musculatura deste grupo, gerando então um maior crescimento das larvas, porém isto pode ser considerada apenas uma hipótese, já que essas informações não foram encontradas na literatura para outras espécies. Outra sugestão é de que esta alteração pode ter sido gerada apenas por uma variação individual do grupo.

Aparentemente o fator genético dos dois grupos não influenciou no consumo do saco vitelínico, já que nenhuma alteração significativa na área desta estrutura foi encontrada durante a fase de alimentação endógena, confirmando a hipótese de que as fêmeas dos dois grupos mobilizaram basicamente a mesma quantidade de substrato para a prole.

A diferença encontrada em relação ao tamanho da boca da larva em 66 HAD (primeira coleta onde a boca estava aberta) não influenciou na captura de alimento, e conseqüentemente no crescimento das larvas, já que após este período nenhuma alteração morfológica foi observada, sugerindo então que esta alteração possa estar relacionada a uma bagagem genética diferenciada do G1.

Segundo Huet (1978) os eventos ocorrentes no desenvolvimento embrionário e larval em peixes são extremamente espécie-específicos, porém todo o padrão morfológico dos dois grupos encontrado neste trabalho foi muito semelhante ao descrito por Nakatani *et al.*, (2001) em estudo realizados com *Salminus hilarii* e *Salminus brasiliensis*.

Os ovócitos de *S. hilarii* recém fecundados apresentaram um diâmetro médio de 3,54 e 3,41 mm (G1 e G2 respectivamente) enquanto Nakatani *et al.*, (2001) relatam para a mesma espécie um diâmetro médio de 3,40 mm e para *S. brasiliensis* 3,20 mm. Neste estudo a diferenciação do embrião se deu em 8 HAD para os dois grupos, também muito próximo ao descrito para a mesma espécie (8h40min) e para *S. brasiliensis* (6h25min). Outro evento muito semelhante entre as duas espécies foi o período de liberação da cauda, observado para G1e G2 em 16 HAD, para mesma espécie e para *S. brasiliensis* em 12h25min HAD.

A principal variação encontrada na comparação entre o presente trabalho, e o trabalho descrito por Nakatani *et al.*, (2001) foi no tempo de eclosão dos ovos. Enquanto que para os dois grupos (G1 e G2) a eclosão foi observado entre 28 e 32 HAD o autor relata para a mesma espécie um tempo de 26h40min HAD. Como a temperatura de incubação dos ovos foi a mesma para os dois trabalhos (25°C), e os animais estavam no mesmo período de desenvolvimento (constatado pelo diâmetro dos ovos) outras variáveis como fatores genéticos, ambientais ou até mesmo individuais, podem ter influenciado neste tempo de eclosão inferior citado pelo autor. Em *S. brasiliensis* o momento da eclosão ocorreu bem abaixo do observado em *S. hilarii*, com 14h10min HAD.

Após a eclosão, as larvas do G1 apresentaram comprimento de 4,28 mm e do G2 de 4,36 mm, muito próximo também ao relatado pelo autor para *S. hilarii* (4,25 mm), enquanto que as larvas de *S. brasiliensis* apresentaram um comprimento médio um pouco abaixo do encontrado para as outras espécies (3,55 mm). Possivelmente *S. brasiliensis* apresenta uma menor quantidade de vitelo, já que o período reportado no desenvolvimento foi bem abaixo do encontrado para *S. hilarii* e as larvas eclodiram com um tamanho inferior, e assim como reportado por Rainuzzo *et al.*, (1997) quanto menor a quantidade de vitelo mais acelerado torna-se o desenvolvimento embrionário.

5. Conclusão

O perfil metabólico e morfológico do G1 e G2 foi muito semelhante, e as alterações apresentadas com o decorrer do desenvolvimento embrionário e larval estão muito próximas ao encontrado para outras espécies de teleósteos, salvo algumas exceções. Faz-se necessário um maior investimento em estudos fisiológicos e zootécnicos, com o intuito de se conhecer os principais fatores que possam influenciar no sucesso de vida da prole de *S.hilarii*, e assim definir um protocolo adequado para um programa funcional de repovoamento.

6. Referências

- Araki H, Cooper B, Blouin MS (2007) Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318:100-103
- Baldisserotto B (2002) Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. UFSM, Rio Grande do Sul
- Bromage N (1995) Broodstock management and seed quality. In: Bromage N and Roberts RJ (ed) Broodstock management and egg and larval quality, Blackwell Science Ltd. University Press, Cambridge
- Finn RN, Henderson JR, Fyhn HJ (1995) Physiological energetic of eveloping embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Marine Biol*, 124:371-379
- Folch J, Less M, Sloane M, Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-503
- Frings CS, Fendly TW, Dunn RT, Quenn CA (1972) Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clin Chem* 18:673-674
- Fyhn HJ (1989) First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of Energy? *Aquaculture*, 80:111-120
- Henderson RJ, Tocher DR (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progr in Lipids Res*, 26:281-347
- Holleland T, Fyhn HJ (1986) Osmotic properties of eggs of the herring (*Clupea harengus*). *Mar Biol*, 91:337-383
- Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG (2009) Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiol Biochem* 35:109-123

- Honji RM, Mello PH, Araújo BC, Rodrigues-Filho JA, Hilsdorf AWS, Moreira RG (2011) Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): Implications for the conservation of this species. Neotropical Ichthyology doi: 10.1590/S1679-62252011005000012
- Huet MT (2ª ed) (1978) Tratado de Piscicultura. Mundiprensa, Madrid
- Izquierdo MS, Socorro J, Arantizamendi L, Hernández-Cruz CM (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. Fish Phys and Biochem 22:97-107
- Jalabert B (2005) Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reprod Nutr and Develop, 45:261-279
- Kamler E (1976) Resource allocation in yolk-feeding fish. Rev in Fish Biol and Fisher, 18:143-200
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
- Mangor-Jensen A, Fyhn HJ (1987) Critical analysis of the effect of oil-exposure on osmotic properties of developing eggs and larvae of the cod, *Gadus morhua*. L Sarsio, 72:395-400
- McEvoy LA, Naess T, Bell JG, Lie O, (1998) Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. Aquaculture 163:237-250
- Mello PH (2010) Alterações metabólicas ao longo da ontogenia das larvas de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* Siluriformes, Pimelodidae, Linnaeus, 1776) e do híbrido. Dissertação, Universidade de São Paulo

- Milligan CL, Girard SS (1993) Lactate metabolism in rainbow trout. J Exp Biol, 180:175-193
- Mommsen, TP (2001) Paradigms of growth in fish. Comp Biochem and Physiol 129(a):207-219
- Nakatani K, Agostinho AA, Baumgartner G, Bialetzki A, Sanches PV, Makrakis MC, Pavanelli C (2001) Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. EDUEM, Maringá
- Palácios E, Racotta IS, Aparicio B, Arjona O, Martínez-Palacios CA (2007) Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. Fish Physiol Biochem 33:81-91
- Parrish CC, Brown JA, Daniel ES, Somenon DC (1994) Lipid composition of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs over the spawning season. Aquacult Assoc 1:35-37
- Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. Aquaculture 155:102-115
- Ronnestad I, Fyhn HJ (1993) Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. Rev Fish Sci 1:239-259
- Samaee SM (2010) Quantitative composition of egg protein, lipid, fatty acid, and free amino acid in common dentex (*Dentex dentex L.*) and their relations to viability and larval development. Tese, University of Salzburg, Austria
- Sargent JR (1995) Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage N and Roberts RJ (ed) Broodstock management and egg and larval quality, Blackwell Science Ltd. University Press, Cambridge

- Sargent JR, Tocher DR, Bell JG (2002) The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds). Fish Nutrition, 3rd, Academic Press, San Diego
- Tocher DR, Fraser AJ, Sargent JR, Gamble JC (1989) Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). Lipids 20:84–89
- Watanabe T, (1982) Lipid nutrition in fish. Comp Biochem Physiol, 1(b):3-15
- Watanabe T, Koizumi T, Suzuki H, Satoh S, Takeuchi T, Yoshida N, Kitada T, Tsukashima Y (1985) Improvement of quality of red sea bream eggs by feeding broodstock on a diet containing cuttlefish meal or raw krill shortly before spawning. Nippon Suisan Gakkaishi 9:1511–1521
- Zhu P (1998) A study of biochemical composition in captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs and larvae. Dissertation, University of Newfoundland

CAPÍTULO 3

Composição em Ácidos Graxos de ovos e larvas

**Artigo submetido a revista Aquaculture International em 04/12/2010 –
Manuscrito nº AQU11292**

Abstract

In addition to the strong influence of the broodstock diet on the development and survival of offspring, domestication may also interfere with the larval life success. We obtained eggs from wild and domesticated *Salminus hilarii* females and domesticated males. Wild females were caught in the Tiete River and tributaries, and the domesticated females were born three years before the beginning of the experiment in the Ponte Nova Fish Farm. Animals from both groups were fed with the same feed to exclude feed variables. The eggs and larvae were sampled at 0, 8, 16 and 28 hours after spawning (HAS), with the last sampling (28 HAS) coinciding with hatching time. After hatching, samplings proceeded at 32, 48, 66 and 96 HAS, with the last sampling (96 HAS) corresponding to the end of yolk sac consumption. Finally, the last experimental period was during the larvae exogenous feeding phase, at 102, 118, 166 and 214 HAS. Our data revealed that domestication of *S. hilarii* females influenced fatty acid (FA) metabolism during egg and larva development. However, the structure of membrane phospholipid fatty acids remained mostly stable, with changes principally in the neutral fraction. When the external conditions, mainly water and feed quality, remained constant, domestication of *S. hilarii* females did not significantly affect the structural fatty acid composition, but influenced the selectivity of consumption and/or storage of specific fatty acids.

Keywords: captivity; domestication; early development; fatty acid; larvae; *Salminus hilarii*.

1. Introduction

Pollution, eutrophication, silting, dam construction, flood control, fishing and introduction of exotic species lead to biodiversity loss in continental and aquatic environments (*Agostinho et al.*, 2005). These factors directly affect the environment and can cause changes in the distribution of organisms, increasing the propagation of several species and reducing or even extinguishing others.

The impacts of dams are considered as first order because they involve chemical, physical and geomorphologic consequences, resulting in changes in the space-time distribution in flow, ecology and fish resource management. According to Hildebrand *et al.*, (1980), the hatchery program to restore declining natural populations of native species is one of the most widely accepted alternatives to reduce the impact caused by dams on aquatic environments. However, hatchery programs for conservation and commercial fish farming must comprehend the physiological changes during the larval development of marine and freshwater fish species. A greater understanding of these changes will provide information about the main energy sources used in the different larval stages and allow for better mobilization of reserves based on the physiological needs of developing fish (*Parra et al.*, 1999).

Fatty acids are the major energy sources for fish and are mobilized from the adipose tissue during gonad maturation; then, plasma transfers them to the liver where they are rearranged to vitellogenin (Bromage and Roberts 1996). Inadequate levels of essential fatty acids in the diet can compromise the cell membrane structure, causing a higher incidence of deformations in larva tissues (*Hamza et al.*, 2008). The physiological roles of fatty acids in reproduction, embryogenesis and larval development have been described for several marine (*Fraser et al.*, 1988; *Wiegand* 1996; *Rainuzzo et al.*, 1997; *Sargent et al.*, 1999) and freshwater species (*Gunasekera et al.*, 1999; *Palácios et al.* 2007), but little is known in tropical fish species.

In addition to the strong influence of the broodstock diet on the development and survival of offspring, others factors, such as domestication, may also interfere with the larval life success. According to *Araki et al.*, (2007), the genetic effects of domestication (even in a few generations) directly influence the reproductive success of captive animals up to 40% when

compared to natural environment animals, thus directly influencing the offspring performance.

In the Alto Tiete River Basin, the natural stocks of some fish species are threatened, so the restock program is important for maintaining these species. However, the influence of domestication in broodstock physiology, especially in the processes of nutrient transfer to egg yolk and larvae development, remains unknown. In the present study, we investigated metabolic changes during the early stages (eggs and larvae) of *Salminus hilarii* produced from females with wild and captive origin that were fed the same commercial feed. These results will help to guide the selection of wild and/or domesticated broodstock for the restock program in this basin.

2. Materials and methods

2.1. Egg and larva collection

We obtained eggs and larvae from wild (G1) and domesticated (G2) *Salminus hilarii* females and domesticated males. The G1 females were caught in the Tietê River and its tributaries in the Alto Tietê River Basin using artisanal fisheries between the cities of Mogi das Cruzes and Biritiba Mirim, (between 23 ° 32 '45.3"S ; 46 ° 08' 03.2"W and 23 ° 34 ' 36.5"S; 45 ° 54 '23.9"W) in the state of São Paulo, Brazil. The G2 females were born three years before the beginning of this experiment in the Ponte Nova Fish Farm, Salesópolis, São Paulo, Brazil. Animals from both groups were fed with the same quantity of the same commercial feed (40% crude protein) to exclude feed variables.

The selected broodstocks were transferred to 3.600 L laboratory tanks. We followed a conventional protocol of hormonal induction (Honji *et al.*, 2011) by applying two doses (0.5 and 5.0 mg) of carp pituitary extract (CPE) per kilogram of fish body mass (diluted in 0.9% sodium chloride solution) with a 10-hour interval between the doses. We used a single dose ranging from 2 to 3 mg of CPE/kg for the males (at the time of the second female dose), according to the maturity of the animals, which was evaluated by the semen volume released in the broodstock selection.

Males (15) and females (5) (3:1 ratio) from each group were kept in laboratory tanks (one tank for each group) after hormonal induction to allow natural spawning and gamete fertilization. After spawning and fertilization, the eggs were transferred to 60 L conical incubators until egg hatching. The fertilization rate (FR) was calculated in both groups six hours after spawning ($FR = (\text{number of fertilized eggs} \times 100) / \text{number of total eggs}$) (Vazzoler, 1981, 1996). The eggs and hatched larvae were maintained in the 60 L conical incubators for nine days and were fed only with *Artemia* sp. nauplii (INVE do Brasil Ltda). During this period, the temperature and dissolved oxygen were monitored with an oximeter (Model 55; YSI, Yellow Springs, OH).

The egg and larva sampling were performed at 0, 8, 16 and 28 hours after the spawning (HAS), with the last sampling (28 HAS) coinciding with the hatching time of most eggs. After hatching, samplings proceeded at 32, 48, 66 and 96 HAS, with the last sampling (96 HAS) corresponding to the end of yolk

sac consumption for most larvae. The last experimental period was during the larvae exogenous feeding phase, and four samplings were performed, at 102, 118, 166 and 214 HAS. The collected larvae and eggs were kept in cryovials, immediately frozen in liquid nitrogen and maintained in an 80°C freezer until fatty acid analysis.

2.2. Fatty acid analysis

The extraction of total lipids in eggs and larvae was performed with a mixture of chloroform: methanol: water (2: 1: 0.5) (Folch *et al.*, 1957), which was adapted by Parrish (1999) for aquatic organisms. The lipid extract was subjected to a N₂ atmosphere for evaporation of the solvent, redissolved in chloroform and separated into polar lipids (phospholipids) and neutral lipids (mainly triglycerides) using an activated silica column (Yang, 1995). Methylation of each fraction was performed with acetyl chloride (5% HCl in methanol) (Christie 2003), and the methyl esters were used to determine the fatty acid composition using a *Varian Model 3900* Gas Chromatograph (GC)/*Varian* Model coupled to flame ionization detection (FID). We identified fatty acids by comparing their retention times with those of known fatty acid methyl ester (FAME) standards (*Supelco*, 37 components, *Sigma-Aldrich*; and Mixture *Me93*, *Qualmix* PUFA fish M, and *Menhaden Oil*, *Larodan*). The FAMES were analyzed on a CP Wax 52 CB capillary column with a 0.25µm thickness, 0.25mm inside diameter, and 30m length. Hydrogen was used as the carrier gas at a linear velocity of 22 cm/s. The temperature program was 170 °C for 1 min followed by a 2.5 °C/min ramp to 240 °C, and a final hold time of 5 min. The injector and flame ionization detector (FID) temperatures were 250 and 260 °C, respectively.

2.3. Data analysis

All values are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (M $\pm$ SEM). Comparisons of the fatty acid percentages were made using analysis of variance (one-way and two-way ANOVA), followed by the Student-Newmann-Keuls (SNK) tests for parametric analyses or Tukey tests (non-parametric analyses). In all analyses, the differences were considered to be significant when $P < 0.05$ (Zar, 1999). These analyses were performed using the statistical software *SigmaStat* for *Windows* (*Systat Software*, San Jose, CA).

3. Results

Ovulation occurred naturally within 150-160 hours (25°C) following the second CPE injection. The fertilization rate was higher in G1 females (53.38 ± 1.01 %) compared with G2 females ($38.90 \pm 1.21\%$) ($P < 0.01$), as shown in figure 11.

The fatty acid (FA) analysis throughout development showed that the major FA groups in the neutral lipid fraction were saturated (SFA) and monounsaturated (MUFA) fatty acids. Indeed, C16:0 was the main SFA in the neutral fraction and decreased significantly ($P < 0.05$) during the first hours of egg development (from 0 to 16 HAS) in both groups (Table 4). By contrast, the MUFA content increased ($P < 0.05$) in this period up to 16 HAS, remaining constant through the end of the egg development (28 HAS). This pattern was mainly due to an increase in C18:1n9, which is the most abundant MUFA in this phase (Table 4). The total PUFA content of G2 females did not change during the egg stage, but some oscillations were observed in G1, with a significant increase of these fatty acids at 8 HAS, followed by a decrease at 28 HAS ($P < 0.05$). The n6 PUFAs, especially C18:2n6, were responsible for these changes. The n3/n6 ratio was constant in G1 females up to 16 HAS with a decrease at 28 HAS compared with 0 HAS. In G2 females, this ratio was constant up to 16 HAS and increased at 28 HAS compared to values at 0 HAS ($P < 0.05$). These differences were also related to changes in C18:2n6, which influenced the n6 PUFA content and consequently the n3/n6 ratio. However, the differences of both C18:2n6 and n6 PUFA were significant only in the G1 females. Eggs from domesticated females also presented higher amounts of PUFA n6 than those from G2 females (Table 4).

The SFA content gradually decreased ($P < 0.05$) until 16 HAS in the lipid polar fraction of the eggs in G1 females and the same profile was also observed in G2 females. However, no significant differences ($P > 0.05$) were observed in G2 females, but just a decreasing trend during development. The MUFA content did not change during development in either of the groups (Table 5). The total PUFA content in both groups also did not change, however a significant increase was observed when the n3 and n6 PUFAs were analyzed separately in G1 females during the egg phase ($P < 0.05$). The differences of n3

found in G1 females seemed to be due to C22:6n3, which exhibited an increasing trend; however, these differences were not statistically significant. The difference in the n6 PUFA throughout egg development was not due to a specific FA, but to slight changes in C20:3n6, C20:4n6 and C22:5n6. The FA composition from the neutral lipid fraction in larvae during the endogenous feed period (yolk sac) from both groups is presented in Table 6. The SFA content did not change in G1 females, whereas the G2 larvae presented a significant decrease ($P < 0.05$) in SFA, with the same profile described in the eggs and also due to C16:0 ($P < 0.05$). The MUFA content gradually decreased in G2 from 32 HAS up to 96 HAS, influenced by changes in C18:1n9. G1 larvae presented the same profile, but from 32 HAS until 66 HAS, remaining constant from this time until 96 HAS. The decrease in SFA and MUFA was compensated by a significant increase in PUFA in both groups. The n3 and n6 PUFA significantly increased ($P < 0.05$) during ontogenesis due to an increase in DHA (docosahexaenoic acid, C22:6n3) and ARA (arachidonic acid, C20:4n6). As a consequence, the n3/n6 ratio increased in G1 females during the yolk sac consumption phase (Table 6).

The FA composition in the lipid polar fraction in larvae from G1 and G2 females during the yolk sac consumption phase is presented in Table 7. The SFA content decreased in G2 females at 48 HAS, maintaining lower values until 96 HAS ($P < 0.05$). This difference was not observed in G1 females, resulting in a higher percentage of SFAs when compared with G2 females at 66 HAS. The MUFA and total PUFA percentages remained constant in the lipid polar fraction during the yolk sac consumption phase. However, we observed an inverse profile of the specific n3 and n6 PUFAs in G2 females, with a gradual increase of n3 and decrease of n6, resulting in statistical differences between both groups. The PUFA n3 was higher in G2 females at 66 HAS and the PUFA n6 was higher in G1 females at 96 HAS ($P < 0.05$). These changes also influenced the n3/n6 ratio, which gradually increased in G2 females during the yolk sac consumption phase ($P < 0.05$).

The fatty acid compositions of the lipid neutral fraction in G1 and G2 larvae during the exogenous feeding period are shown in Table 8. The SFAs presented two different patterns between the groups. The SFA content was constant in G1 larvae until 166 HAS, followed by a sharp decrease at 214 HAS

($P < 0.05$); by contrast, the SFA profile remained constant in G2 females during the whole experimental period. A significant difference was observed at 166 HAS ($P < 0.05$), with the SFA content higher in G1 than in G2 females, mainly due to C16:0, which is the most representative FA in this fraction. The MUFA profile in both groups was distinct, with a gradual decrease from 118 HAS in G1 ($P < 0.05$) and no changes in G2. These different FA profiles contributed to significant differences for both groups at 118 HAS ($G1 > G2$) and 214 HAS ($G2 > G1$) ($P < 0.05$).

The PUFA content increased in G2 at 166 HAS followed by a sharp decrease at 214 HAS ($P < 0.05$), but no differences were found in G1. These different patterns were responsible for a significant change in PUFA ($P < 0.05$) at 166 HAS ($G2 > G1$) and 214 HAS ($G1 > G2$). Many FAs were responsible for this increase in the total PUFA content, especially n6, C18:2n6, C18:3n6, C20:4n6 and C22:5n6 at 214 HAS; and n3, C20:3n3, C20:5n3 and C22:6n3 at 118 HAS. Even though some of the FAs exhibited no significant differences, they collectively influenced the total PUFA content and PUFA n3 and n6 profiles.

At the exogenous feeding phase, the FAs of the lipid polar fraction did not change during development in either of the groups (Table 9).

Table 4. Fatty acid profile (%) of neutral lipids fraction in eggs of female *Salminus hilarii* from wild (G1) and domesticated (G2) groups (mean $\pm$ SEM).

Fatty acid	Group	0 HAS	8 HAS	16 HAS	28 HAS	T	G	TxG
C14:0	G1	3.0 $\pm$ 0.5a	1.5 $\pm$ 0.3b	1.0 $\pm$ 0.2b	1.4 $\pm$ 0.3b	<0.001	N.S.	N.S.
	G2	2.1 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.5	N.S.		
C16:0	G1	34.6 $\pm$ 0.1a	25.8 $\pm$ 3.0b	24.2 $\pm$ 3.1b	28.4 $\pm$ 3.4ab	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	32.2 $\pm$ 1.7a	27.7 $\pm$ 0.8b	26.3 $\pm$ 1.7b	27.0 $\pm$ 1.8b	<0.05		
C17:0	G1	2.4 $\pm$ 1.0	0.5 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.1 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	N.S.		
C18:0	G1	8.5 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 1.4	8.0 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 0.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	7.4 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 1.1	8.3 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 0.5	N.S.		
Σ SFA	G1	49.0 $\pm$ 2.1a*	35.9 $\pm$ 4.7b	33.8 $\pm$ 2.1b	38.2 $\pm$ 3.3b	<0.05	<0.05	N.S.
	G2	43.7 $\pm$ 1.3a**	37.4 $\pm$ 1.1b	36.8 $\pm$ 1.7b	37.6 $\pm$ 2.5b	<0.05		
C16:1	G1	4.8 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	4.5 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.6	N.S.		
C18:1n9	G1	28.8 $\pm$ 3.1a	34.6 $\pm$ 1.3b	38.4 $\pm$ 0.4b	38.0 $\pm$ 2.4b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	33.6 $\pm$ 0.7a	37.4 $\pm$ 0.2ab	40.2 $\pm$ 0.7b	36.3 $\pm$ 1.1ab	<0.05		
C18:1n7	G1	4.2 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.3	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.7 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.4	N.S.		
C20:1n9	G1	0.6 $\pm$ 0.14	1.1 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.7 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.3	N.S.		
Σ MUFA	G1	39.3 $\pm$ 3.8a	44.4 $\pm$ 1.9ab	47.8 $\pm$ 1.8b	49.0 $\pm$ 2.4b	<0.05	N.S.	<0.05
	G2	43.4 $\pm$ 0.6a	45.6 $\pm$ 3.2ab	48.8 $\pm$ 1.2b	45.4 $\pm$ 1.2ab	<0.05		
C18:2n6	G1	5.4 $\pm$ 0.6a	6.2 $\pm$ 0.9ab	9.2 $\pm$ 0.1b	6.0 $\pm$ 0.5ab	<0.05	N.S.	<0.05
	G2	7.0 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 1.9	7.3 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 2.9	N.S.		
C18:3n6	G1	0.4 $\pm$ 0.2ab	3.1 $\pm$ 0.4a	0.7 $\pm$ 0.2b	0.2 $\pm$ 0.0ab*	<0.05	<0.001	<0.05
	G2	0.7 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.1**	N.S.		
C20:2n6	G1	0.2 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	N.S.		
C20:3n6	G1	1.0 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.7 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.5	N.S.		
C20:4n6	G1	0.5 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.5	N.S.		
C22:5n3	G1	1.3 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.6 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3	N.S.		
C22:6n3	G1	0.9 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.4	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.8 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.5	N.S.		
Σ PUFA	G1	11.7 $\pm$ 1.7a	19.8 $\pm$ 6.4b	18.4 $\pm$ 1.3b	12.7 $\pm$ 1.1a	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	12.9 $\pm$ 1.9	17.0 $\pm$ 3.4	14.4 $\pm$ 2.9	17.0 $\pm$ 2.9	N.S.		
Σ PUFA n3	G1	3.1 $\pm$ 1.4	3.8 $\pm$ 1.3	4.2 $\pm$ 1.7	2.7 $\pm$ 0.5*	N.S.	<0.05	<0.05
	G2	1.9 $\pm$ 0.6a	3.0 $\pm$ 1.1ab	2.9 $\pm$ 0.8ab	4.8 $\pm$ 0.5b**	<0.05		
Σ PUFA n6	G1	8.6 $\pm$ 0.4 a*	16.0 $\pm$ 6.0b	14.2 $\pm$ 0.5b	10.0 $\pm$ 0.5a	<0.05	<0.05	N.S.
	G2	11.0 $\pm$ 1.3**	14.0 $\pm$ 2.4	11.6 $\pm$ 2.2	12.2 $\pm$ 3.3	N.S.		
Σ n3/ Σ n6	G1	0.4 $\pm$ 0.2a	0.3 $\pm$ 0.1ab	0.3 $\pm$ 0.1ab	0.3 $\pm$ 0.0b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	0.2 $\pm$ 0.0a	0.2 $\pm$ 0.0ab	0.2 $\pm$ 0.04ab	0.4 $\pm$ 0.1b	<0.05		

Values below 0.2% were not presented in the table. Σ SFA, Σ MUFA, Σ PUFA, Σ PUFA n6, and Σ PUFA n3 are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, and n3 respectively. T – Statistical difference during the time within each group; G – Statistical difference between groups; T x G – Two way Anova considering group and time of development as variables.

^A, ^B, ^{AB} – Different letters mean statistically different values in the same group throughout the development.

* - Symbol represents values statistically different between groups.

Table 5. Fatty acid profile (%) of polar lipids fraction in eggs of female *Salminus hilarii* from wild (G1) and domesticated (G2) groups (mean $\pm$ SEM).

Fatty acid	Group	0 HAS	8 HAS	16 HAS	28 HAS	T	G	T x G
C14:0	G1	2.3 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 1.0	1.2 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.3 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	N.S.		
C16:0	G1	19.2 $\pm$ 5.5	14.8 $\pm$ 5.0	12.7 $\pm$ 2.7	12.5 $\pm$ 2.4	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	18.5 $\pm$ 3.0	14.1 $\pm$ 1.7	13.2 $\pm$ 2.4	14.6 $\pm$ 2.4	N.S.		
C17:0	G1	0.6 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	2.1 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3	N.S.		
C18:0	G1	22.4 $\pm$ 5.0	20.7 $\pm$ 1.8	19.5 $\pm$ 3.3	18.0 $\pm$ 1.8	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	24.4 $\pm$ 2.8	20.5 $\pm$ 0.4	22.1 $\pm$ 1.	19.8 $\pm$ 1.0	N.S.		
C20:0	G1	1.9 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1	-	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	-	0.8 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.2	N.S.		
Σ SFA	G1	49.1 $\pm$ 1.5a	37.7 $\pm$ 7.6ab	34.6 $\pm$ 5.5b	31.4 $\pm$ 4.5b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	48.5 $\pm$ 7.9	38.7 $\pm$ 3.1	37.9 $\pm$ 3.9	37.8 $\pm$ 2.0	N.S.		
C16:1	G1	1.3 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.4 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3	N.S.		
C18:1n9	G1	11.6 $\pm$ 3.3	12.5 $\pm$ 2.7	10.0 $\pm$ 1.0	8.8 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	8.2 $\pm$ 0.2	10.8 $\pm$ 0.7	9.4 $\pm$ 0.2	10.1 $\pm$ 1.7	N.S.		
C18:1n7	G1	1.7 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.4	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.2 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	N.S.		
Σ MUFA	G1	15.7 $\pm$ 3.0	15.9 $\pm$ 3.3	13.4 $\pm$ 1.0	11.1 $\pm$ 1.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	11.5 $\pm$ 0.9	13.8 $\pm$ 1.0	11.9 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 2.0	N.S.		
C18:2n6	G1	4.4 $\pm$ 1.1	4.8 $\pm$ 1.5	4.0 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.4	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.4 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.8	3.6 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 1.1	N.S.		
C20:2n6	G1	0.6 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.6 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.0	N.S.		
C20:3n6	G1	2.3 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 0.4	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.5 $\pm$ 1.1	3.4 $\pm$ 1.6	4.4 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.9	N.S.		
C20:4n6	G1	7.3 $\pm$ 0.6	8.4 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 1.5	11.6 $\pm$ 0.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	7.6 $\pm$ 1.4	7.9 $\pm$ 1.9	9.6 $\pm$ 0.5	8.4 $\pm$ 1.1	N.S.		
C20:5n3	G1	1.2 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.1 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3	N.S.		
C22:4n6	G1	0.6 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	N.S.		
C22:5n6	G1	2.3 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 1.1	3.4 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.7	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	2.6 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 1.2	N.S.		
C22:5n3	G1	1.5 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.3	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.7 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.4	N.S.		
C22:6n3	G1	12.1 $\pm$ 2.7	19.8 $\pm$ 3.2	23.4 $\pm$ 7.6	26.5 $\pm$ 4.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	17.2 $\pm$ 3.8	20.0 $\pm$ 3.3	21.8 $\pm$ 1.8	21.8 $\pm$ 0.2	N.S.		
Σ PUFA	G1	35.2 $\pm$ 2.1	46.3 $\pm$ 5.2	52.0 $\pm$ 6.4	57.5 $\pm$ 5.9	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	40.1 $\pm$ 7.0	47.4 $\pm$ 3.6	50.2 $\pm$ 3.6	48.9 $\pm$ 2.7	N.S.		
Σ PUFA n3	G1	15.5 $\pm$ 2.4a	23.3 $\pm$ 5.1ab	26.8 $\pm$ 7.7ab	30.7 $\pm$ 4.6b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	19.9 $\pm$ 4.2	25.4 $\pm$ 1.7	25.4 $\pm$ 1.9	25.9 $\pm$ 0.3	N.S.		
Σ PUFA n6	G1	19.6 $\pm$ 0.4a	23.0 $\pm$ 0.8b	25.2 $\pm$ 1.9bc	26.7 $\pm$ 1.4c	<0.001	N.S.	N.S.
	G2	20.2 $\pm$ 2.9	22.1 $\pm$ 2.2	24.8 $\pm$ 1.7	23.0 $\pm$ 2.9	N.S.		
Σ n3/ Σ n6	G1	0.8 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.1	N.S.		

Values below 0.2% were not presented in the table. Σ SFA, Σ MUFA, Σ PUFA, Σ PUFA n6, and Σ PUFA n3 are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, and n3 respectively. T – Statistical difference during the time within each group; G – Statistical difference between groups; T x G – Two way Anova considering group and time of development as variables.

^A, ^B, ^{AB} – Different letters mean statistically different values in the same group throughout the development.

* - Symbol represents values statistically different between groups.

Table 6. Fatty acid profile (%) of neutral lipids fraction in larvae (yolk sac) of female *Salminus hilarii* from wild (G1) and domesticated (G2) groups (mean $\pm$ SEM).

Fatty acid	Group	32 HAS	48 HAS	66 HAS	96 HAS	T	G	T x G
C14:0	G1	2.4 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.7	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	2.4 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1	N.S.		
C16:0	G1	32.9 $\pm$ 2.4a	30.6 $\pm$ 4.4b	22.9 $\pm$ 1.8c	24.5 $\pm$ 1.9abc	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	34.4 $\pm$ 2.7a	27.2 $\pm$ 3.6b	19.0 $\pm$ 2.1c	22.0 $\pm$ 1.9bc	<0.001		
C17:0	G1	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.6 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.1	N.S.		
C18:0	G1	6.7 $\pm$ 0.4a	9.4 $\pm$ 0.9b	12.2 $\pm$ 0.5c	13.9 $\pm$ 1.0bc	<0.001	N.S.	N.S.
	G2	7.3 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 1.0	12.8 $\pm$ 0.3	11.9 $\pm$ 1.3	N.S.		
Σ SFA	G1	42.9 $\pm$ 3.0	42.6 $\pm$ 4.6	37.1 $\pm$ 2.1	41.4 $\pm$ 1.9*	N.S.	<0.05	N.S.
	G2	45.1 $\pm$ 3.7a	39.4 $\pm$ 3.1ab	33.2 $\pm$ 2.4b	36.1 $\pm$ 2.3b**	<0.05		
C16:1	G1	4.9 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 1.8	3.1 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.4	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	5.4 $\pm$ 0.6a	3.6 $\pm$ 0.5ab	1.7 $\pm$ 1.1b	2.0 $\pm$ 0.5b	<0.001		
C18:1n9	G1	35.2 $\pm$ 2.5a	33.9 $\pm$ 1.2a	30.2 $\pm$ 3.7a	22.5 $\pm$ 0.9b	<0.001	N.S.	N.S.
	G2	32.9 $\pm$ 3.1a	33.9 $\pm$ 1.3b	31.3 $\pm$ 0.6b	23.8 $\pm$ 1.2b	<0.001		
C18:1n7	G1	3.8 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	4.5 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 1.2	2.9 $\pm$ 0.3	N.S.		
C20:1n9	G1	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.6	N.S.		
Σ MUFA	G1	45.1 $\pm$ 2.5a	42.9 $\pm$ 2.1a	38.9 $\pm$ 4.2b	29.5 $\pm$ 1.1b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	44.0 $\pm$ 2.9a	42.7 $\pm$ 1.8ab	37.5 $\pm$ 2.6b	30.8 $\pm$ 0.9c	<0.001		
C18:2n6	G1	7.1 $\pm$ 0.2a*	5.9 $\pm$ 0.7ab*	4.9 $\pm$ 0.0b	6.6 $\pm$ 0.9a	<0.05	<0.001	N.S.
	G2	5.4 $\pm$ 0.8**	7.5 $\pm$ 0.5**	6.4 $\pm$ 1.5	7.2 $\pm$ 0.7	N.S.		
C18:3n6	G1	0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.3 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	N.S.		
C20:2n6	G1	0.4 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	N.S.		
C20:3n6	G1	1.1 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.3	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.0 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 0.6	N.S.		
C20:4n6	G1	0.9 $\pm$ 0.0a	1.9 $\pm$ 0.6a	3.9 $\pm$ 0.1b	4.6 $\pm$ 0.6b	<0.001	N.S.	<0.001
	G2	1.2 $\pm$ 0.3a	2.3 $\pm$ 1.1a	4.1 $\pm$ 0.0b	4.5 $\pm$ 0.6b	<0.001		
C20:5n3	G1	0.2 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.8	N.S.		
C22:4n6	G1	-	0.1 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	-	0.2 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.8	N.S.		
C22:5n6	G1	0.2 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.4	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.3 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.7	N.S.		
C22:5n3	G1	0.2 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.3 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 1.0	N.S.		
C22:6n3	G1	1.3 $\pm$ 0.0a	2.2 $\pm$ 0.7a	5.5 $\pm$ 1.0b	6.3 $\pm$ 1.7b	<0.001	N.S.	N.S.
	G2	1.4 $\pm$ 0.2a	3.5 $\pm$ 1.5a	7.1 $\pm$ 0.8b	8.7 $\pm$ 0.5b	<0.001		
Σ PUFA	G1	12.0 $\pm$ 0.6a	14.5 $\pm$ 2.5ab	24.0 $\pm$ 6.3bc	29.1 $\pm$ 2.7c	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	10.9 $\pm$ 0.9a	18.0 $\pm$ 4.7a	29.3 $\pm$ 4.8b	33.1 $\pm$ 2.2b	<0.05		
Σ PUFA n3	G1	2.1 $\pm$ 0.0a	3.7 $\pm$ 0.8a	6.9 $\pm$ 0.9b	10.3 $\pm$ 1.6c*	<0.001	N.S.	<0.001
	G2	2.2 $\pm$ 0.19a	4.9 $\pm$ 2.63ab	10.2 $\pm$ 2.15b	14.9 $\pm$ 1.4ab**	<0.05		
Σ PUFA n6	G1	9.9 $\pm$ 0.6a	10.8 $\pm$ 1.7ab	17.1 $\pm$ 5.9ab	18.8 $\pm$ 1.6b	<0.05	<0.05	<0.05
	G2	8.7 $\pm$ 0.7a	13.1 $\pm$ 2.1ab	19.1 $\pm$ 2.7b	18.2 $\pm$ 0.8b	<0.05		
Σ n3/ Σ n6	G1	0.2 $\pm$ 0.0a*	0.3 $\pm$ 0.0a*	0.4 $\pm$ 0.1b	0.5 $\pm$ 0.1c*	<0.05	<0.05	<0.05
	G2	0.3 $\pm$ 0.0**	0.4 $\pm$ 0.1**	0.5 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1**	N.S.		

Values below 0.2% were not presented in the table. Σ SFA, Σ MUFA, Σ PUFA, Σ PUFA n6, and Σ PUFA n3 are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, and n3 respectively. T – Statistical difference during the time within each group; G – Statistical difference between groups; T x G – Two way Anova considering group and time of development as variables.

^A, ^B, ^{AB} – Different letters mean statistically different values in the same group throughout the development.

* - Symbol represents values statistically different between groups.

Table 7. Fatty acid profile (%) of polar lipids fraction in larvae (yolk sac) of female *Salminus hilarii* from wild (G1) and domesticated (G2) groups (mean $\pm$ SEM).

Fatty acid	Group	32 HAS	48 HAS	66 HAS	96 HAS	T	G	T x G
C16:0	G1	18.6 $\pm$ 1.7a	12.4 $\pm$ 2.8b	13.6 $\pm$ 0.7ab	11.4 $\pm$ 2.1b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	21.8 $\pm$ 5.4a	12.0 $\pm$ 2.0b	11.4 $\pm$ 1.5b	13.2 $\pm$ 1.5b	<0.05		
C18:0	G1	17.7 $\pm$ 0.6	18.1 $\pm$ 3.0	19.3 $\pm$ 1.7	17.6 $\pm$ 0.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	16.6 $\pm$ 2.1	16.5 $\pm$ 3.2	16.1 $\pm$ 1.0	17.4 $\pm$ 1.4	N.S.		
Σ SFA	G1	37.5 $\pm$ 1.6	32.2 $\pm$ 6.8	34.8 $\pm$ 1.1*	32.4 $\pm$ 4.0	N.S.	<0.05	N.S.
	G2	40.6 $\pm$ 4.6a	29.4 $\pm$ 3.7b	29.1 $\pm$ 0.6b**	32.9 $\pm$ 3.2ab	<0.05		
C18:1n9	G1	10.3 $\pm$ 0.7	9.7 $\pm$ 2.7	11.6 $\pm$ 3.1	6.7 $\pm$ 2.9	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	11.2 $\pm$ 1.1	8.7 $\pm$ 0.9	8.8 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 1.4	N.S.		
C18:1n7	G1	1.6 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.9 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	N.S.		
Σ MUFA	G1	12.8 $\pm$ 0.3	12.5 $\pm$ 3.4	15.6 $\pm$ 4.3	9.2 $\pm$ 3.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	14.8 $\pm$ 14	11.5 $\pm$ 0.9	11.3 $\pm$ 0.7	13.3 $\pm$ 2.3	N.S.		
C18:2n6	G1	5.0 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	5.0 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.3	N.S.		
C18:3n6	G1	0.1 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.4	-	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	-	-	-	-	N.S.		
C20:3n6	G1	4.0 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.4 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.2	N.S.		
C20:4n6	G1	9.9 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 0.6	8.9 $\pm$ 3.2	10.1 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	8.9 $\pm$ 1.7	10.9 $\pm$ 0.5	10.6 $\pm$ 0.5	8.6 $\pm$ 0.6	N.S.		
C20:5n3	G1	1.7 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 1.0	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.5	N.S.		
C22:4n6	G1	0.7 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.7 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	N.S.		
C22:5n6	G1	3.2 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.9	3.7 $\pm$ 2.0	4.5 $\pm$ 0.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.4 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 1.3	3.6 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.3	N.S.		
C22:5n3	G1	1.5 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 2.1	2.0 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.3	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.5 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.4	N.S.		
C22:6n3	G1	22.3 $\pm$ 1.2	24.5 $\pm$ 5.9	24.0 $\pm$ 2.3	31.7 $\pm$ 5.8	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	18.5 $\pm$ 3.5	29.2 $\pm$ 2.0	30.8 $\pm$ 1.5	29.8 $\pm$ 4.6	N.S.		
Σ PUFA	G1	49.7 $\pm$ 1.8	55.3 $\pm$ 9.9	47.9 $\pm$ 6.5	58.4 $\pm$ 4.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	44.6 $\pm$ 5.7	59.1 $\pm$ 4.3	59.6 $\pm$ 0.5	53.7 $\pm$ 4.3	N.S.		
Σ PUFA n3	G1	25.6 $\pm$ 1.3	30.1 $\pm$ 7.4	27.4 $\pm$ 1.5*	35.9 $\pm$ 4.6	N.S.	<0.05	N.S.
	G2	22.1 $\pm$ 3.7a	33.4 $\pm$ 2.6b	35.5 $\pm$ 1.3b**	33.5 $\pm$ 3.6b	<0.05		
Σ PUFA n6	G1	24.1 $\pm$ 1.0	25.2 $\pm$ 2.	20.6 $\pm$ 5.1	22.5 $\pm$ 0.3*	N.S.	<0.05	N.S.
	G2	22.6 $\pm$ 2.0ab	25.7 $\pm$ 1.8a	24.1 $\pm$ 1.0ab	20.2 $\pm$ 0.7b**	<0.05		
Σ n3/ Σ n6	G1	1.1 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.0 $\pm$ 0.0a	1.3 $\pm$ 0.0b	1.5 $\pm$ 0.1bc	1.7 $\pm$ 0.1c	<0.05		

Values below 0.2% were not presented in the table. Σ SFA, Σ MUFA, Σ PUFA, Σ PUFA n6, and Σ PUFA n3 are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, and n3 respectively. T – Statistical difference during the time within each group; G – Statistical difference between groups; T x G – Two way Anova considering group and time of development as variables.

^A, ^B, ^{AB} – Different letters mean statistically different values in the same group throughout the development.

* - Symbol represents values statistically different between groups.

Table 8. Fatty acid profile (%) of neutral lipids fraction in larvae (exogenous feeding) of female *Salminus hilarii* from wild (G1) and domesticated (G2) groups (mean $\pm$ SEM).

Fatty acid	Group	102 HAS	118 HAS	166 HAS	214 HAS	T	G	T x G
C14:0	G1	0.9 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 1.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.5 $\pm$ 0.1a	0.7 $\pm$ 0.2a	0.7 $\pm$ 0.1a	2.4 $\pm$ 0.7b	<0.001		
C16:0	G1	18.7 $\pm$ 3.2ab	19.3 $\pm$ 3.8ab	20.4 $\pm$ 1.0a*	13.0 $\pm$ 0.9b*	<0.05	<0.001	<0.05
	G2	15.4 $\pm$ 1.3	16.4 $\pm$ 2.8	12.3 $\pm$ 0.8**	16.1 $\pm$ 1.3**	N.S.		
C17:0	G1	0.4 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.9	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.3 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	N.S.		
C18:0	G1	13.7 $\pm$ 0.8	13.9 $\pm$ 2.0	15.7 $\pm$ 2.0	11.8 $\pm$ 0.7	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	12.9 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 1.0	15.3 $\pm$ 6.5	14.7 $\pm$ 1.8	N.S.		
Σ SFA	G1	34.0 $\pm$ 4.1ab	35.5 $\pm$ 4.6ab	40.9 $\pm$ 3.9a*	30.0 $\pm$ 2.8b	<0.05	<0.05	<0.05
	G2	29.3 $\pm$ 2.1	33.1 $\pm$ 2.4	29.1 $\pm$ 6.1**	34.9 $\pm$ 2.4	N.S.		
C16:1	G1	1.9 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.7 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2	N.S.		
C18:1n9	G1	22.7 $\pm$ 1.0a	23.1 $\pm$ 0.9a*	16.5 $\pm$ 3.0b	10.4 $\pm$ 0.7c*	<0.001	<0.05	<0.05
	G2	23.2 $\pm$ 1.6	17.7 $\pm$ 2.4**	16.3 $\pm$ 6.4	19.0 $\pm$ 2.1**	N.S.		
C18:1n7	G1	3.9 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.9	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.5 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.4	N.S.		
C20:1n9	G1	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.3	N.S.		
Σ MUFA	G1	29.7 $\pm$ 1.3a	29.4 $\pm$ 1.1ab*	21.9 $\pm$ 3.1bc	15.5 $\pm$ 1.0c*	<0.05	N.S.	<0.05
	G2	29.5 $\pm$ 1.8	23.2 $\pm$ 3.0**	21.1 $\pm$ 6.9	24.9 $\pm$ 2.9**	N.S.		
C18:2n6	G1	5.3 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 2.6	4.3 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	5.9 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 2.5	6.9 $\pm$ 1.9	N.S.		
C18:3n6	G1	1.1 $\pm$ 0.1a	1.2 $\pm$ 0.3a*	0.9 $\pm$ 0.0a	9.9 $\pm$ 1.1b	<0.001	<0.05	<0.001
	G2	0.6 $\pm$ 0.2a	0.5 $\pm$ 0.1a**	0.6 $\pm$ 0.4a	3.2 $\pm$ 1.5b	<0.05		
C18:3n3	G1	3.1 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 1.3	3.5 $\pm$ 1.5	4.6 $\pm$ 0.6*	N.S.	<0.05	N.S.
	G2	5.7 $\pm$ 0.6a	3.2 $\pm$ 1.6ab	2.8 $\pm$ 0.9b	3.2 $\pm$ 0.3ab**	<0.05		
C20:2n6	G1	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.1	N.S.		
C20:3n6	G1	3.1 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.2*	1.2 $\pm$ 0.6	N.S.	<0.05	N.S.
	G2	3.2 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.2**	2.1 $\pm$ 0.1	N.S.		
C20:4N6	G1	6.1 $\pm$ 0.4a	5.0 $\pm$ 1.7ab	4.7 $\pm$ 0.6ab	2.9 $\pm$ 0.7b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	6.0 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 1.0	7.4 $\pm$ 2.3	3.9 $\pm$ 0.7	N.S.		
C20:3n3	G1	0.4 $\pm$ 0.1a	0.6 $\pm$ 0.2ab	1.2 $\pm$ 0.4ab*	3.6 $\pm$ 1.4b	<0.05	<0.05	N.S.
	G2	0.4 $\pm$ 0.1a	0.4 $\pm$ 0.1a	0.4 $\pm$ 0.0a**	2.2 $\pm$ 0.5b	<0.001		
C20:4n3	G1	0.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.2	N.S.		
C20:5n3	G1	1.2 $\pm$ 0.3a	1.4 $\pm$ 0.4a	3.8 $\pm$ 0.6ab	5.6 $\pm$ 2.0b	<0.05	N.S.	N.S.
	G2	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 1.7	2.8 $\pm$ 0.8	N.S.		
C22:4n6	G1	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.4 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	N.S.		
C22:5n6	G1	2.0 $\pm$ 0.5ab	1.3 $\pm$ 0.5a	2.1 $\pm$ 0.9ab	3.7 $\pm$ 0.5b*	<0.05	<0.05	N.S.
	G2	1.9 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.7**	N.S.		
C22:5n3	G1	1.7 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.9	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.3 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 1.25	N.S.		
C22:6n3	G1	10.3 $\pm$ 3.2	10.1 $\pm$ 1.7	8.2 $\pm$ 2.1*	12.2 $\pm$ 1.1	N.S.	<0.05	<0.05
	G2	12.5 $\pm$ 2.9ab	16.4 $\pm$ 4.2ab	20.2 $\pm$ 4.4a**	10.0 $\pm$ 1.7b	<0.05		
Σ PUFA	G1	36.3 $\pm$ 5.4	35.1 $\pm$ 3.8	37.2 $\pm$ 1.0*	54.5 $\pm$ 2.1*	N.S.	N.H	<0.001
	G2	41.2 $\pm$ 2.6a	43.7 $\pm$ 4.2ab	49.8 $\pm$ 1.5b**	40.4 $\pm$ 3.0a**	<0.05		
Σ PUFA n3	G1	17.0 $\pm$ 4.7a	18.6 $\pm$ 2.3a*	19.0 $\pm$ 3.1a*	29.1 $\pm$ 2.1b*	<0.05	<0.05	<0.001
	G2	21.5 $\pm$ 2.64	24.4 $\pm$ 2.63**	27.7 $\pm$ 2.75**	20.7 $\pm$ 4.03**	N.S.		
Σ PUFA n6	G1	19.3 $\pm$ 0.8a	16.5 $\pm$ 1.8a	18.2 $\pm$ 2.5a	25.5 $\pm$ 0.3b*	<0.05	<0.05	<0.001
	G2	19.7 $\pm$ 1.42	19.4 $\pm$ 2.04	22.1 $\pm$ 2.23	19.7 $\pm$ 1.61**	N.S.		
Σ n3/ Σ n6	G1	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.3	N.S.		

Values below 0.2% were not presented in the table. Σ SFA, Σ MUFA, Σ PUFA, Σ PUFA n6, and Σ PUFA n3 are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, and n3 respectively. T – Statistical difference during the time within each group; G – Statistical difference between groups; T x G – Two way Anova considering group and time of development as variables.

^A, ^B, ^{AB} – Different letters mean statistically different values in the same group throughout the development.

* - Symbol represents values statistically different between groups.

Table 9. Fatty acid profile (%) of polar lipids fraction in larvae (exogenous feeding) of female *Salminus hilarii* from wild (G1) and domesticated (G2) groups (mean $\pm$ SEM).

Fatty acid	Group	102 HAS	118 HAS	166 HAS	214 HAS	T	G	T x G
C16:0	G1	13.0 $\pm$ 5.8	13.7 $\pm$ 1.9	13.4 $\pm$ 1.7	10.1 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	10.6 $\pm$ 1.9	13.0 $\pm$ 2.7	9.1 $\pm$ 2.5	10.9 $\pm$ 3.9	N.S.		
C17:0	G1	0.3 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.3 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	N.S.		
C18:0	G1	16.6 $\pm$ 3.8	18.7 $\pm$ 1.6	16.9 $\pm$ 2.5	15.2 $\pm$ 1.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	16.8 $\pm$ 1.5	18.7 $\pm$ 2.1	18.0 $\pm$ 2.8	17.9 $\pm$ 3.1	N.S.		
Σ SFA	G1	31.2 $\pm$ 7.8	34.9 $\pm$ 2.7	33.5 $\pm$ 2.9	28.3 $\pm$ 2.7	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	29.3 $\pm$ 3.3	34.3 $\pm$ 4.8	28.8 $\pm$ 5.6	31.9 $\pm$ 7.1	N.S.		
C18:1n9	G1	8.9 $\pm$ 1.6	10.3 $\pm$ 2.0	8.0 $\pm$ 1.1	6.8 $\pm$ 0.7	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	8.8 $\pm$ 1.1	9.1 $\pm$ 1.0	7.0 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 2.3	N.S.		
C18:1n7	G1	2.0 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.7	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.9 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2	N.S.		
Σ MUFA	G1	12.1 $\pm$ 1.8	13.1 $\pm$ 2.6	12.3 $\pm$ 1.8	9.6 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	11.9 $\pm$ 1.3	12.2 $\pm$ 1.8	9.8 $\pm$ 1.5	10.5 $\pm$ 2.4	N.S.		
C18:2n6	G1	2.3 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.0	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	2.3 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.8	2.4 $\pm$ 1.1	N.S.		
C18:3n3	G1	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.1 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.	0.7 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.3	N.S.		
C20:3n6	G1	2.5 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.0 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	N.S.		
C20:4n6	G1	10.4 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.3	10.7 $\pm$ 1.1	8.2 $\pm$ 1.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	9.9 $\pm$ 0.5	9.6 $\pm$ 0.8	10.4 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.5	N.S.		
C20:5n3	G1	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 3.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.1 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.3	N.S.		
C22:4n6	G1	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.9	N.S.		
C22:5n6	G1	4.4 $\pm$ 0.8	3.6 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 0.9	5.1 $\pm$ 1.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	3.9 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 2.3	4.4 $\pm$ 0.6	5.1 $\pm$ 1.6	N.S.		
C22:5n3	G1	1.8 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 2.1	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.7 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.5	N.S.		
C22:6n3	G1	31.2 $\pm$ 8.1	28.0 $\pm$ 3.8	33.1 $\pm$ 3.4	33.6 $\pm$ 3.6	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	33.0 $\pm$ 3.8	28.2 $\pm$ 6.8	36.6 $\pm$ 6.1	31.7 $\pm$ 6.7	N.S.		
Σ PUFA	G1	56.6 $\pm$ 9.6	51.9 $\pm$ 4.9	54.1 $\pm$ 4.6	61.9 $\pm$ 2.3	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	58.8 $\pm$ 4.6	53.5 $\pm$ 6.5	61.3 $\pm$ 7.0	57.6 $\pm$ 9.6	N.S.		
Σ PUFA n3	G1	34.8 $\pm$ 8.6	31.6 $\pm$ 4.2	37.0 $\pm$ 2.8	44.1 $\pm$ 2.2	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	37.3 $\pm$ 4.1	31.7 $\pm$ 7.3	40.1 $\pm$ 6.2	38.2 $\pm$ 7.2	N.S.		
Σ PUFA n6	G1	21.8 $\pm$ 1.0	20.4 $\pm$ 1.0	19.8 $\pm$ 1.8	17.9 $\pm$ 2.8	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	21.5 $\pm$ 0.5	21.7 $\pm$ 2.1	21.2 $\pm$ 0.9	19.4 $\pm$ 2.3	N.S.		
Σ n3/ Σ n6	G1	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.5	N.S.	N.S.	N.S.
	G2	1.7 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.1	N.S.		

Values below 0.2% were not presented in the table. Σ SFA, Σ MUFA, Σ PUFA, Σ PUFA n6, and Σ PUFA n3 are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, and n3 respectively. T – Statistical difference during the time within each group; G – Statistical difference between groups; T x G – Two way Anova considering group and time of development as variables.

^A, ^B, ^{AB} – Different letters mean statistically different values in the same group throughout the development.

* - Symbol represents values statistically different between groups.

Figure 11. Fertilization rates of *Salminus hilarii* eggs from wild (G1) and domesticated (G2) females (mean $\pm$ SEM).

^A, ^B, ^{AB} – Different letters mean statistically different values in the same group throughout the development.

* - Symbol represents values statistically different between groups.

4. Discussion

Lipid analyses during *S. hilarii* development showed that the origin of the females (wild or domesticated) influenced the FA composition of neutral and polar lipids in the three main larva development phases. Differences in the lipid composition of eggs and larvae (exogenous feeding) from wild and captivity have been reported in gilthead sea bream (Mourente *et al.*, 1989), striped bass (Harrel and Woods 1995), turbot (Silversand *et al.*, 1996) and sea bass (Bell *et al.*, 1997), but these authors attributed these differences to distinct diets. According to Tocher (2010), broodstock nutrition is essential in the production of high-quality eggs and larvae of freshwater and marine species; in addition, high levels of PUFA in the diet can positively affect the offspring composition and consequently the development and survival of larvae in the endogenous feeding phase. In the present study, we standardized the feeding for both groups, so the differences could be justified by domestication. Araki *et al.*, (2007) reported that domestication directly influences various physiological processes within a few generations, including the development and survival of eggs and larvae.

Changes in FA composition occurred mainly in the neutral lipids, whereas the polar fraction of both groups maintained similar profiles. The FA composition of the phospholipids (and of the biological membranes) is significantly influenced by external factors, such as water temperature (Sargent *et al.*, 1989). Because both groups were kept under the same environmental conditions, few differences were observed in the polar fraction throughout development. By contrast, the fatty acid composition in the neutral fraction is influenced by other factors, such as diet and genetic background.

The main neutral lipids in fish eggs are triglycerides (TGs), which are formed by side chains (*sn*1 and *sn*3) composed of SFA and MUFA (80%) and a central fatty acid (*sn*2), which is mostly a PUFA (20%). The high percentages of SFAs and MUFAs found in the neutral fraction of the eggs confirm the importance of these fatty acids as an energy source preferentially consumed to provide metabolic energy during fish embryonic development. According to Tocher *et al.*, (1985), the SFAs and MUFAs from the side chains of TGs are important in preserving, even temporally, some PUFA, which is fundamental for

embryonic development. For example, DHA and EPA tend to increase during embryogenesis.

Several authors have reported a decrease in SFAs and MUFAs and an increase in PUFAs during embryonic development in marine and freshwater fish eggs (Palácios *et al.*, 2007; Soivio *et al.*, 1989; Wiegand 1996; Haliloglu *et al.*, 2003). By contrast, MUFA increased during the yolk sac phase (mainly C18:1n9 from 0 HAS to 28 HAS) in *S. hilarii* larvae. Considering the high number of carbons, these fatty acids can be spared for processes with high energy demands, such as egg hatching occurring between 28 and 32 HAS. The SFA profile followed the same decreasing pattern, mainly due to depletion of C16:0. As found for other species, C16:0 is the main fatty acid used for energy in this stage of development in *S. hilarii*. According to Wiegand (1996), knowing the preferential substrates in key events, such as disruption of the chorion, allows for adjustments in the fish feeding patterns to increase the survival rate of the offspring.

The data obtained during the egg phase suggested that development occurred in both environments based on the consumption of SFAs and replacement by MUFAs, indicating that *S. hilarii* larvae mainly used SFAs for hatching. Even with the broodstock eating the same diet, the eggs of the G2 females presented higher percentages of PUFA n6, evidencing that the domestication can result in a differential fatty acid mobilization pattern.

In the polar fraction of the eggs, the SFA content decreased in G1 females and also exhibited a tendency to decrease in G2 females, following an inverse pattern of PUFAs, which slightly increased in this stage. This profile is associated with a restructuring of the cell membranes following changes in environmental conditions, or a remodeling of these membranes due to an increased use of SFAs in the *sn1* position of phospholipids during this period of embryonic development.

After hatching, the SFA and MUFA contents dropped in the neutral fraction of G2 females, with the same tendency occurring in G1 females. These results suggest that these animals still use these substrates as energy sources during development and in other costly process such as early swimming. According to Sargent *et al.*, (1989), selective oxidation of SFAs and MUFAs in the swimming muscles (especially C16:0 and C18:1n9), instead of PUFAs

explains the increase of FA in the neutral fraction of both groups. As previously reported, C16:0 and C18:1n7 are the most consumed FAs in this development phase (Sargent *et al.*, 1989).

According to Zhu (1998), the increase in PUFA n3 and n6 in neutral lipids suggests that these FA are stored for subsequent use in the structure of new tissues, such as in the nervous and visual systems and for participation in the immune system and cell signaling. Accordingly, DHA and ARA are the primarily increased FAs in *S. hilarii* neutral lipids.

The increasing PUFA n3 in the polar fraction of larvae followed the same pattern found in Pacific halibut (Whyte *et al.*, 1993), Atlantic halibut (Falk-Petersen *et al.*, 1989) and Atlantic herring (Tocher *et al.*, 1985) during embryonic and larval development, suggesting non-energetic roles for these substrates. Comparison of larvae from both groups revealed that the animals produced by domesticated females retain more PUFA n3 in their neutral lipids fraction, probably because they consumed more SFA and MUFA. These results differ from larvae from wild females, which show a selective use of FA during the yolk sac absorption phase.

At approximately 96 HAS, the larvae begin the process of mouth opening, followed by exogenous feeding (Honji *et al.*, 2009). In this phase, we observed a marked difference between both groups, with a greater percentage of SFA in G1 females, which might be related to their higher consumption of *Artemia* sp. nauplii, which is rich in SFAs and MUFAs (Palácios *et al.*, 2007; Glencross *et al.*, 2009).

The polar fraction remained stable from the beginning of the period of exogenous feeding until the end of the experiment (214 HAS), with a high proportion of PUFAs, mainly n3. The high percentage of DHA in n3 evidenced a high potential of elongation and desaturation of C18:3n3 and EPA in this highly unsaturated FA (HUFA), which is typical in freshwater fish species (Sargent *et al.*, 2001; Tocher *et al.*, 2002). In addition, low levels of DHA were reported in the FA analysis of *Artemia* (Palácios *et al.*, 2007). In the neutral fraction, the PUFA content increased at 166 HAS and remained stable until 214 HAS in G2 females. By contrast, the PUFA content gradually increased in G1 females until 214 HAS. These changes were inversely related to those in MUFAs and SFAs, which decreased from 166 to 214 HAS in G1 females. These differences may

be related to a higher consumption of *Artemia* in G2 (mainly C16:0 and C18:1n9) and thus a higher deposition of these FAs. Alternatively, G2 may use PUFAs as an energy source, such as DHA, explaining the decrease in PUFAs at 214 HAS.

In conclusion, our data showed that the domestication of *S. hilarii* females influenced the FA metabolism during egg and larva development. However, the membrane structure (i.e., fatty acids of the phospholipids) remained stable, with changes mainly in the neutral fraction. These results suggest that when external conditions, such as water and feed quality, remained constant, the domestication of *S. hilarii* females did not affect the structural fatty acids composition, but somehow influenced the selectivity of consumption and/or storage of specific fatty acids.

5. Acknowledgements

This work was supported by a research grant from FAPESP (01/10483-1) and a Master's fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would also like to thank the fishermen who helped us to collect the wild females as well as the DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica do Governo do Estado de São Paulo) for providing the facilities to perform experiments at the Ponte Nova Hatchery.

6. References

- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros do Brasil. EDUEM, Maringá
- Araki H, Cooper B, Blouin MS (2007) Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318:100-103
- Bell JG, Farndale BM, Bruce MP, Navas JM, Carillo M (1997) Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 149:107–119
- Bromage NR (1996) Broodstock management and seed quality – general considerations. In: Bromage NR, Roberts RJ (ed) Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science, London
- Christie WW Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. The Oily Press, England
- Falk-Petersen S, Sargent JR, Fox C, Falk-Petersen IB, Haug T, Kjørsvik E (1989) Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar Biol* 101:553–556
- Folch J, Less M, Sloane M, Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-503
- Fraser AJ, Gamble JC, Sargent JR (1988) Changes in lipid content, lipid class composition, and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Mar Biol* 99:307–313
- Frings CS, Fendly TW, Dunn RT, Quenn CA (1972) Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clin Chem* 18:673-674

- Glencross BD (2009) Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Aquaculture* 1:71-124
- Gunasekera RM, De Silva SS, Ingram BA (1999) Early ontogeny-related changes of the fatty acid composition in the Percichthyid fishes trout cod, *Maccullochella macquariensis* and Murray cod, *M. peelii peelii*. *Aquat Living Resour* 12:219–227
- Haliloglu HI, Aras NM, Yanik T, Atamanalp M, Kocaman EM (2003) Investigation of changes in fatty acid composition at early development stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Biol* 27:1105–1109
- Hamza N, Mhetli M, Khemis IB, Cahu C, Kestemont P (2008) Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture* 275:274-282
- Harrel RM, Woods LC (1995) Comparative fatty acid composition of eggs from domesticated and wild striped bass *Morone saxatilis*. *Aquaculture* 133:225–233
- Hildebrand SG, Bell MC, Richey EP, Anderson JJ (1980) Analysis of environmental tissues related to small-scale hydroelectric development IV: Design and consideration for passing fish upstream around dams. Environmental Services Division, Virginia
- Honji RM, Narcizo AM, Borella MI, Romagosa E, Moreira RG (2009) Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiol Biochem* 35:109-123
- Honji RM, Mello PH, Araújo BC, Rodrigues-Filho JA, Hilsdorf AWS, Moreira RG (2011) Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): Implications for

- the conservation of this species. Neotropical Ichthyology doi: 10.1590/S1679-62252011005000012
- Mourente G, Carrascosa MA, Velasco C, Odriozola JM (1989) Effect of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) broodstock diets on egg lipid composition and spawning quality. EAS 10:179-180
- Palácios E, Racotta IS, Aparicio B, Arjona O, Martínez-Palacios CA (2007) Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. Fish Physiol Biochem 33:81-91
- Parra G, Rønnestad I, Yúfera M (1999) Energy metabolism in eggs and larvae of the *Senegal sole*. J Fish Biol 55:205–214
- Parrish CC (1999) Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts MT, Wainman BC (2^{ed}) Lipids in Freshwater Ecosystems. Springer-Verlag, New York
- Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. Aquaculture 155:102-115
- Sargent J, McEvoy L, Estevez A, Bell G, Henderson J, Tocher D (1999) Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture 179:217-229
- Sargent JR, Bell MV, Henderson RJ, Tocher DJ (2001) The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. Aquaculture 43:103-124
- Sargent JR, Henderson RJ, Tocher DR (1989) The lipids. In: Halver JE (2^{ed}) Fish Nutrition. Academic Press, California
- Silversand C, Norberg B, Haux C (1996) Fatty-acid composition of ovulated eggs from wild and cultured turbot *Scophthalmus maximus* in relation to yolk and oil globule lipids. Mar Biol 125:269–278

- Soivio A, Niemisto M, Backstrom M (1989) Fatty acid composition of *Coregonus muksun* Pallas: changes during incubation, hatching, feeding and starvation. *Aquaculture* 79:163–168
- Tocher DR (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research* 41:717-732
- Tocher DR, Agaba M, Hastings N, Bell JG, Dick JR, Teale AJ (2002) Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol Biochem* 24:309–320
- Tocher DR, Fraser AJ, Sargent JR, Gamble JC (1985) Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 20:69–74
- Tocher DR, Fraser AJ, Sargent JR, Gamble JC (1989) Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids* 20:84–89
- Vazzoler AEAM (1981) Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes; reprodução e crescimento. CNPq, Brasília
- Vazzoler AEAM (1996) Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá
- Whyte JNC, Clarke WC, Ginther NG, Jensen OT (1993) Biochemical changes during embryogenesis of the Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis* (Schmidt) *Aquacult Fish Manage* 24:193-201
- Wiegand MD (1996) Utilization of yolk fatty acids by goldfish embryos and larvae. *Fish Physiol Biochem* 15:21–27

- Yang Z (1995) Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. Dissertation, Memorial University of Newfoundland
- Zar JH (1999) Bioestatistical Analysis. 4. ed. Prentice-Hall, New Jersey
- Zhu P (1998) A study of biochemical composition in captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus*) eggs and larvae. Dissertation, University of Newfoundland

CAPÍTULO 4

Discussão Geral e Conclusões

1. Discussão Geral e Conclusões

Os ovos e larvas dos dois grupos experimentais apresentaram um desenvolvimento morfológico semelhante havendo apenas poucas diferenças pontuais, onde os animais do G1 apresentaram um maior comprimento total (16 e 48 HAD) e bucal (66 HAD), comparados aos animais do G2. Essas diferenças morfológicas não influenciaram no sucesso de vida da prole dos dois grupos, já que foi constatada no início da alimentação exógena a presença de um trato digestório funcional dos dois grupos, com presença de conteúdo estomacal e de fezes nas larvas. Os eventos morfológicos de *S. hilarii* foram similares e ocorreram praticamente no mesmo período ao relatado para outra espécie congênica (*S. brasiliensis*) confirmando a hipótese de que mesmo esses eventos sendo espécie-específicos existe um padrão no desenvolvimento embrionário e larval de espécies do mesmo gênero, possivelmente devido a um aporte genético semelhante.

Essas alterações morfológicas pontuais, encontradas no desenvolvimento dos grupos podem estar relacionadas a taxas de síntese protéica diferenciada no momento da eclosão dos ovos, sendo este um período de intensa atividade, e que gera uma grande síntese e deposição dos substratos energéticos. As larvas do G1 apresentaram um pico protéico antes do momento da eclosão dos ovos, possivelmente para utilização deste substrato energético na fase de natação inicial, sendo observado um aumento na concentração de proteínas nas larvas do G2 após o momento da eclosão dos ovos, sugerindo um atraso na síntese protéica neste grupo, porém aparentemente essa alteração não influenciou no desenvolvimento larval.

Apesar da similaridade no perfil quantitativo dos lipídios, fica claro que a bagagem genética diferenciada entre os grupos modula a seletividade no armazenamento e oxidação dos ácidos graxos, principalmente de ácidos graxos importantes para o desenvolvimento como os das séries n6 e n3. No entanto as estruturas das membranas biológicas dos dois grupos apresentaram um perfil muito similar, apenas com alterações pontuais nas séries n6 e n3, sendo que essas alterações não resultaram em diferenças estatisticamente significativas na concentração dos PUFA's totais entre os grupos. Esta similaridade justifica um mesmo padrão morfológico no desenvolvimento entre

os ovos e larvas do G1e G2, já que os ácidos graxos, juntamente com outros substratos energéticos, são diretamente responsáveis pelo crescimento e estruturação corpórea do embrião e da larva.

Corroborando com os dados discutidos por Araki *et al.*, (2007) o aporte genético diferenciado entre os grupos influenciou na fertilização dos ovos, já que os ovos do G1 apresentaram uma maior taxa de fertilização comparada aos do G2, justifica-se esta afirmação, pois todas as outras variáveis capazes de influenciar no processo reprodutivo, como o regime alimentar, as condições de confinamento, e a indução hormonal a reprodução foram mantidas padronizadas para os dois grupos experimentais.

Devido à grande redução nos estoques naturais desta espécie a obtenção de fêmeas reprodutoras provindas do ambiente natural deve ser repensada. Devido a um pior desempenho reprodutivo do G2 fica claro que se faz necessário um maior investimento em trabalhos de exigências nutricionais específicas e de seleção genética, para que se aumente a capacidade zootécnica deste grupo, sem que isso possa influenciar na variabilidade genética desta espécie na região do Alto do Tietê em futuros programas de repovoamento.

Resumo Geral

A tabarana (*Salminus hilarii*), pertencente à classe Actinopterygii, família Characidae (ordem Characiformes) é uma espécie importante na bacia do Alto Tietê. Devido a suas características migratórias, e a construção de inúmeras barragens no curso de diversos rios desta bacia esta espécie vem sendo foco de diversos programas de repovoamento. Para o desenvolvimento de um programa de repovoamento, dados acerca da biologia e fisiologia reprodutiva da espécie são importantes, pois irão viabilizar uma maior produção de alevinos. Diversos fatores podem interferir diretamente no sucesso reprodutivo de peixes, como a condição alimentar, a temperatura, o fotoperíodo, mas pouco se conhece sobre a influência dos processos de domesticação e confinamento dos reprodutores no desenvolvimento da prole. Este trabalho teve como objetivo investigar possíveis alterações na morfologia, e nos processos de mobilização de substratos energéticos (lipídios, proteínas e ácidos graxos) da prole de *Salminus hilarii* provenientes de fêmeas de ambiente natural (G1) e de cativeiro (G2), para a condução de um programa de repovoamento na bacia do Alto do Tietê. Foram observadas alterações pontuais na morfologia dos grupos, com ovos e larvas do G1 apresentando um maior comprimento total e bucal quando comparado ao G2. Quantitativamente as larvas dos dois grupos apresentaram um padrão semelhante nas concentrações de lipídios e proteínas no decorrer do desenvolvimento, salvo algumas exceções. Já qualitativamente, foram observadas diversas alterações principalmente nos ácidos graxos das séries Omega 3 (n3) e Omega 6 (n6) da fração neutra, além de um maior sucesso na fertilização dos ovos do G1. Com seu estoque natural praticamente esgotado conclui-se que mesmo o G2 apresentando um resultado zootécnico inferior ao G1 a obtenção de fêmeas do ambiente natural para programas de repovoamento pode resultar em um impacto ainda maior para esta espécie. Desta forma, faz-se necessário um maior investimento em estudos de exigências nutricionais e de seleção genética, para que se aumente o desempenho zootécnico de larvas de fêmeas de cativeiro, sem que haja um dano na variabilidade genética de *Salminus hilarii* em futuros programas de repovoamento na bacia do Alto do Tietê.

Palavras-chave: confinamento, desenvolvimento, metabolismo, repovoamento, *Salminus hilarii*.

Abstract

Tabarana (*Salminus hilarii*) belonging to the Actinopterygii class, Characidae family (order Characiformes) is an important fish species in the Alto Tietê river basin. Due to their migratory characteristics and constructions of several dams on many rivers in this basin, this species has been the focus of several restocking programs. For the development of a restocking program, data on biology and reproductive physiology of the species are important because they will enable a higher production of fingerlings. Several factors may directly affect the reproductive success of fish, as the nutritional condition, temperature, photoperiod, but there are few data available on the influence of the process of broodstock domestication and confinement in the offspring development. This work aimed looking for possible changes in morphology and in the processes of mobilization of energetic substrates (lipids, proteins and fatty acids) in the *Salminus hilarii* offspring from females from wild (G1) and captivity (G2) for the conduction of a restocking program in the Alto Tietê river basin. Were observed only occasional changes were observed in the offspring morphology between both groups, with G1 eggs and larvae with a greater total and buccal length when compared with G2. Quantitatively the larvae from both groups showed a similar pattern in lipids and proteins concentration during development, with a few exceptions. In the other hand, qualitatively, several changes were observed, mainly in the omega 3 (n3) and omega 6 (n6) fatty acids from the neutral fraction, besides better results in the fertilization rate of G1 eggs. With its natural stock nearly exhausted, we concluded that even the G2 featuring lower zootechnical results than G1, obtaining females from natural environmental for restocking programs can results in an even greater impact for this species. Therefore it is necessary greater investment in studies of nutritional requirements and genetic selection, in order to increase the zootechnical performance of larvae from domesticated females, without serious damage to the genetic variability of *Salminus hilarii* in future restocking programs in the Alto Tietê river basin.

Keywords: confinement, development, metabolism, restocking, *Salminus hilarii*.