Universidade Estadual Paulista – UNESP
Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP

INFLUÊNCIA DA IDADE E DE INDUÇÕES HORMONAIS EM ANOS CONSECUTIVOS SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DO PACU, *Piaractus mesopotamicus*

Marianne Schorer

Jaboticabal, SP
Julho/ 2013

Universidade Estadual Paulista – UNESP
Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP

INFLUÊNCIA DA IDADE E DE INDUÇÕES HORMONAIS EM ANOS CONSECUTIVOS SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DO PACU, *Piaractus mesopotamicus*

Marianne Schorer

Orientador: Dr. Sérgio Ricardo Batlouni

Tese apresentada ao Programa de Pós – graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, SP
Julho/ 2013

DEDICO

Aos meus filhos Anna Laura e João Pedro, pelo amor incondicional em mim despertado.

Ao meu marido Ian, por todos nossos momentos juntos

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro e reserva técnica do processo 2010/ 01841-0, concedidos para a realização deste experimento e tese.

Ao Dr. Sérgio Ricardo Batlouni pela orientação tão minuciosa e dedicada nos meus relatórios, pelo auxílio nas coletas, e pela oportunidade de desenvolver essa tese, aprendendo novas técnicas e análises.

Aos membros, Fabiana, Róberson, Thaís, Lindomar entre outros do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP pela disponibilidade de equipamentos para processamento de análises das coletas.

A Dra. Renata Moreira Guimarães pela disponibilidade do seu Laboratório no Instituto de Biociências da USP/ Departamento de Fisiologia, para a realização das análises de esteróides plasmáticos. E um obrigada especial para Thiago e Renato, pela paciência e auxílio durante as análises. Além do pessoal que conheci, todos sempre dispostos a ajudar: Gabriela, Aline, Andreone, Jaboti, Amanda, Paulo, entre outros.

Aos colegas do laboratório: Dani, Guilherme, Eduardo, Thiago, Rafael, Tilão, Patrick, Xina e Rodrigo pela ajuda nas coletas e pelo aprendizado no trabalho coletivo e convívio mútuo.

Aos funcionários do CAUNESP: Seu Mauro, Márcio Garnizé, Valdecir e Márcio Perereca pela ajuda nas coletas, boa convivência e amizade.

A funcionária da pós-graduação Veralice pelo carinho, compreensão e amizade ao longo desses anos.

Ao meu pai e minha mãe (*in memorian*) que sempre priorizaram meus estudos, me dando uma base sólida de amor, carinho, compreensão, conhecimento e confiança, responsáveis pelo que me tornei, para chegar até aqui.

A minha tia, Professora de História Dra. Maria Thereza Schorer Petrone, a qual eu admiro e me espelho como pesquisadora.

As minhas irmãs Gabriela e Lilian, mães substitutas, amigas, professoras, minhas amadas! Gabi e Edu (*Cunha*), um obrigada especial por me hospedarem algumas semanas durante as minhas análises em São Paulo.

A minha cunhada Luana, muito querida, que correu atrás de gelo seco para as minhas amostras não descongelarem. Sempre muito prestativa.

Aos meus filhos, Anna Laura e João Pedro, por me escolherem como mãe, por serem bonzinhos, queridos, companheiros e compreensivos comigo. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu marido, Ian, pelos fins de semana, feriados e dias comemorativos, me ajudando nos experimentos, pelo cuidado com as crianças, pela preocupação comigo, por me apoiar profissionalmente, pelo seu amor e carinho! Você é muito especial para mim.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro e reserva técnica do processo 2010/ 01841-0, concedidos para a realização deste experimento e tese.

Ao Dr. Sérgio Ricardo Batlouni pela orientação tão minuciosa e dedicada nos meus relatórios, pelo auxílio nas coletas, e pela oportunidade de desenvolver essa tese, aprendendo novas técnicas e análises.

Aos membros, Fabiana, Róberson, Thaís, Lindomar entre outros do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP pela disponibilidade de equipamentos para processamento de análises das coletas.

A Dra. Renata Moreira Guimarães pela disponibilidade do seu Laboratório no Instituto de Biociências da USP/ Departamento de Fisiologia, para a realização das análises de esteróides plasmáticos. E um obrigada especial para Thiago e Renato, pela paciência e auxílio durante as análises. Além do pessoal que conheci, todos sempre dispostos a ajudar: Gabriela, Aline, Andreone, Jaboti, Amanda, Paulo, entre outros.

Aos colegas do laboratório: Dani, Guilherme, Eduardo, Thiago, Rafael, Tilão, Patrick, Xina e Rodrigo pela ajuda nas coletas e pelo aprendizado no trabalho coletivo e convívio mútuo.

Aos funcionários do CAUNESP: Seu Mauro, Márcio Garnizé, Valdecir e Márcio Perereca pela ajuda nas coletas, boa convivência e amizade.

A funcionária da pós-graduação Veralice pelo carinho, compreensão e amizade ao longo desses anos.

Ao meu pai e minha mãe (*in memorian*) que sempre priorizaram meus estudos, me dando uma base sólida de amor, carinho, compreensão, conhecimento e confiança, responsáveis pelo que me tornei, para chegar até aqui.

A minha tia, Professora de História Dra. Maria Thereza Schorer Petrone, a qual eu admiro e me espelho como pesquisadora.

As minhas irmãs Gabriela e Lilian, mães substitutas, amigas, professoras, minhas amadas! Gabi e Edu (*Cunha*), um obrigada especial por me hospedarem algumas semanas durante as minhas análises em São Paulo.

A minha cunhada Luana, muito querida, que correu atrás de gelo seco para as minhas amostras não descongelarem. Sempre muito prestativa.

Aos meus filhos, Anna Laura e João Pedro, por me escolherem como mãe, por serem bonzinhos, queridos, companheiros e compreensivos comigo. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu marido, Ian, pelos fins de semana, feriados e dias comemorativos, me ajudando nos experimentos, pelo cuidado com as crianças, pela preocupação comigo, por me apoiar profissionalmente, pelo seu amor e carinho! Você é muito especial para mim.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....iii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....iv
Resumo.....1
Abstract.....2
1. Introdução 3
2. Material e métodos.....5
2.1. Ciclo reprodutivo de fêmeas de pacu.....5
2.1.1. Amostragens.....6
2.1.2. Amostragens complementares.....8
2.2. Avaliação comparada do desempenho reprodutivo das F1 e F2.....9
2.2.1. Desova induzida 9
2.2.2. Desempenho reprodutivo.....9
2.2.3. Larvicultura 10
2.3. Análises individuais das fêmeas de pacu.....10
2.4. Parâmetros físicos e químicos da água 11
2.5. Análises estatísticas.....11
3. Resultados 12
3.1. Ciclo reprodutivo de fêmeas de pacu.....12
3.1.1. Amostragens 12
3.1.2. Amostragens complementares 21
3.2. Avaliação comparada do desempenho reprodutivo das F1 e F2.....22
3.2.1. Desova induzida 22
3.2.2. Desempenho reprodutivo.....23
3.2.3. Larvicultura 26
3.3. Análises individuais das fêmeas de pacu 28
3.4. Parâmetros físicos e químicos da água 29
4. Discussão.....30
5. Referências bibliográficas.....35

LISTA DE FIGURAS.....10
Figura 1 – Mensuração das características morfométricas (papila urogenital, rigidez e espessura do abdômen de F1 e F2.....17
Figura 2 – Distribuição percentual dos ovócitos de acordo com a posição do núcleo em diferentes períodos entre F1 e F2 de pacu em dezembro 2009 (A), outubro 2010 (B), dezembro 2010 (C), outubro 2011 (D) e dezembro 2011 (E) 25
Figura 3 – Frequência percentual (%) da distribuição dos ovócitos de F1 e F2 de pacu coletados por canulação em dezembro 2009 (A), outubro 2010 (B), dezembro 2010 (C), outubro 2011 (D) e dezembro 2011 (E) 27
Figura 4 - Valores médios de 17β- estradiol (A), 17α OH-progesterona (B), testosterona (C) e 11 – cetotestosterona (D), com erro padrão, em fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu em dezembro de 2009 a dezembro de 2011.....30
Figura 5 - Valores médios das freqüências percentuais das diferentes fases dos ovócitos determinados histologicamente, com erro padrão, para F1 e F2 de pacu em dezembro de 2009.....31
Figura 6 – Ovócitos de F1 em grumos (ovos aderidos uns aos outros, sem viabilidade) (A) e F2 viáveis para fertilização (B).....33
Figura 7 - Média das taxas de fecundidade relativa, com erro padrão de fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu em dezembro de 2010 e 2011.....34
Figura 8 – Diâmetro dos ovócitos de desovas de fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu: dezembro de 2010 (A) e dezembro de 2011 (B).....35
Figura 9 – Biomassa (g) (A), comprimento total (mm) (B), altura do corpo (mm) (C) e volume de vitelo (mm^3) (D) de larvas de pacu do momento da eclosão até as primeiras 96 horas após eclosão, durante dois anos consecutivos.....37
LISTA DE TABELAS.....10
Tabela 1 - Valores médios com erro padrão, do comprimento da espessura de abdômen (EA – cm) e do comprimento da espessura de abdômen pelo comprimento total (EA/ CT) de F1 e F2 de pacu de dezembro de 2009 a dezembro de 2011.....23
Tabela 2 – Rigidez do abdominal e características da papila urogenital de F1 e F2 de pacu, de dezembro de 2009 a dezembro de 2011.....24
Tabela 3 – Diâmetro médio (µm) da distribuição dos ovócitos de F1 e F2 de pacu coletados por canulação em dezembro 2009, 2010 e 2011.....26
Tabela 4 – Dados de resposta a indução hormonal de fêmeas de pacus observados durante dois anos.....33
Tabela 5 - Diâmetro médio (µm) dos ovócitos de desovas de fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu: dezembro de 2010 e 2011.....35
Tabela 6 – Dados individuais de fêmeas de pacu durante dois anos consecutivo (2010 e 2011).....38

Resumo

O objetivo deste estudo foi descrever e comparar respectivamente o ciclo e o desempenho reprodutivo de fêmeas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, de diferentes idades. Além disso, avaliamos o efeito de induções hormonais em anos consecutivos no desempenho reprodutivo desta espécie. Foram utilizados dois grupos de fêmeas, as F1 (10 anos de idade) e as F2 (4 anos de idade) mantidas no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP/ Jaboticabal - SP). Para análise do ciclo reprodutivo foram realizadas biometrias nos períodos de vitelogênese (outubro), desova (dezembro) e repouso (março) em dois anos consecutivos. Em cada biometria, 5 a 10 indivíduos de cada grupo foram aleatoriamente separados e submetidos à canulação para obtenção de amostras de ovócitos que foram analisados quanto às características da vesícula germinativa e do diâmetro dos ovócitos. Amostras de sangue, coletadas por punção caudal, foram utilizadas para determinar a concentração plasmática de esteróides gonadais. Para a avaliação comparada do desempenho reprodutivo as fêmeas foram induzidas com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) (10% - 0,5 mg hipófise kg^{-1} de peixe; 90% - 5,5 mg de hipófise kg^{-1} de peixe). Foi determinado o percentual de fêmeas de cada grupo que ovulou e as taxas de fertilidade e eclosão. Amostras das desovas foram coletadas para determinar o diâmetro e o número de ovócitos liberados por Kg de fêmea (fecundidade relativa). Um pool de larvas de cada grupo foi monitorado durante as primeiras 96 horas para determinação da biomassa (g), do comprimento total (mm), altura (mm) e volume do saco vitelino (mm^3). Observamos que as F1 e F2 de pacu possuem similaridade na evolução de seus ciclos reprodutivos pois em ambos os grupos as fêmeas estavam em vitelogenese em outubro e aptas para desova em dezembro. No entanto, as concentrações plasmáticas de 17αOH das F2 foram superiores às das F1 ($p \leq 0,05\%$) na época de desova. A taxa de ovulação das F2 foi superior às das F1. As taxas de fertilidade e eclosão foram semelhantes entre os grupos, porém, com exceção de uma única fêmea, todas as F1 desovaram ovócitos em grumos durante dois anos consecutivos, sendo a maioria dos ovócitos descartados. A frequência da distribuição do diâmetro dos ovócitos nas F1 foi maior em relação às F2, bem como o diâmetro médio dos ovócitos ($p \leq 0,05\%$). As larvas das F1 apresentaram o volume do saco vitelínico maior que as F2, mas sem influenciar no tamanho das larvas. Confrontando as características individuais das fêmeas com o sucesso ou não da ovulação, observamos que as fêmeas que responderam a indução hormonal apresentaram EA acima de 5,0 cm, mais de 40% de ovócitos com vesícula germinativa excêntrica (VGE) e ovócitos com diâmetro médio superior a 925 µm. Concluímos que as F1 utilizadas neste estudo não devem ser utilizadas como matrizes, pois apresentam taxas reduzidas de ovulação, e quando ovulam, seus ovócitos normalmente são engrumados. A indução hormonal das mesmas fêmeas deve ser evitada em anos consecutivos, pois interfere negativamente na taxa de ovulação e desempenho reprodutivo das mesmas.

Palavras chave: ciclo reprodutivo, características morfométricas, idades diferentes, seleção de matrizes.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of age on the reproductive cycle and hormonal inductions in consecutive years on reproductive performance of female pacu, Piaractus mesopotamicus. We used two groups of females, the F1 (10 years old) and F2 (4 years old) kept in the Aquaculture Center of UNESP (CAUNESP / Jaboticabal - SP). Were weighted to occur for vitellogenesis (October) spawning (December) and rest (March) in two reproductive cycles. In biometrics, the F1 and F2 (n = 5-10 females per collection) were randomly captured and anesthetized with benzocaine (1 g L-1 water) for classification and data collection. With the exception of March, cannulation occurred in all biometrics, and the samples were divided for observation of the presence of the germinal vesicle and determine the mean diameter of oocytes. Blood samples were collected by caudal puncture performed to determine the plasma concentration of gonadal steroids. In the comparative evaluation of reproductive performance in December 2010 and December 2011 females were induced with crude extract of carp pituitary (EBHC) (10% - 0.5 mg kg-1 pituitary fish, 90% - 5.5 mg pituitary kg-1 fish). Samples of egg masses were collected to determine the diameter and the number of oocytes released per kg female (relative fecundity). The larvae were monitored during the first 96 hours and the time of hatching collected every 12 hours for determination of biomass (g) Total length (mm) height (mm) of yolk sac volume (mm3). The thickness of the abdomen (EA) is presented as a reliable parameter for the selection of mature F1 and F2, and the rigidity of the abdomen and the characteristics of the papilla assist in the selection of matrices. The catheterization showed similarity with histological analyzes. The elevation of plasma 17β - estradiol occurred at different periods of the first reproductive cycle (2009/2010) between F1 and F2. The F2 in some periods (December 2010 and October 2011) had plasma concentrations of progesterone 17αOH higher ($p \leq 0.05\%$) than the F1. The plasma testosterone appeared high in F2 ($p \leq 0.05\%$) in March (2011) and December (2011) in relation to F1. In the second reproductive cycle groups showed similar dynamics, as vitellogenic activity (October) and an increase in spawning activity (December). Fertility rates and hatching were similar between groups. The F1 spawned oocytes lumps for two consecutive years, the majority of oocytes discarded. The frequency distribution of the diameter of the oocytes was higher than F1 to F2, and the diameter of oocytes ($\leq 0.05\%$). F1 larvae showed the yolk sac volume greater than the F2 did not influence the size of the larvae. Analyzing data from F1 and F2 these reproductive cycles showed very similar, especially in the second year. Females who responded to hormonal induction EA presented above 5.0 cm, more than 40% of oocytes with germinal vesicle eccentric (VGE) and oocytes with diameter greater than 925 micrometers. Jointly, the data point to avoid using F1 for spawns as well as prevent hormonal induction of F1 and F2 in consecutive years since affected the reproductive performance of the arrays.

Key - words: reproductive cycle, morphometric characteristics, different ages, broodstock selection.

1. Introdução

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG 1887, Teleostei, Characiforme, Characidae) é uma espécie onívora (Nomura, 1978) largamente distribuída na Bacia do Prata (Borghetti e Canzi, 1993; Pai *et al.*, 2000Agostinho *et al*., 2004). Esta espécie apresenta grande importância na pesca comercial nacional e da América Latina, devido à qualidade de sua carne, rusticidade e adaptação ao clima, além disso, sua produção é uma das mais exploradas na região sudeste, especialmente no estado de São Paulo (Jomori *et al*., 2003). Neste contexto, destacam-se por apresentar características como crescimento rápido e facilidade em aceitar ração (Castagnolli, 1992).

No Brasil, a boa aceitação desta espécie se reflete através de crescentes índices de produção. Em 2002 a produção total do pacu foi equivalente a 2,9% de toda produção aquícola nacional (5.045 toneladas) (IBAMA/DIFAP/CGREP, 2002), subindo para 3,3% no ano de 2004 (Ostrensky *et al*., 2008), sendo a segunda espécie nativa mais cultivada (IBAMA, 2008). No último boletim de pesca publicado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (2011), a produção nacional de pacu passou de 11.000 toneladas no ano de 2010.

Na natureza e no cativeiro a idade de primeira maturação gonadal é respectivamente aos quatro e três anos de idade (Ferraz de Lima *et al*., 1984; Romagosa *et al*., 1990). Sendo uma espécie reofílica, o pacu apresenta ciclo reprodutivo sazonal e realiza migrações reprodutivas em seu ambiente natural que culminam com a desova (Lima *et al.*, 1991), a qual ocorre nos meses de novembro a janeiro, e é do tipo total (Ferraz de Lima *et al.*,1984). A reprodução em cativeiro do pacu tem sido obtida com uso hormônios, tais como: HCG (gonadotrofina coriônica humana) (Godinho *et al.* 1977; Romagosa *et al.*,1990), extrato bruto de hipófise de salmão (Romagosa *et al.*, 1985), GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) (Dabrowski *et al.*,2003), extrato bruto de hipófise de carpa (Godinho e Godinho, 1986; Bock e Padovani, 2000) e extrato bruto de frango (Streit Jr. *et al.* 2005).

Com relação à reprodução induzida do pacu, de acordo com relatos de piscicultores[1], nos últimos dez anos as irregularidades dos resultados têm comprometido a produção da espécie. Uma constatação, bastante recorrente, é a incerteza sobre o momento de captura dos reprodutores para a realização da reprodução induzida (Criscuolo - Urbinati *et al.*, 2012). Paralelamente, os produtores de alevinos têm hábito de induzir as fêmeas de

[1]Conversas à campo.

pacu sempre nos mesmos meses do ano (dezembro, janeiro), desconsiderando o efeito das variações climáticas anuais sobre a época de reprodução dos peixes[2]. Os relatos[1] mais comuns são sobre fêmeas, consideradas aptas, que não respondem à indução hormonal, consequentemente não liberam ovócitos ou respondem ao tratamento mas liberam grumos de ovócitos que são inviáveis para fertilização.

Com relação aos problemas mencionados no parágrafo acima, estudos científicos (Brooks *et al.*,1997, Bobe e Labbé, 2010, Mylonas *et al.*, 2010; Heinfellner e*t al*., 2012; Criscuolo – Urbinati *et al*., 2012) indicam que estas deficiências reprodutivas podem estar relacionadas a erros na época de indução hormonal e falhas no manejo dos reprodutores, como a nutrição, densidade de estocagem, dentre outros. Neste contexto, deve ser ressaltado que na rotina de estações de produção de alevinos de pacu a mesma fêmea é freqüentemente utilizada repetidamente em anos consecutivos, sem se avaliar o efeito desta prática sobre as taxas de fertilidade, eclosão e sobrevivência larval.

Outra variável a ser considerada é a idade útil de matrizes e reprodutores de peixes. Informações deste tipo sobre teleósteos mantidos em cativeiro são praticamente inexistentes, especialmente nos teleósteos nativos reofílicos. No entanto em outros animais, a renovação periódica das matrizes é aplicada rotineiramente como uma das estratégias de manejo em suínos (55% de renovação) (Lovatto, 2002), bovinos de corte (10%) (Resende e Signiretti, 2005) e de leite (25%) (Ávila *et al.,* 2004). Assim, apesar da falta de dados científicos, empiricamente[1] sabe-se que nas pisciculturas nacionais a renovação do plantel não é planejada pelo fato da dificuldade em obter novas matrizes selvagens e/ou pela ausência de programas de renovação, monitoramento genético e produção de novas matrizes.

Fêmeas de teleósteos, répteis e anfíbios podem apresentar relação positiva entre a idade e os parâmetros de desempenho reprodutivo (Stearn, 1976). Estudos com teleósteos mostraram que a idade parental pode afetar a fecundidade (Abdoli *et al.*, 2005), o tamanho dos ovócitos (Estay *et al.*, 2004) e a qualidade do esperma (Schmidt – Baulain e Holtz, 1991). Pagni *et al.*, (2008) observaram que o sucesso reprodutivo e a qualidade dos ovos do catfish, *Chrysichthys nigrodigitatus,* foram influenciados pela idade parental, sendo que os peixes mais velhos produziram ovos e larvas maiores. Macchi *et al.*, (2004) descreveram que fêmeas mais velhas de teleósteos (≥ 5 anos) respondem por uma maior proporção dos

[2]Comunicação pessoal com Pesquisador Dr. Sérgio Ricardo Batlouni, responsável pelo Laboratório de Reprodução de Peixes Nativos do CAUNESP.

ovos produzidos, mas existem em menor quantidade na natureza. Há casos, onde fêmeas mais velhas produzem ovócitos maiores, resultando em larvas maiores do que larvas oriundas de indivíduos jovens (Hinckley, 1990; Wootton, 1994; Trippel, 1998). Sabe-se também que em fêmeas de teleósteos de diferentes idades podem apresentar período de desova com época e duração distintas (Pitt, 1966; Lambert, 1987; Hutchings e Myers, 1993; Trippel e Morgan, 1994; Wieland *et al.*, 2000). Segundo Munro, *et al.*, (1990) em teleósteos, indivíduos mais experientes (com mais de três desovas) costumam desovar no início da estação de desova, enquanto que indivíduos de primeira desova costumam fazê-la ao final da estação.

Assim, visando aperfeiçoar o manejo reprodutivo desta importante espécie nativa, o objetivo deste estudo foi descrever e comparar respectivamente o ciclo e o desempenho reprodutivo de fêmeas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, de diferentes idades. Além disso, avaliamos o efeito de induções hormonais em anos consecutivos no desempenho reprodutivo desta espécie.

2. Material e métodos

2.1. Ciclo Reprodutivo de fêmeas de pacu

Foram utilizados dois grupos de matrizes microchipadas, as F1 (dez anos de idade, pesando em média 3,90 kg ± 0,30 EP (erro padrão)) e as F2 (quatro anos de idade, pesando em média 2,70 kg ± 0,20 EP). Neste estudo foram utilizados três viveiros de 200m², com entrada e saída de água. Cada viveiro recebeu aleatoriamente 20 F1, 20 F2, 10 (M1 – 10 anos de idade) e 10 (M2 – 4 anos de idade). Os peixes foram arraçoados sete dias na semana, em duas porções, às 9:00 e 16:00 horas, com ração comercial extrusada (para peixes onívoros com 32,0% de proteína bruta, 7,0% extrato etéreo, 5,0% matéria fibrosa, 7,0% cinzas, 1,2% cálcio, 0,6% fósforo, totalizando 2,0% e biomassa do plantel ao dia.

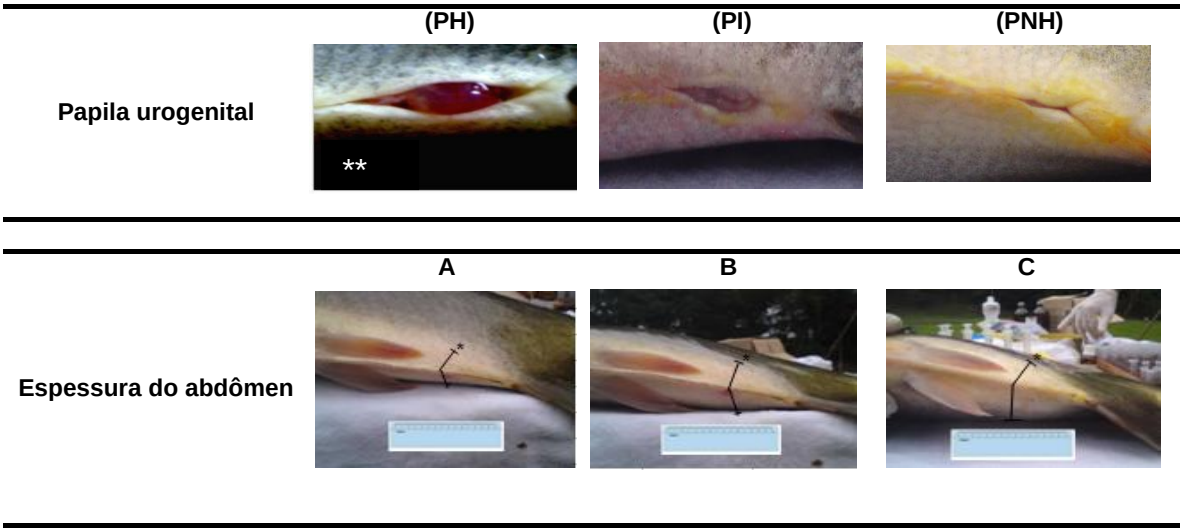
2.1.1. Amostragens

2.1.1.1. Biometrias

Foram realizadas sete biometrias, nos respectivos dias: 18 de dezembro de 2009 (dez / 2009), 10 de março de 2010 (mar / 2010), 25 outubro de 2010 (out / 2010), 15 de dezembro de 2010 (dez / 2010), 14 de março de 2011 (mar / 2010), 25 outubro de 2011 (out / 2011) e 14 de dezembro de 2011 (dez / 2011). Os períodos foram assim escolhidos por representarem o período de vitelogênese (outubro), de desova (dezembro) e de repouso (março) (Lima *et al*., 1991) em dois ciclos reprodutivos consecutivos.

Nas sete biometrias, F1 e F2 (n= 5 a 10 fêmeas por coleta) foram capturadas aleatoriamente e anestesiadas com benzocaína (1g L^{-1} de água) para classificação e coleta de dados biométricos. A rede foi passada duas vezes em cada viveiro para evitar o estresse nos peixes, por isso a variação do número de peixes (n) nas coletas. Nas biometrias foram mensurados a biomassa total (BT), comprimento total (ponta do focinho ao final da cauda) (CT), comprimento de espessura abdominal (EA) (aferido na altura da nadadeira pélvica, com auxílio de régua 15 cm) em três diferentes períodos (março (A), outubro (B) e dezembro (C)) (Figura 1). A rigidez do abdômen das fêmeas recebeu classificação da seguinte maneira: duro (GRAU I), intermediário (GRAU II) ou macio (GRAU III). A papila urogenital recebeu classificação para este estudo, sendo: não hemorrágica (PNH), intermediária (PI) ou hemorrágica (PH). A classificação desses parâmetros foi feita sempre pelo mesmo avaliador[4]. Para isolarmos possíveis interferências do CT sobre a EA, determinamos também a relação: EA / CT. O fator de condição (K) foi obtido por meio do cálculo: $K = BT / CT^b$

[4] A avaliação das classificações morfométricas foram realizadas por MSc. Marianne Schorer



* imagem ilustrativa da mensuração da EA

** imagem gentilmente fornecida pelo Dr. Rafael Y. Kuradomy em experimentação com pacus.

Figura 1 – Mensuração das características morfométricas (papila urogenital, rigidez e espessura do abdômen de F1 e F2 de pacu.

2.1.1.2. Canulação

Exceto nos meses de março, as fêmeas foram canuladas e amostras de aproximadamente 0,5 mL de ovócitos foram coletadas por meio da inserção de uma sonda uretral n^{o}6 acoplada à uma seringa de 3 mL. A amostra coletada foi subdividida em duas partes. A primeira sub-amostra foi utilizada para a observação da presença e posição do núcleo. Para isso, os ovócitos foram introduzidos na solução de Serra (60 mL de álcool 90%; 30 mL de formalina; 10 mL de ácido acético glacial (Lemanova e Sakum, 1975; Revisado por Pereira *et al.,* 2007), durante 1 minuto e visualizados em lupa para a verificação da posição da vesícula germinativa (núcleo). Os ovócitos foram classificados em: vesícula germinativa central (VGC), vesícula germinativa excêntrica (VGE) e vesícula germinativa ausente (VGA). A segunda sub-amostra, foi fixada em solução de Gilson (Simpson, 1951) foi utilizada para determinação do diâmetro médio dos ovócitos (cerca de 200 ovócitos por fêmea), e com auxílio de um estereomicroscópio LEICA MZ 8, acoplado ao equipamento LEICA DFC 280, utilizando o programa IM 50 – LEICA, as medições foram realizadas e fotografadas.

2.1.1.3. Determinação do estádio de desenvolvimento gonadal pela concentração plasmática de esteroides gonadais

Amostras de sangue foram coletadas por punção caudal com uso de seringas de 5,0 mL e agulhas descartáveis previamente heparinizadas (n= 5 a 10 fêmeas por coleta). As fêmeas foram anestesiadas com benzocaína (1 gL^{-1} de água) diluída previamente em etanol 90%. As fêmeas permaneceram nesta solução até a total sedação. Três mL de sangue foram coletados e transferidos para tubos *Falcon* e posteriormente centrifugados por 10 minutos a 655,2 x g. Em seguida o plasma foi separado em quatro alíquotas que foram acondicionadas em criotubos e imediatamente preservadas em nitrogênio liquido. As amostras foram armazenadas em freezer à - 86^{o}C até a data do processamento. Os esteróides gonadais foram quantificados no plasma dos animais por elisaimunoensaio (ELISA), utilizando-se "kits" comerciais da Interteck para testosterona (T), estradiol (E_2) e 17α – hidroxiprogesterona (17α – OHP e da Cayman para 11- cetotestosterona (11KT) conforme recomendação do fabricante. Cinco amostras de quatro indivíduos (duas F1 e duas F2) de cada esteróides foram validados através de testes intraensaios.

2.1.2. Amostragens complementares

2.1.2.1. Avaliação histomorfométrica dos ovários durante a época de desova (dezembro de 2009)

Para esta etapa quatro F1 e quatro F2 (não utilizadas nas análises descritas anteriormente) foram coletadas e eutanasiadas em dezembro de 2009 (somente neste período) para posterior análise histológica. Os ovários (regiões cranial, media e caudal) foram coletados e fixados em solução de *Bouin* (24 horas) e processados por meio de técnicas histológicas para avaliação das freqüências percentuais de cada tipo de ovócito nas distintas fases de desenvolvimento (pré-vitelogênico, vitelogênico incompleto, vitelogênico completo e atrésico). Após a fixação o material foi incluído em paraplast (Merck), cortado em secções transversais de 3-5 μm e submetido à coloração com hematoxilina e eosina. Cortes histológicos dos ovários de F1 e F2 foram utilizados para a contagem dos ovócitos presentes em 12 campos (quatro campos por região, em objetiva de 5x).

2.1.2.2. Índices gonadossomáticos e hepatossomáticos

Nos meses de dezembro de 2009 e 2011 (época de desova), quatro e cinco F1 (respectivamente, em 2009 e 2011) e quatro F2 (em cada ano) foram aleatoriamente separadas. Em 2009 foram utilizadas as mesmas fêmeas descritas no item anterior (2.1.2.1) e em 2011 foram utilizadas quatro fêmeas que não haviam sido utilizadas em outras análises. As fêmeas foram eutanasiadas com anestésico benzocaína (etil – aminobenzoato) (10 g L^{-1}), e tiveram seus respectivos ovários e fígado coletados e pesados (em gramas) em balança analítica de precisão (0,00001 g). Os índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) foram determinados da seguinte maneira:

$$IGS = \frac{\text{massa total gônada}}{\text{massa total}} \times 100 \quad \text{e} \quad IHS = \frac{\text{massa total fígado}}{\text{massa total}} \times 100$$

2.2. Avaliação comparada do desempenho reprodutivo das F1 e F2

2.2.1. Desova induzida

Em dezembro de 2010 e de 2011 a indução à desova foi efetuada com uso de extrato bruto de hipófise (EBH) de carpa aplicado em duas doses com intervalo de 12 horas (10% - 0,5 mg hipófise kg^{-1} de peixe; 90% - 5,5 mg de hipófise kg^{-1} de peixe) (Castagnolli, 1992). Nos machos foi aplicada uma única dose (no momento da segunda dose das fêmeas), equivalente a 1,6 mg kg^{-1} de hipófise.

2.2.2. Desempenho reprodutivo

Após a indução hormonal, foi registrada a ovulação bem sucedida ou não de cada fêmea, e o tempo após a indução (em horas-grau) em que a ovulação de cada fêmea ocorreu. No momento da liberação dos ovócitos a massa de ovócitos liberada por cada fêmea foi registrada com auxílio de uma balança analítica. E dessa amostra extrusada, um grama de ovócitos de cada fêmea foi fixado em solução de glutaraldeído e preservado em solução PBS (solução fosfato salina pH 7.4). Estas amostras foram utilizadas para

determinar o diâmetro de ovócitos e o número de ovócitos liberados por grama de ovo de cada fêmea, e extrapoladas para a biomassa total da gônada. Posteriormente, considerando - se a massa total de ovócitos liberada, foi determinado o número de ovócitos liberados por Kg de fêmea (fecundidade relativa).

Logo após a fertilização, um "pool" de ovos fertilizados foi preparado e distribuído em 8 incubadoras (2 tratamentos e 4 réplicas). Dez gramas de ovos hidratados foram colocados em cada incubadora (3 L). As incubadoras foram abastecidas com fluxo constante de água entre 8 - 12 L min^{-1}. As taxas de fertilidade e eclosão foram determinadas avaliando-se quatro amostras com 1 mL de ovos cada. Para isto foi considerado o número de ovócitos em desenvolvimento e ovócitos gorados (brancos, sem desenvolvimento embrionário) (Godinho, 2007), respectivamente 5 e 14 horas após a fecundação (fertilidade e eclosão).

2.2.3. Larvicultura

Foram monitoradas as primeiras 96 horas de um *pool* de larvas de cada grupo em intervalos de 12 horas. Foram determinados o comprimento total (mm), altura (mm) e volume do saco vitelino (mm^3), segundo Blaxter e Hempel (1963). As determinações de comprimento, altura e volume do saco vitelino foram realizadas em estereomicroscópio acoplado de ocular micrométrica.

2.3. Análises individuais das fêmeas de pacu

As F1 e F2 utilizadas para indução hormonal tiveram também seus dados biométricos registrados e foram canuladas assim como descrito para as fêmeas analisadas durante o ciclo reprodutivo. Assim, as características destas fêmeas foram determinadas imediatamente antes da desova e os dados foram analisados junto com o sucesso ou não da desova e desempenho reprodutivo.

2.4. Parâmetros físicos e químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos da água mensurados semanalmente foram apresentados por meio das médias mensais (quatro análises em cada mês) seguidas do respectivo erro padrão (EP). Um oxímetro HI 9146 – 10 (Hanna instruments – 0,01 mg/ L O_2) foi utilizado para mensuração do oxigênio dissolvido; um medidor de pH HI 98172 (Hanna Instruments – 0,1 pH/ 0,01 pH) foi utilizado para mensuração do pH; termômetros de máximo e mínima foram utilizados para mensuração da temperatura da água (0^o a 50^o C) e um condutivímetro HI 98311 (Hanna Instruments – 1 µS/ cm) foi utilizado para mensuração da condutividade elétrica da água. A amônia total foi aferida com o *kit* "Card kit amônia" (indotest), a alcalinidade total com o *Kit* "alcalinidade total" (Unikit) e a dureza total com o *kit* "dureza total" (Unikit), foram aferidas quinzenalmente (duas análises mensais).

Os parâmetros de qualidade da água das incubadoras (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica) foram mensuradas diariamente em 2010 e 2011 (dezembro) nas primeiras 96 horas de vida das larvas a partir da eclosão.

2.5. Análises estatísticas

Os valores foram apresentados por meio de suas médias seguidas do respectivo erro padrão. Os valores médios obtidos do desempenho reprodutivo nos peixes com diferentes idades foram comparados através de análise de variância (*one-way* ANOVA), sendo estimadas as médias e erros padrões. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$ %, pelo teste de Tukey. Testes de normalidade, homocedasticidade das variâncias foram realizados, assim como transformações, quando necessárias. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc. Version 9.0) para as seguintes variáveis: biomassa total, comprimento total, fator de condição, espessura de abdômen, relação da espessura de abdômen e comprimento total, distribuição dos ovócitos de acordo com a posição do núcleo, concentração de esteróides plasmáticos, índices corpóreos (IGS e IHS), histomorfometria, taxa de fecundidade relativa,

biomassa das larvas, comprimento total das larvas, altura das larvas e volume de vitelo das larvas. A análise estatística não foi aplicada para os parâmetros físicos e químicos da água, características da papila urogenital, rigidez do abdômen e distribuição das freqüências de ovócitos, taxas de fertilização e eclosão, por serem dados descritivos.

3. Resultados

3.1. Ciclo reprodutivo de fêmeas de pacu

3.1.1. Amostragens

3.1.1.1. Biometrias

Neste estudo, nas duas primeiras estações reprodutivas (dezembro 2009 e 2010) a BT (3.900 ± 396 g) e CT (53,60 ± 1,48 cm) média das F1 foi superior aos das F2 (2.722 ± 204,6 g e 48,3 ± 1,0 cm, respectivamente) ($p \leq 0,05\%$). Em outubro de 2010 o CT foi superior nas F1 ($p \leq 0,05\%$). Durante o período experimental os valores médios de K observados em F1 e F2 foram 2,5 ± 0,14 e 2,3 ± 0,10, respectivamente.

Os valores médios de EA bem como da relação EA/ CT foram semelhantes entre F1 e F2 durante o período vitelogênico e de desova (outubro e dezembro), diferenças só foram encontradas durante o período de repouso (março) com valores superiores de EA para as F1 ($p \leq 0,05\%$) (Tabela 1). Com relação à variação da EA e da relação EA/ CT dentro do mesmo lote ao longo do período, em 2010 e 2011 os valores foram superiores nos meses de outubro e dezembro em relação a março, exceto pela EA/ CT das F2 em 2011 ($p \leq 0,05\%$).

Tabela 1 - Valores médios com erro padrão, do comprimento da espessura de abdômen (EA – cm) e do comprimento da espessura de abdômen pelo comprimento total (EA/ CT) de F1 e F2 de pacu de dezembro de 2009 a dezembro de 2011[5].

	dez (2009)	mar (2010)	out (2010)	dez (2010)	mar (2011)	out (2011)	dez (2011)
FV / EA	4,86 ± 0,58 B a	3,70 ± 0,25 B a	6,40 ± 0,38 A a	6,30 ± 0,32 A a	4,00 ± 0,28 B a	6,30 ± 0,27 A a	5,40 ± 0,28 A a
FJ / EA	4,52 ± 0,43 AB a	3,13 ± 0,31 B b	5,40 ± 0,31 A a	5,70 ± 0,30 A a	3,90 ± 0,31 B a	5,30 ± 0,25 A a	5,20 ± 0,80 A a
FV (EA / CT)	0,08 ± 0,006 B a	0,06 ± 0,002 B a	0,11 ± 0,004 A a	0,10 ± 0,005 A a	0,07 ± 0,005 B a	0,10 ± 0,01 A a	0,10 ± 0,005 A a
FJ (EA/ CT)	0,08 ± 0,005 A a	0,06 ± 0,003 B a	0,10 ± 0,004 A a	0,11 ± 0,004 A a	0,08 ± 0,004 A a	0,09 ± 0,01 A a	0,09 ± 0,01 A a

Os dados de 2009 (Tabela 2) foram similares entre os grupos, no entanto nas estações reprodutivas subseqüentes observamos distintos perfis para F1 e F2. Em outubro de 2010 mais de 80% das F1 e F2 foram classificadas como GRAU I. No entanto, em dezembro do mesmo ano, enquanto que 50 % das F1 foram classificadas como GRAU I, 83,3% das F2 foram classificadas como GRAU III, portanto as últimas estavam predominantemente maduras de acordo com este critério e período do ano. Desta forma os dados de 2010 indicaram um final precoce da época de maturação nas F1 em relação às F2. Os dados de 2011 não apresentam paralelismo com os de 2010. Em outubro de 2011, 100% das F2 e apenas 50% das F1 foram classificadas como GRAU I, sugerindo um início de maturação em intensidade maior nas F1. Em dezembro/ 2011, 50% e apenas 14,2% das F1 e F2 foram respectivamente classificadas como GRAU III (Tabela 2). Ainda em relação a dezembro de 2011, 57,1 e 16,7% das F1 e F2 foram classificadas como GRAU I.

Em outubro de 2010 e 2011 observamos F1 com PH, no entanto, nos mesmos períodos não encontramos F2 com PH, apenas com PI e PNH (Tabela 2). Nos meses de dezembro (2010 e 2011) para ambos os grupos observamos um aumento na soma das freqüências de PI e PH em relação ao mês de outubro dos mesmos anos (Tabela 2). Observamos também que as características da papila oscilam entre os grupos nos anos consecutivos analisados. Se por exemplo, analisarmos apenas a freqüência de PH nos meses de desova (dezembro de 2009, 2010 e 2011) os valores oscilaram da seguinte forma: 30 e 10%; 16,7 e 66,6%; 83,3 e 14,2% para F1 e F2 respectivamente (Tabela 2).

[5] n equivale ao número de peixes. (dezembro 2009 = n F1(10) e n F2(10); outubro 2010 = n F1(6) e n F2 (6); dezembro 2010 = n (6) para F1 e F2 (5); outubro de 2011 = n F1(6) e n F2(6), dezembro de 2011 = n F1(6), n F2= (7)). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$) no mesmo grupo ao longo do período; e médias seguidas de letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$) no mesmo período entre os grupos.

Tabela 2 – Rigidez do abdominal e características da papila urogenital de F1 e F2 de pacu, de dezembro de 2009 a dezembro de 2011[6].

	Lotes	GRAU I	GRAU II	GRAU III	PH	PI	PNH
1ª. Coleta	F1	70%	30%	0	30%	70%	0%
	F2	80%	20%	0	10%	60%	30%
2ª. Coleta	F1	100%	0	0	0	0	100%
	F2	100%	0	0	0	0	100%
3ª. Coleta	F1	83,3%	0	16,7%	16,7%	16,7%	66,6%
	F2	83,3%	16,7%	0	0	16,7%	83,3%
4ª. Coleta	F1	50,0%	16,7%	33,3%	16,7%	50,0%	33,3%
	F2	0	17%	83,3%	66,6%	0	33,4%
5ª. Coleta	F1	100%	0	0	0	0	100%
	F2	100%	0	0	0	0	100%
6ª. Coleta	F1	50,0%	16,7%	33,3%	33,3%	50,0%	16,7%
	F2	100%	0	0	0	33,4%	66,6%
7ª. Coleta	F1	16,7%	33,3%	50,0%	83,3%	16,7%	0
	F2	57,1%	28,5%	14,2%	14,2%	57,1%	28,5%

3.1.1.2. Canulação

A) Distribuição dos ovócitos de acordo com a posição do núcleo

Com exceção do ano de 2009, as freqüências dos tipos de ovócitos obtidos por canulação foi similar entre F1 e F2 nas mesmas coletas (Figura 2). No mês de dezembro de 2009 observamos freqüências superiores de ovócitos com VGE (19,80 ± 4,47% EP e 41,10 ± 9,02% EP) ($p \leq 0,05\%$) e inferiores de ovócitos com VGA (21,56 ± 9,80% EP e 3,98 ± 0,22% EP) em F1 e F2, respectivamente (Figura 2A). Nos anos de 2010 e 2011 observamos padrão similar para a transição da freqüência percentual dos tipos de ovócitos entre outubro (período de maturação) e dezembro (período de desova) (Figura 2B-E), com redução (~30%) e aumento (~30%) da frequência dos ovócitos com VGC e VGE, respectivamente, em ambos os grupos.

[6] n equivale ao número de peixes (dezembro 2009 = n F1(10) e n F2(10); outubro 2010 = n F1(6) e n F2(6); dezembro 2010 = n (6) e n F1 e F2 (5); outubro de 2011 = n F1(6) e n F2(6), dezembro de 2011 = n F1(6), n F2= (7).

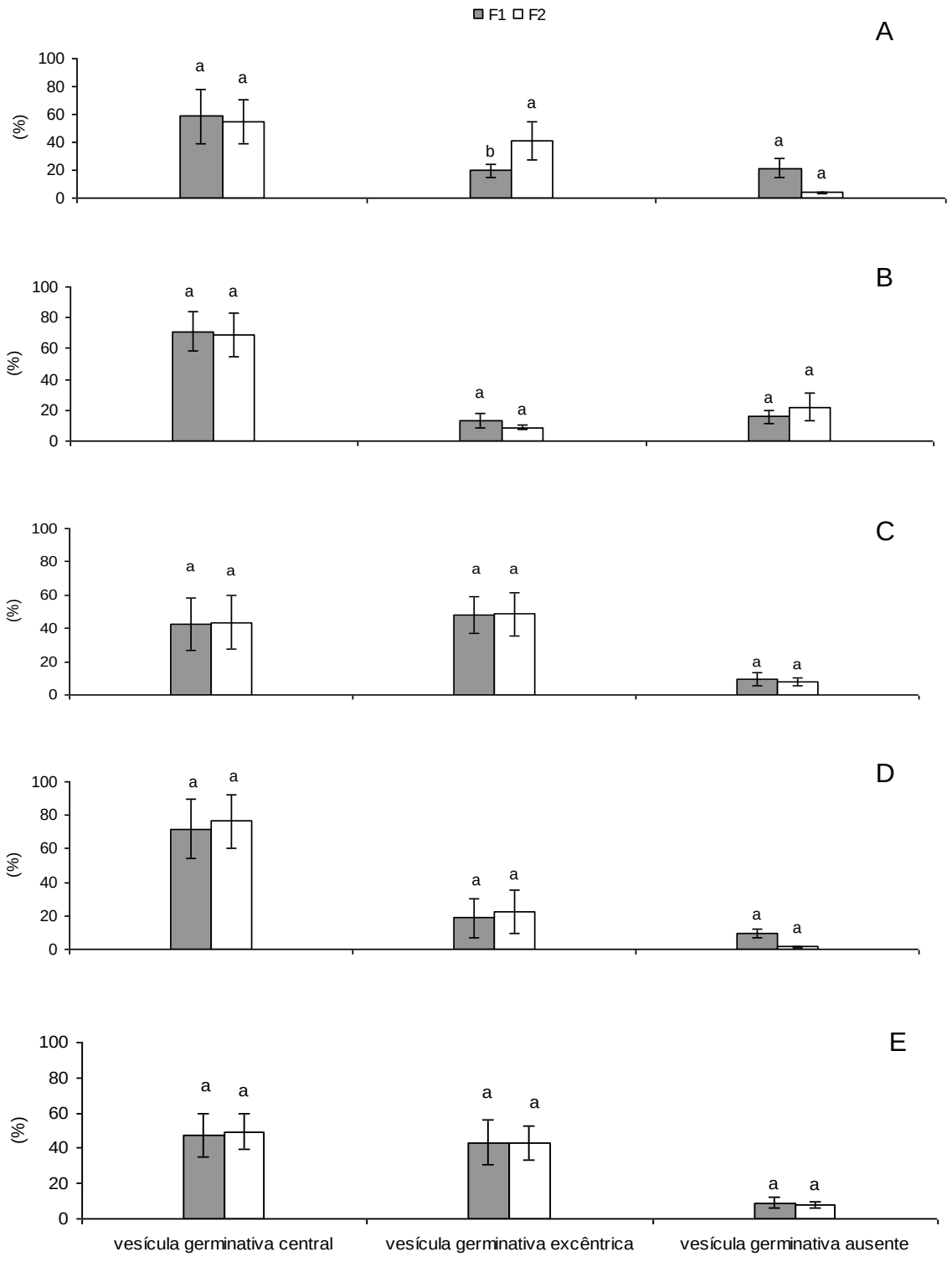


Figura 2 – Distribuição percentual dos ovócitos de acordo com a posição do núcleo em diferentes períodos entre F1 e F2 de pacu em dezembro 2009 (A), outubro 2010 (B), dezembro 2010 (C), outubro 2011 (D) e dezembro 2011 (E)[7].

[7]Médias seguidas de letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no mesmo período entre os grupos. n equivale ao número de peixes. (dezembro 2009 = n F1(10) e n F2(10); outubro 2010 = n F1(6) e n F2(6); dezembro 2010 = n F1(6) e n F2(5); outubro de 2011 = n F1(6) e n F2(6), dezembro de 2011 = n F1(6), n F2= (7)).

B) Distribuição das frequências percentuais dos ovócitos de acordo com o diâmetro

O perfil da distribuição do diâmetro dos ovócitos entre as coletas foi similar nos dois grupos analisados, porém quando transformadas em média observamos que as F1 nos períodos de dezembro (2009, 2010 e 2011) apresentaram diâmetro médio maior ($p \leq 0,05\%$) que as F2 (Tabela 3).

Tabela 3 – Diâmetro médio (µm) da distribuição dos ovócitos de F1 e F2 de pacu coletados por canulação em dezembro 2009, 2010 e 2011[8].

	Diâmetro médio dos ovócitos		
	2009	2010	2011
F1	994 ± 124 µm [a]	987 ± 142 µm [a]	993 ± 128 µm [a]
F2	925 ± 130 µm [b]	948 ± 116 µm [b]	928 ± 128 µm [b]

Nos meses de outubro (2010 e 2011) observou-se uma distribuição unimodal (~900 µm) em F1 e F2, que passou para polimodal nos meses de dezembro (2010 e 2011) (Figura 3). Este padrão de distribuição polimodal também havia sido observado no mês de dezembro de 2009. Nos meses de dezembro (época de desova) observamos um deslocamento do perfil da distribuição do diâmetro para a direita nas F1 e F2 (indicando aumento do diâmetro dos ovócitos), o qual foi mais acentuado nas primeiras (Figura 3). Em 2010 e 2011, no mês de outubro, a moda de maior freqüência foi de ~ 970 µm (F1 e F2) Em dezembro observamos distintas modas entre 900 e 1200 µm em ambos os grupos (Figura 3). Os ovócitos das fêmeas de pacu apresentaram taxas de fertilização, apresentaram uma distribuição de freqüência porcentual dos diâmetros em dezembro (2009, 2010 e 2011) com modas iguais ou superiores a 950µm.

[8]n equivale ao número de peixes. (dezembro 2009 = n F1(10) e n F2(10); outubro 2010 = n F1(6) e n F2(6); dezembro 2010 = n (6) e n F1 e F2 (5); outubro de 2011 = n F1(6) e n F2(6), dezembro de 2011 = n F1(6), n F2= (7)). [7]Médias seguidas de letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no mesmo período entre os grupos.

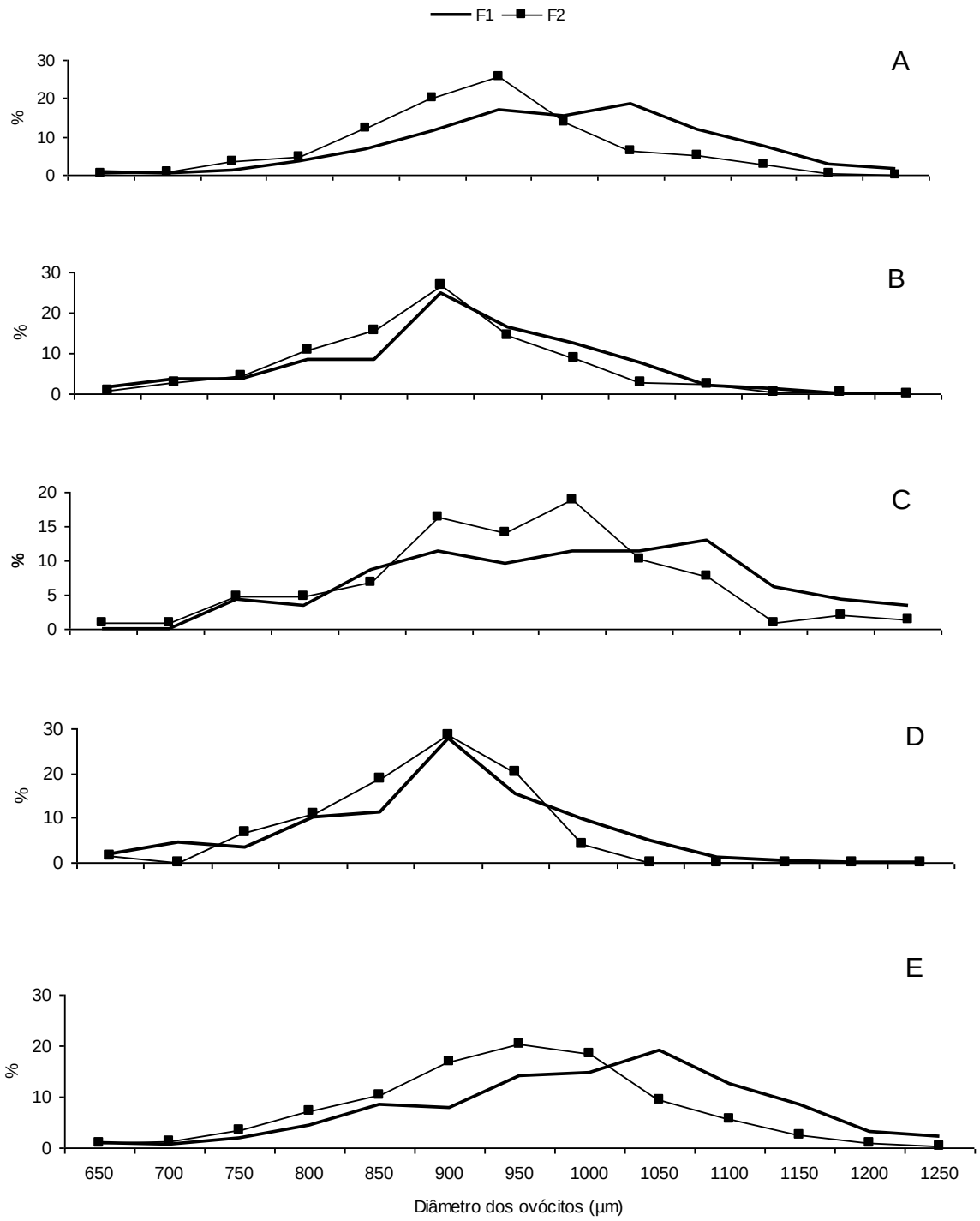


Figura 3 – Frequência percentual (%) da distribuição dos ovócitos de F1 e F2 de pacu coletados por canulação em dezembro 2009 (A), outubro 2010 (B), dezembro 2010 (C), outubro 2011 (D) e dezembro 2011 (E)[9].

[9]n equivale ao número de peixes. (dezembro 2009 = n F1(10) e n F2(10); outubro 2010 = n F1(6) e n F2(6); dezembro 2010 = n (6) e n F1 e F2 (5); outubro de 2011 = n F1(6) e n F2(6), dezembro de 2011 = n F1(6), n F2= (7)).

3.1.1.3. Determinação do estádio de desenvolvimento gonadal pela concentração plasmática de esteróides gonadais

Os "kits" ELISA foram validados para o plasma de *Piaractus mesopotamicus*. Os coeficientes de variação intraensaios apresentaram valores com amplitudes de 1,89 – 24,60% para E_2, 0,67 – 25,70% para 17α – OHP, 4,75 – 29,80% para T e 2,89 – 22,80% para 11 KT.

A) Estradiol (E_2)

As F1 apresentaram aumento das concentrações plasmáticas médias deste hormônio em outubro (2010 e 2011), sendo que esse aumento só foi observado em dezembro (2009 e 2010) nas F2. Em outubro (2011) os grupos apresentaram concentrações plasmáticas do E_2 semelhantes (Figura 4A). As concentrações mais baixas foram observadas em março (2010 e 2011) para ambos os grupos. Analisando cada lote individualmente, observamos diferenças nos perfis de F1 e F2. No primeiro ano as F1 apresentaram diferenças em seu ciclo ($p \leq 0,05\%$) quando comparadas com as F2, que se igualam no ciclo de 2010/ 2011 (Figura 4A).

B) 17α OH – progesterona (17α OHP)

Nas mesmas coletas observamos que as F1 apresentaram concentrações plasmáticas inferiores da 17α OHP em dezembro de 2010 e outubro de 2011 ($p \leq 0,05\%$), duando comparadas as F2. Analisando o ciclo individual entre os grupos, as concentrações plasmáticas deste esteróide se assemelharam ao longo do período experimental (Figura 4B).

C) Testosterona (T)

Com relação à comparação entre os grupos nas mesmas coletas, a concentração plasmática foi similar ao longo do experimento, exceto pelos valores de março e dezembro de 2011 que foram superiores ($p \leq 0,05\%$) nas F2 em relação às F1. Analisando - se o perfil da concentração de T em cada grupo, em separado, observamos que as F1 apresentaram valores similares ao longo do período experimental (Figura 4C). Nas F2 os valores foram também similares ao longo do período, exceto pelos valores inferiores em outubro de 2010 ($p \leq 0,05\%$) (Figura 4C).

D) 11 – Cetotestosterona (11 KT)

Os níveis de 11 KT foram similares ao longo do período experimental dentro de cada lote e entre os grupos nas distintas coletas (Figura 4D).

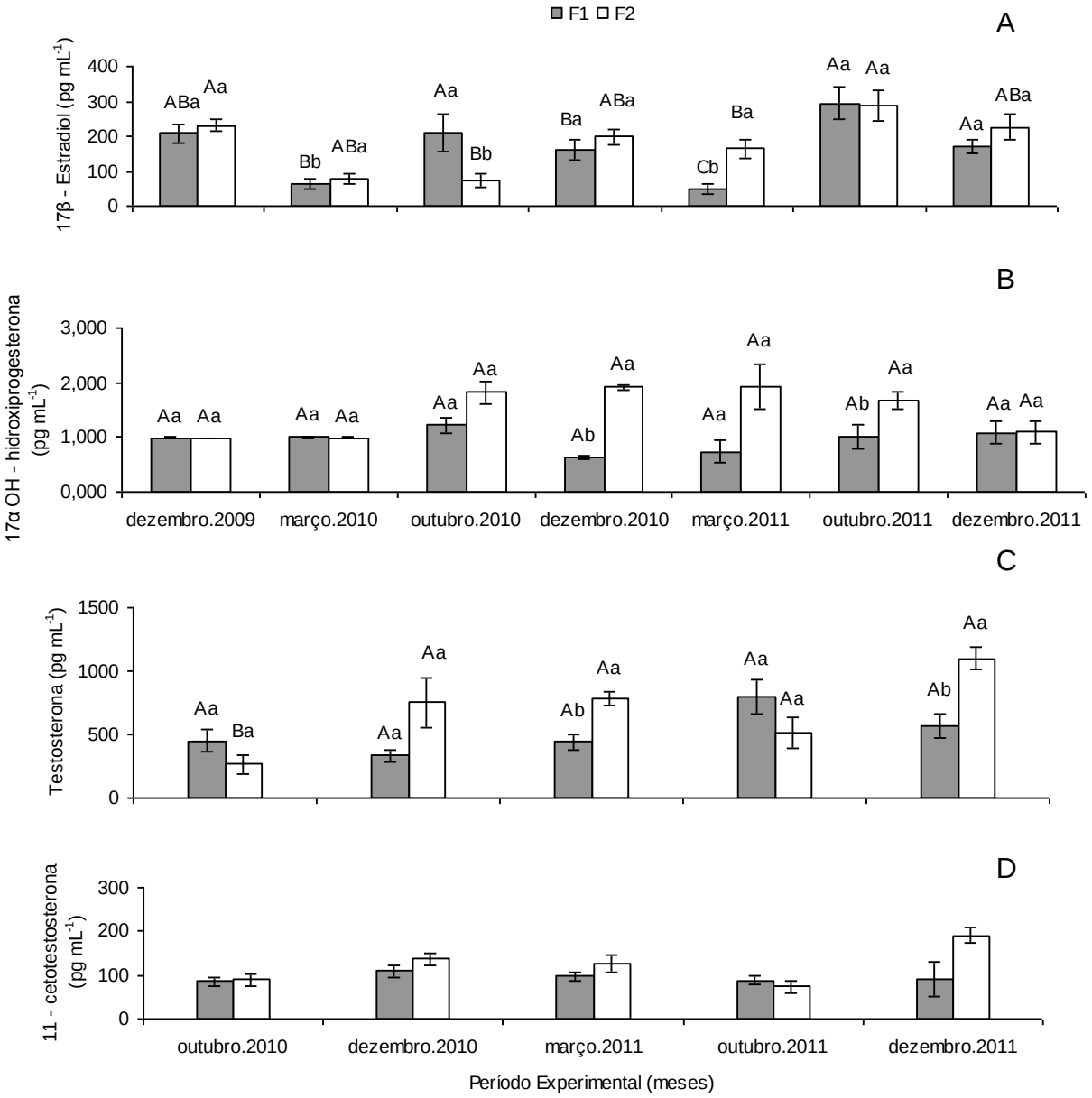


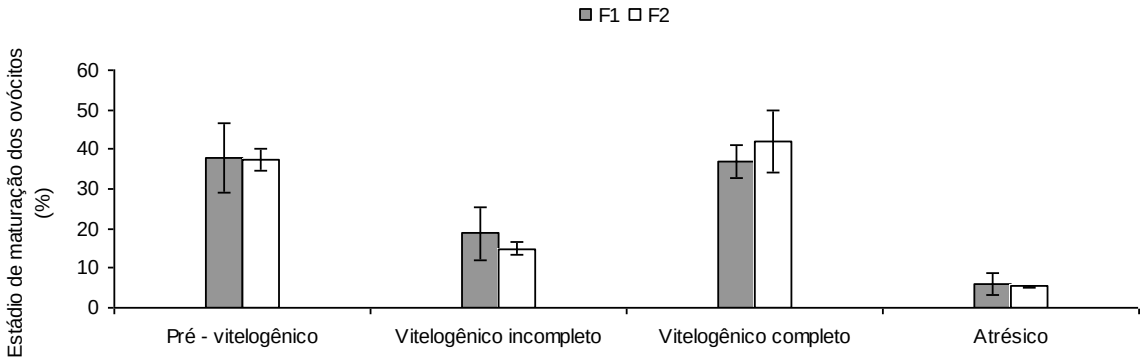
Figura 4 - Valores médios de 17β- estradiol (A), 17α OH-progesterona (B), testosterona (C) e 11 – cetotestosterona (D), com erro padrão, em fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu em dezembro de 2009 a dezembro de 2011[10].

[10](dezembro 2009 = n F1 (10) e n F2 (10); outubro 2010 = n F1 (6) e n F2 (6); dezembro 2010 = n (6) e n F1 F2 (5); outubro de 2011 = n F1 (6) e n F2 (6), dezembro de 2011 = n F1 (6), n F2 = (7)). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$) no mesmo grupo ao longo do período; e médias seguidas de letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$) no mesmo período entre os grupos.

3.1.2. Amostragens complementares

3.1.2.1. Avaliação histomorfométrica dos ovários durante a época de desova (dezembro de 2009)

Não foram observadas diferenças em relação às freqüências percentuais médias dos diferentes tipos de ovócitos entre F1 e F2 ($p \geq 0,05\%$). Nas F1 e F2, respectivamente, 37,12 ± 4,17% e 42,09 ± 7,50% EP dos ovócitos eram vitelogênicos completos; 38,03 ± 2,89% EP e 37,42 ± 8,74% EP eram pré-vitelogênicos; 18,79 ± 6,77% EP e 14,90 ± 1,67% EP eram vitelogênicos incompletos e 6,03 ± 2,64% EP e 5,50 ± 0,20% EP eram atrésicos (Figura 5).



.

Figura 5 - Valores médios das freqüências percentuais das diferentes fases dos ovócitos determinados histológicamente, com erro padrão, para F1 e F2 de pacu em dezembro de 2009[11].

3.1.2.2. Índices gonadossomáticos e hepatossomáticos

Em dezembro de 2009 o valor médio do IGS para as F1 (18,9 ± 1,62% EP) foi significativo ao observado nas F2 (8,5 ± 1,43% EP) ($p \leq 0,05$), porém em 2011 os valores se tornaram similares (F1 e F2, 12,8 ± 3,9% EP e 14,07 ± 6,1% EP, respectivamente).

Em relação ao IHS médio, o valor encontrado para as F2 (1,2 ± 0,08% EP) foi superior ($p \leq 0,05$) ao das F1 (0,75 ± 0,11% EP) em dezembro de 2009, mas foram similares em 2011 (0,61 ± 0,02% EP e 0,51 ± 0,05% EP, respectivamente).

[11](n F1 (4) e n F2 (4)).

3.2. Avaliação comparada do desempenho reprodutivo das F1 e F2

3.2.1. Desova induzida

Em 2010 as fêmeas desovaram em torno de 260 horas-grau (temperatura da água: 26,0^{o} C) após a segunda dose hormonal. As F1 e F2 começaram a desovar simultaneamente. Neste ano, três F1 (de seis F1 induzidas) desovaram. Apenas uma apresentou ovócitos viáveis sendo que as desovas das outras fêmeas foram descartadas por estarem em grumos (ovos aderidos uns aos outros, sem viabilidade e em pouca quantidade) (Figura 6 A). Após algumas horas, todos os ovócitos fertilizados da F1 goraram e foram descartados. No ano de 2010, duas das seis F2 injetadas desovaram ovócitos viáveis (Tabela 4).

Três F1 desovaram em 2011, porém, apenas uma desovou ovócitos viáveis. A única F1 que desovou ovócitos viáveis em 2010 não desovou em 2011 (Tabela 4). As três F1 que desovaram em 2011 não haviam desovado em 2010. Destas três, dois apresentaram ovócitos engrumados, que foram descartados. Nenhuma F1 desovou por dois anos consecutivos (tabela 4). Com relação às F2, em 2011 apenas duas (de um total de seis) desovaram. Somente uma F2 desovou em dois anos consecutivos, porém, no segundo ano seus ovócitos goraram nas incubadoras. As F2 que não desovaram em 2010, desovaram em 2011.

Nestes dois anos consecutivos de desova com as mesmas fêmeas, todos os machos responderam positivamente ao tratamento de indução hormonal, liberando quantidades abundantes de sêmen (3-7 mL).

Tabela 4 – Dados de resposta a indução hormonal de fêmeas de pacus observados durante dois anos[12].

	ano 2010			ano 2011	
	horas - graus	desovou	não desovou	horas - graus	desovou	não desovou
	~260			~290		
FV1			x		x*	
FV2			x		x	
FV3			x		x*	
FV4		x				x
FV5		x*				x
FV6		x*				x
FJ1		x				x
FJ2		x			x	
FJ3		x				x
FJ4			x		x	
FJ 5			x			x
FJ 6			x			x

Figura 6 – Ovócitos de F1 em grumos (ovos aderidos uns aos outros, sem viabilidade) (A) e F2 viáveis para fertilização (B).

3.2.2. Desempenho reprodutivo

As taxas de fecundidade relativa das F1 e F2 e em 2010 (103.561,28 ± 29.393 e 113.829,88 ± 55.812,33 EP e ovócitos/ kg de peixe) e 2011 (239.993 ± 53.739 e 319.581 ± 90.544 EP e ovócitos Kg^{-1} de peixe) foram similares ($p \geq 0,05\%$) (Figura 7).

[12]F1 – Fêmea Velha; F2 – Fêmea Jovem; F – Fêmea; * ovócitos engrumados.

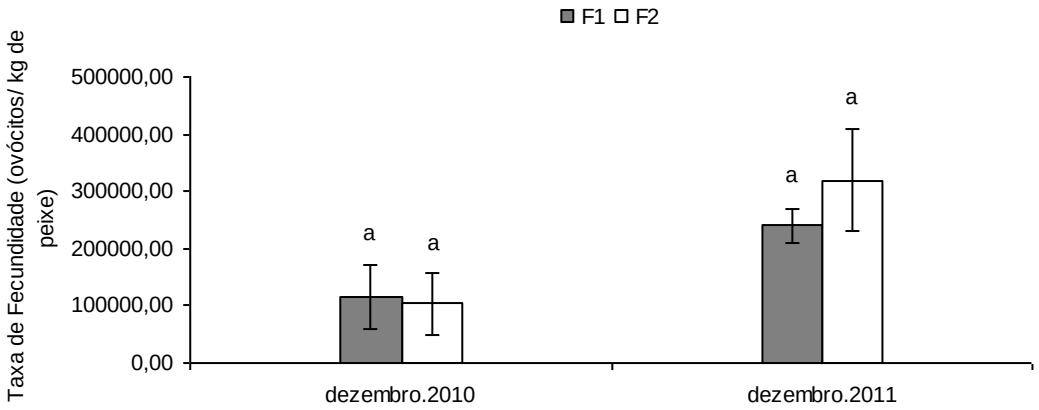


Figura 7 - Média das taxas de fecundidade relativa, com erro padrão de fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu em dezembro de 2010 e 2011[13].

As taxas de fertilização e eclosão dos ovos e embriões das F2 em 2010 foram respectivamente 66,87 ± 7,50% EP e 46,48 ± 6,70% EP. Neste mesmo ano, os ovos da única F1 que desovou goraram algumas horas após a liberação dos ovócitos.

Em 2011 as taxas médias de fertilização e eclosão da única F1 que liberou ovócitos viáveis e das F2 foram: 96,40 ± 0,40% e 94,75 ± 3,10% EP e 64,30 ± 1,75% e 81,60 ± 3,70%, respectivamente.

No primeiro (2010) e segundo ano (2011) de amostragens diretas das desovas, apontaram que as F1 apresentaram um perfil de distribuição de diâmetro dos ovos deslocado para a direita (~ 1000 µm) em relação ao perfil das F2, ou seja, diâmetro maior dos ovócitos (Figura 8 A e B). Os ovócitos das fêmeas de pacu que responderam ao tratamento hormonal e apresentaram taxas de fertilização apresentaram uma distribuição de freqüência porcentual dos diâmetros acima de 950 µm (Figura 8 A e B). As F1 apresentaram uma distribuição polimodal de seus ovócitos desovados, enquanto que as F2 apresentaram modas unimodais.

Apesar da distribuição dos diâmetros dos ovócitos ser maior nas F1, ao analisar o diâmetro médio dos ovócitos desovados, não observamos diferenças entre F1 e F2 ($p \geq 0,05\%$) (Tabela 5).

[13]Médias seguidas de letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no mesmo período entre os grupos. n equivale o número de peixes. (dezembro 2010 = n F1 (6) e n F2 (6); dezembro de 2011 = n F1 (6), n F2 = (6)).

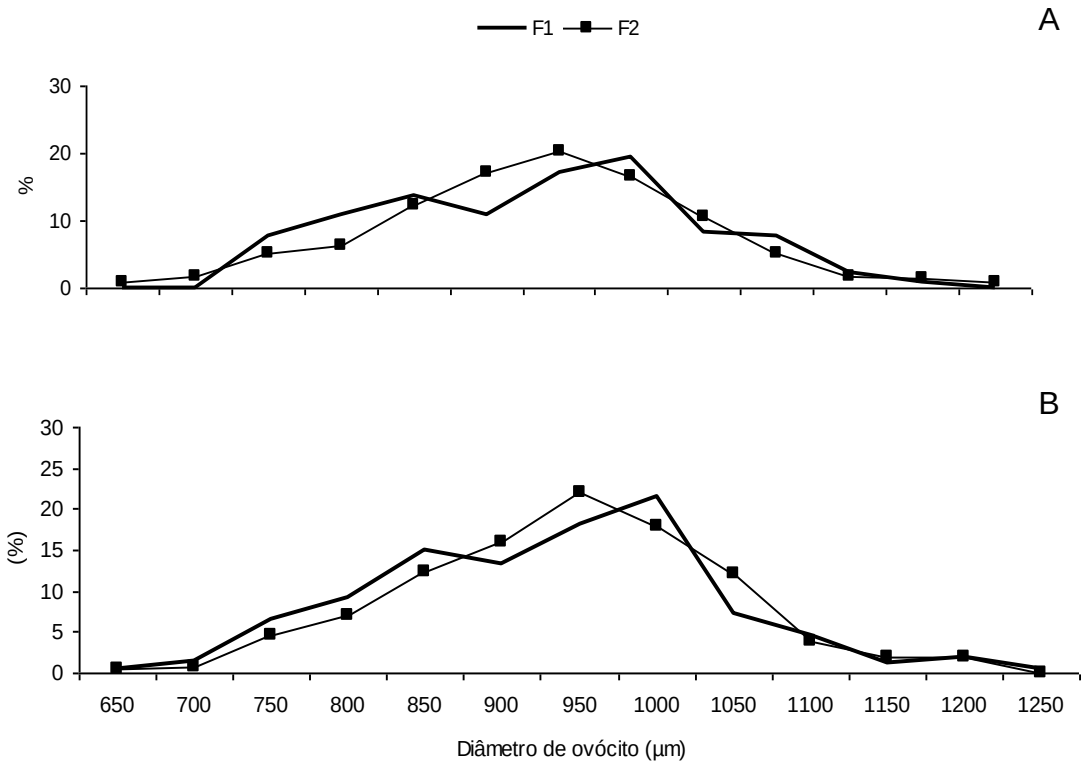


Figura 8 – Diâmetro dos ovócitos de desovas de fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu: dezembro de 2010 (A) e dezembro de 2011 (B)[14].

Tabela 5 - Diâmetro médio (µm) dos ovócitos de desovas de fêmeas F1 e fêmeas F2 de pacu: dezembro de 2010 e 2011[15]

	Diâmetro médio dos ovócitos	
	2010	2011
F1	990 ± 122 µm [a]	998 ± 123 µm [a]
F2	968 ± 119 µm [a]	988 ± 148 µm [a]

[14, 15] (dezembro 2009 = n F2 (6) e n F1 (6); dezembro de 2011 = n F2 (6), n F1 = (6)).

[15]Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$) no mesmo grupo ao longo do período; e médias seguidas de letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$) no mesmo período entre os grupos.

3.2.3. Larvicultura

Entre 60 e 96 horas pós eclosão, as larvas das F1 apresentaram biomassa superior às larvas das F2 ($p \leq 0,05\%$) (Figura 9 A). As larvas oriundas de F2 coletadas em 2010 apresentaram do momento da eclosão até 36 horas pós- eclosão comprimento superior do que as larvas de F2 e F1 de 2011($p \leq 0,05\%$) (figura 9 B). Após 72 horas, as larvas de F1 apresentaram maior comprimento total (0,57mm) ($p \leq 0,05\%$). Ao final do período de coleta (96 horas pós eclosão) as larvas oriundas dos três grupos apresentaram comprimento similar (Figura 9 B). Os valores médios relativos da altura corporal das larvas foram similares no momento da eclosão, apresentaram algumas diferenças ao longo do desenvolvimento e foram similares 96 horas pós eclosão ($p \leq 0,05\%$) (figura 9 C). O volume do saco vitelínico (mm^3) das larvas proveniente das F1 (2011) foi elevado ($p \leq 0,05\%$) desde o momento da eclosão até 96 horas pós eclosão em relação ao volume de vitelo das F2 de 2010 e 2011 (figura 9 D).

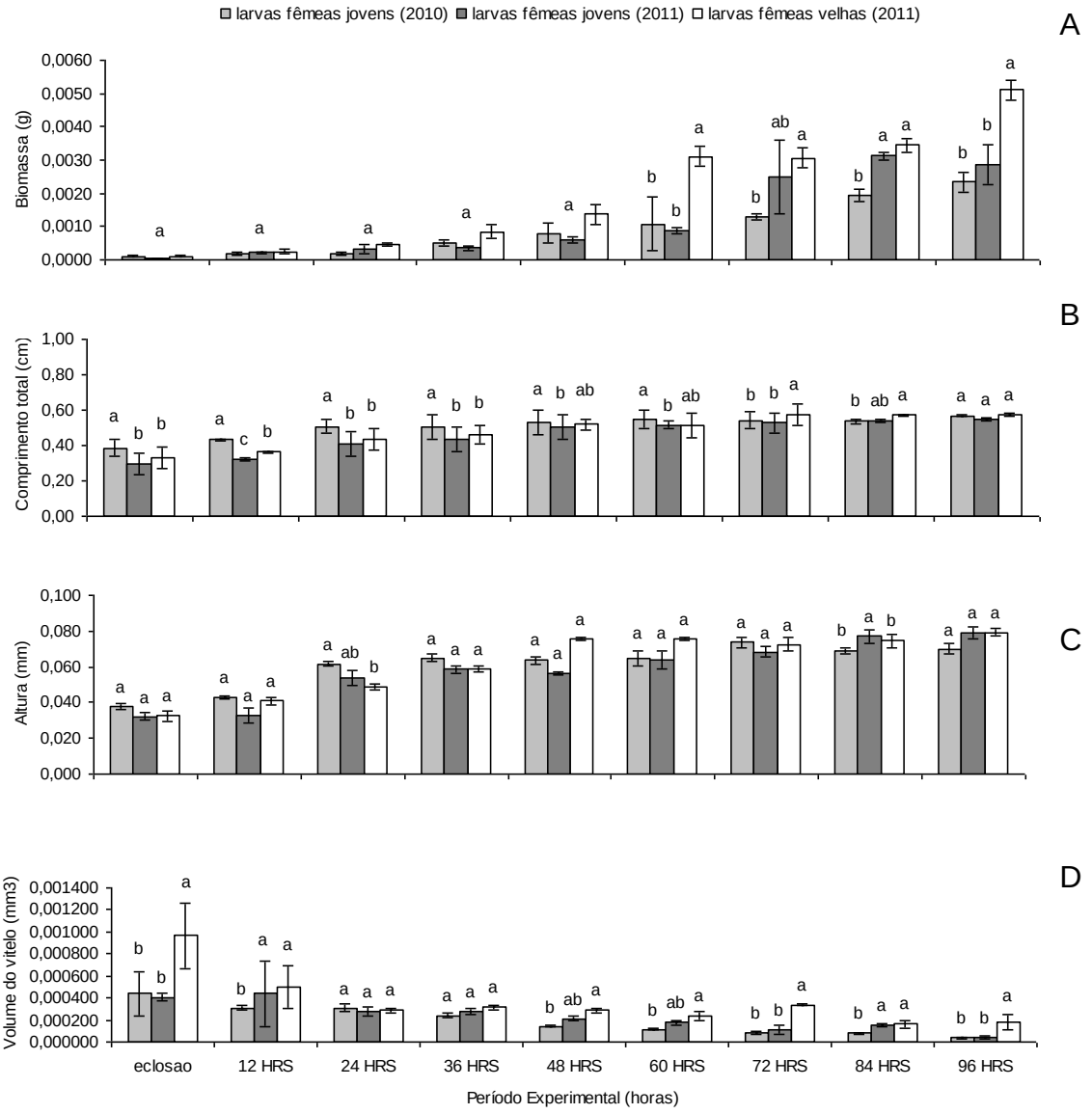


Figura 9 – Biomassa (g) (A), comprimento total (mm) (B), altura do corpo (mm) (C) e volume de vitelo (mm³) (D) de larvas de pacu do momento da eclosão até as primeiras 96 horas após eclosão, durante dois anos consecutivos. *n* = 10 larvas.

[14]Médias seguidas de letras diferentes significam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no mesmo período entre os grupos. O n equivale ao número de larvas: n larvas fêmeas F1 / 2011 (10); n larvas fêmeas F2/ 2011 (10); n larvas fêmeas F2/ 2010 (10).

3.3. Análises individuais das fêmeas de pacu

Observamos nas análises individuais, as F1 e F2 que apresentaram mais de 40% dos ovócitos de com VGE, EA acima de 5,0 cm e diâmetros dos ovócitos superiores a 925 µm responderam positivamente a indução hormonal.

Fêmeas que apresentaram papila não hemorrágica e Grau I da rigidez responderam ao tratamento hormonal, assim como fêmeas que apresentaram papila hemorrágica e Grau III da rigidez não apresentaram resposta positiva a indução.

Tabela 6 – Dados individuais de fêmeas de pacu durante dois anos consecutivo (2010 e 2011) [16]

	período	massa (g)	EA (cm)	GRAU I	PNH	VGE	VGC	VGA	Σ diâm.ovo. (µm)	desova	tx fert.	tx. ecl.
F1 (1)	dez/09	3600	4,8	GRAU I	PI	38,33	56,66	5	1103 ± 84	não	.	.
	dez/10	4415	5	GRAU I	PNH	42,8	44,8	12,4	1105 ± 78	não	.	.
	dez/11	4415	7,5	GRAU I	PNH	44,8	42,8	12,4	1105 ± 92	grumos	.	.
F1 (2)	dez/09	2700	4	GRAU II	PI	35,71	50	14,28	925 ± 106	não	.	.
	dez/10	2960	6,2	GRAU I	PI	45,9	40,6	13,5	928 ± 124	sim	0	0
	dez/11	3140	4,6	GRAU I	PI	40,6	45,9	13,5	925 ± 116	não	.	.
F1 (3)	dez/09	5700	5,5	GRAU I	PNH	6	8	86	1025 ± 76	não	.	.
	dez/10	5960	4,9	GRAU III	PH	39,3	51	9,7	877 ± 104	não	.	.
	dez/11	5680	6	GRAU III	PH	51	39,3	9,7	1035 ± 172	sim	96,7	64,43
F1 (4)	dez/09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	dez/10	3980	6	GRAU I	PH	29,1	62	8,9	900 ± 123	grumos	.	.
	dez/11	4300	4,6	GRAU II	PH	62	29,1	8,9	1035 ± 101	não	.	.
F2 (1)	dez/09	3200	4	GRAU I	PNH	15,87	84,12	0	955 ± 127	não	.	.
	dez/10	2630	5,2	GRAU I	PI	46	49,3	4,7	850 ± 134	não	.	.
	dez/11	3735	5	GRAU II	PI	77,6	11,2	11,2	955 ± 127	sim	91,6	81,6
F2 (2)	dez/09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	dez/10	2355	5	GRAU I	PI	44,9	47,8	7,3	960 ± 72	sim	62,67	51,8
	dez/11	2900	4	GRAU I	PNH	.	.	.	920 ± 129	não	.	.
F2 (3)	dez/09	3500	5	GRAU II	PI	.	.	.	.	.	.	.
	dez/10	3500	6	GRAU I	PI	49	46	5	960 ± 99	sim	80,6	50,1
	dez/11	4030	3,8	GRAU I	PI	40,74	51,85	7,41	925 ± 125	sim	0	0
F2 (4)	dez/09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	dez/10	3220	5	GRAU I	PNH	49,2	48,7	2,1	985 ± 133	sim	80,5	65,9
	dez/11	3335	5	GRAU I	PNH	.	.	.	890 ± 120	não	.	.

[16]F1 - fêmeas (≥ 10 anos) F2 - fêmeas (≥ 3 anos); EA - espessura do abdômen; GRAU I - rigidez abdômen/ duro; GRAU II - rigidez abdômen/ intermediário; GRAU III - rigidez abdômen/ macio; PNH - papila não hemorrágica; PI - papila intermediária; PH -papila hemorrágica; VGE -vesícula germinativa excêntrica; VGC - vesícula germinativa centralizada; VGA - vesícula germinativa ausente; diam. ovo. - diâmetro do ovócito; tx. fert - taxa de fertilização; tx. ecl. - taxa de eclosão; x -item assinalado; **.** - ausência de dados.

3.4. Parâmetros físicos e químicos da água

A temperatura média anual dos viveiros foi de 23,80 ± 0,72 ºC. O oxigênio dissolvido da água apresentou média anual de 6,34 ± 0,64 mg L^{-1}, assim como o pH, onde a média anual foi de 7,58 ± 0,33. A condutividade apresentou média anual de 63,24 ± 2,88 µS cm^{-1}. Para os parâmetros da água mensurados quinzenalmente, as médias anuais para amônia total (µg L^{-1}), alcalinidade total (mg L^{-1}) e dureza total (mg L^{-1}) foram: 0,28 ± 0,01 µg L^{-1}; 57,12 ± 3,56 mg L^{-1}; 61,64 ± 3,84 mg L^{-1}, respectivamente.

Durante às primeiras 96 horas de vida das larvas, foram mensuradas a temperatura média (26,8 ± 0,4 ºC), o oxigênio dissolvido (7,2 ± 0,1 mg L^{-1}), o pH (7,5 ± 0,2 mg L^{-1}) e a condutividade elétrica (70,0 ± 0,8 µS cm^{-1}) da água das incubadoras.

4. Discussão

Neste estudo observamos que as F1 e F2 de pacu apresentaram similidade nos períodos vitelogênicos (outubro) e de desova (em dezembro). Em março as fêmeas não puderam ser canuladas, devido ao estreitamento dos ductos genitais, o que indica que estas estavam em atresia ou repouso, similar ao descrito por Lima *et al.* (1991) e Romagosa (1990). O IGS e as características morfométricas dos ovários (na época de reprodução) corroboraram o padrão similar de desenvolvimento ovariano das F1 e F2 definidos pela relação EA/CT e pelas características dos ovócitos ao longo do ciclo reprodutivo. Neste estudo os valores de IGS tornaram-se similares após o primeiro ciclo reprodutivo, indicando que as diferenças de IGS entre fêmeas mais velhas e mais jovens são expressivas nas primeiras desovas, mas tendem a diminuir com o passar do tempo (Peixoto *et al*., 2004 Delahunty e DeVlaming, 1988).

Avaliando o uso de parâmetros externos para a seleção de fêmeas de pacu aptas à desova, observamos que a EA e a relação EA / CT são confiáveis, pois apresentaram alto grau de associação com os resultados obtidos com as analises por canulação. O aumento gradativo da região ventral, em virtude do desenvolvimento dos ovários, é um acontecimento amplamente descrito em peixes reofílicos brasileiros (Carolsfeld *et al*, 1988; Bock e Padovani, 2000; Andrade – Talmelli *et al*, 2002; Branco *et al*, 2011). Por outro lado, observamos que as características da papila e o grau de rigidez do abdômen não apresentaram associação com os resultados da técnica de canulação, nem são bons indicativos de ovulação bem sucedida.

As características do processo de evolução da maturação ovariana das F1 e F2 definidos pela técnica de canulação e pela relação EA / CT apresentaram convergência com o perfil anual do E_2 e da 17α-OHP. A elevação da concentração plasmática do E_2 nas F1 no período de outubro (2010 e 2011) ocorreu concomitante ao aumento da EA/ CT. Sabe-se que em peixes migradores sul-americanos a concentração plasmática do E_2 aumenta durante o processo vitelogênico (Gazola e Borella, 1997, Arantes *et al.*, 2010, Hainfellner *et al.*, 2012) e é nessa fase que ocorre o crescimento dos ovócitos (Nagahama, 1997), fato

observado também nas F1 e F2 deste estudo. Em peixes migradores nativos sabe-se que elevações nas concentrações plasmática de E_2 correlacionam-se com elevações no percentual e diâmetro de ovócitos vitelogênicos (Hainfellner *et al.*, 2012). No entanto, algumas diferenças observadas entre as concentrações de E_2 entre os grupos não tiveram reflexos óbvios em diferenças entre a dinâmica de seus respectivos ciclos reprodutivos. Com relação à 17α-OHP, encontramos nos dois ciclos reprodutivos analisados concentrações plasmáticas reduzidas nas F1 comparada às F2, ora na fase reprodutiva (outubro de 2010) e ora na fase vitelogênica (outubro de 2011). A 17α-OHP, principal precursora da 17α, 20 β-dihydroxy-4-prengnen-3-one (DHP), é um indutor do processo de maturação final e ovulação em peixes (Nagahama e Yamashita, 2008). Os valores reduzidos das concentrações plasmáticas da 17α-OHP nas F1 associam-se com o desempenho reprodutivo inferior deste grupo, como já observado em indivíduos de idade mais avançada de outras espécies (Zuckerman, 1962; Gosden, 1985; Finch, 1990; Vom Saal *et al.*, 1994; Callebaut *et al.*, 1997).

A associação entre o aumento da idade das fêmeas e a queda no desempenho reprodutivo é conhecida também em vertebrados mamíferos, tais como: humanos, macacos e roedores (Gosden, 1985; Finch, 1990; Vom Saal *et al.*, 1994), e não- mamíferos como: galinhas e codornas (Callebaut *et al.*, 1997; Zuckerman, 1962). Assim, os valores inferiores na concentração de 17α-OHP nas F1 comparado com as F2 sinalizam para uma eventual redução na capacidade de síntese de esteróides com o avançar da idade no pacu, sendo necessário confirmar esta hipótese em abordagens específicas, pois estas informações podem incrementar muito o manejo reprodutivo destas espécies.

Os outros hormônios esteróides analisados, T e 11KT, têm função menos conhecida em fêmeas de teleósteos e totalmente desconhecida em fêmeas de teleósteos migradores tropicais. As concentrações plasmáticas de T superiores em março e dezembro de 2011 para as F2 em relação às F1 podem estar associadas também a um eventual capacidade esteroidogênica superior das fêmeas mais jovens. A concentração plasmática da 11 KT das F1 e F2 de pacu não apresentaram associação e/ ou interferência aparente com o processo de desenvolvimento ovariano ou época de desova, bem como, não foram encontrados discrepâncias entre os grupos ao longo das coletas. O papel do 11KT é pouco conhecido em fêmeas de teleósteos, porém alguns estudos associam elevações deste esteróide com a

atividade vitelogênica (Kime e Manning, 1982; Fitzpatrick *et al.*, 1986), o que não foi observado com as fêmeas de pacu.

O diâmetro médio dos ovócitos das F1 foi superior ao das F2, corroborando os dados de diversos estudos onde fêmeas mais velhas apresentam ovócitos com diâmetro médio superior que fêmeas jovens (Last, 1980; Blaxter e Hampel, 1983; Miller *et al.*, 1988; Rana, 1988; Bailey e Houde, 1989; Moodie *et al.*, 1989; Hinckley, 1990; Wooton, 1994; Bergot e Kestemont, 1995; Hare e Cowen, 1997; Trippel, 1998; Marteinsdottir e Steinarsson, 1998; Berkeley *et al.*, 2004; Kamler, 2005). Entretanto, apesar da suposta vantagem de ovócitos com diâmetro maior, as fêmeas de pacu com mais idade, pelo menos as utilizadas neste estudo, não devem ser utilizadas como matrizes nas estações de desova, pois não ovulam após as induções hormonais ou desovam ovócitos empedrados. Neste estudo, a ocorrência de ovócitos engrumados foi muito mais intensa no grupo das F1 e os gastos com a indução hormonal nestas fêmeas corroboram para evitá-las como matrizes. Além disso, a taxa de fecundidade relativa foi semelhante entre F1 e F2 indicando que, em termos proporcionais, o maior tamanho das F1 também não se reflete em uma maior quantidade relativa de descendentes. Os motivos pelos quais algumas fêmeas desovam e outras não (em tratamentos convencionais) ainda são desconhecidos (Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012). Pelo fato de uma única F1 ter desovado, as taxas de fertilidade e eclosão observadas nesta fêmea não permitem comparações ou interpretações sobre o grupo das F2. Por outro lado, podemos concluir que as taxas correspondentes às F1 e F2 foram adequadas, pois foram superiores àquelas reportadas na literatura: 64,0 a 67,0% (fertilização) e 51,0 a 54,0% (eclosão) (Ceccarelli *et al.*, 2000; Guerreiro *et al.*, 2011).

Outra observação que pode estar ligada à resposta na indução hormonal é a distribuição da moda dos ovócitos durante as desovas, sendo que as F2 e as F1 apresentaram respectivamente curvas unimodais e polimodais. Segundo Fenerich – Verani *et al.*(1984), curimbatás (*Prochilodus scrofa*) que apresentaram distribuição dos ovócitos unimodal tiveram sucesso na fertilização, enquanto que fêmeas que apresentaram distribuição polimodal não respondiam aos tratamentos hormonais. No presente trabalho com *Piaractus mesopotamicus*, as fêmeas que ovularam apresentaram uma distribuição da freqüência percentual do diâmetro médio de seus ovócitos acima de 925 µm. Resultados semelhantes foram observados em pacus (Romagosa *et. al*. 1990) e matrinxãs (Romagosa,

1998). Shehadeh *et al*. (1973), trabalhando com *Mugil cephalus*, e Godinho *et al.* (1984a e 1993), com *Mugil liza* e *Mugil platanus*, utilizaram o diâmetro médio dos ovócitos como critério de seleção de fêmeas para indução da reprodução, bem como e Romagosa *et al*. (1990) e Andrade-Talmelli (1997) em *Brycon insignis* .

Observamos neste estudo que a indução hormonal, seja qual for a idade do plantel, deve ser evitada nas mesmas fêmeas em anos consecutivos, pois prejudicam as taxas de ovulação e o desempenho reprodutivo. Em salmões, alguns indivíduos desovam em anos consecutivos, mas as desovas em anos alternados são mais comuns, pois os processos o ciclo reprodutivo dessa espécie pode levar mais de um ano para se concluir (Warner, 1962). De forma similar, o esturjão "*shortnose*" (que também apresenta desova total) pode se reproduzir em anos consecutivos, mas isso ocorre raramente com alguns poucos indivíduos (Collins e Smith, 1993).

A biomassa total e volume do saco vitelínico nas primeiras 96 horas das larvas de F1 foram superiores comparados aos das larvas de F2. Na literatura existem relatos de matrizes mais velhas de teleósteos que produzem larvas de maior tamanho quando comparadas com larvas de matrizes de primeira desova (Solemdal, 1970; Marteinsdottir e Steinarsson, 1998; Marteinsdottir e Begg, 2002; Benton *et al.*, 2008), o que não foi observado neste experimento. Assim, as larvas das F1 apresentaram saco vitelínico de tamanho superior ao das larvas das F2, fato também observado em larvas provenientes de matrizes mais velhas de truta arco - íris, *Oncorhynchus mykiss* (Bromage *et al.*, 1992), *Hemiramphus brasiliensis* e *H. balão* (Berkeley *et al.*, 2004) dentre outras espécies de teleósteos (Chambers, 1997; Benton *et al.*, 2008). Essa reserva energética inferior nas larvas de F2, pode estar relacionada a baixa quantidade de recursos internos disponíveis em indivíduos jovens, e sua baixa capacidade em assimilar e distribuir os recursos de energia, incluindo a mantença (Dunham *et al.*, 1989; Bernardo, 1996), como fazem matrizes mais velhas (Kerrigan, 1997; Gagliano and McCormick, 2007; Green, 2008). No entanto, neste estudo observamos que o maior tamanho do saco vitelínico das larvas oriundas de fêmeas de maior idade não justifica sua escolha como matrizes, pois outros aspectos como a taxa de ovulação e o desempenho reprodutivo são muito inferiores. A suposta vantagem de indivíduos mais velhos produzirem ovócitos maiores, gerando indivíduos maiores e providos de mais reservas vitelogênicas durante os primeiros dias de

suas vidas (Blaxter e Hampel, 1983; Moodie *et. al*, 1989; Bromage *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1995; Pepin *et al.*, 1997; Marteinsdottir e Steinarsson 1998; Nissling *et al.*, 2000; Berkeley *et al.*, 2004; Carr e Kaufman, 2009) não foi corroborada neste estudo.

Neste estudo, a temperatura da água dos viveiros se apresentou favorável para o cultivo de pacus, mantendo- se dentro dos níveis recomendados para espécie se alimentar (Pullela, 1997) e se reproduzir (Richert *et al.*, 1982; Dairiki *et al.*, 2010). Os valores médios da concentração de oxigênio dissolvido dos viveiros foi adequado (Pullela, 1997) não interferindo nos processos fisiológicos, como observado por Dabrowski *et al.* (2003) em condições de hipóxia. O pH, a condutividade, a amônia total, a alcalinidade total e a dureza total classificam a água utilizada neste experimento como de boa qualidade, garantindo confiabilidade aos resultados encontrados sem interferir no bem estar fisiológico dos peixes (Boyd, 1982; Sipaúba – Tavares, 1995).

Concluindo, observamos que F1 e F2 apresentam ciclo reprodutivo similar, confirmado através das análises de EA, canulação, histologia e esteroides gonadais. As fêmeas de pacu de dez anos, utilizadas neste estudo, não devem ser utilizadas como matrizes, pois apresentam baixa taxa de ovulação e quando ovulam normalmente expelem ovócitos empedrados inviáveis para a utilização. Confirmamos observações anteriores, em outros teleósteos, de que fêmeas maiores e de maior idade produzem ovos e de tamanho maior. No entanto apesar das larvas oriundas destes ovócitos de tamanho maior ter sacos vitelinicos de maior volume, estas apresentam tamanho similar às larvas oriundas de ovócitos de tamanho menor (fêmeas jovens). Neste estudo observamos para ambos os grupos que a mesma fêmea não deve ser submetida à indução hormonal em anos consecutivos e que a espessura do abdômen e a o percentual de ovócitos com vesícula germinativa excêntrica são parâmetros que se associam com ovulação bem sucedida.

5. Referências bibliográficas

Abdoli, A., Pont, D., Sagnes, P. Influence of female age, body size and environmental conditions on annual egg production of the gilthead *Cottus gobio* (Bez drainage France**).** *J. Fish Biol.* 67: 1327–1341, 2005.

Agostinho, A. A.; Bini, L. M.; Gomes, L. C.; Julio, H. F., Jr; Pavanelli, C. S.; Agostinho, C. S. Fish assemblages. *In: The Upper Parana´ River floodplain: physical aspects, ecology and conservation***.** S. M. Thomaz, A. A. Agostinho, N. S. Hahn (Eds), Backhuys Publishers, Leiden, p. 223–246, 2004.

Andrade-Talmelli, E.F. Indução reprodutiva e ontogenia inicial da piabanha, *Brycon insignis*, (Steindachner, 1876 (*Characiformes, Bryconinae),* mantida em confinamento ¾ Vale do Paraíba, SP. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1997. 185p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, 1997.

Andrade – Talmelli, E. F.; Kavamoto, E. T.; Narahara, M. Y.; Fenerich – Verani, N. Reprodução induzida da piabanha *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) mantidas em cativeiro. *Revista Brasileira de Zootecnia,* 31 (2): 803 – 811, 2002.

Ávila, W. R.B.; Lírio, V. S.; Santos, M. L.; Vieira, W. C. Uso de dinâmicas de sistemas como suporte a decisão em propriedades produtoras de leite: um estudo de caso. *Revista de Economia e Agronegócio,* 2 (4): 525 – 546, 2004.

Bailey, K.M., Houde, E.D. Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. *Advances in Marine Biology*. 25: 1–83, 1989.

Benton, T. G.; St. Clair, J. J. H.; Plaistow, S. J. Maternal effects mediated by maternal age: from life histories to population dynamics. *Journal of Animal Ecology*, 2008.

Bergot, P.; Kestemont, P. L' alimentation artificielle des larves de carpe. In: Billard, R. (ed.), *Les carpes: biologie et e´levage. INRA*, Paris, pp. 164–168, 1995.

Berkeley, S. A.; Chapman, C.; Sogard, S. M. Maternal age as a determinant of larval growth and survival in marine fish, *Sebastes melanops*. *Ecology*, 85 (5): 1258 – 1264, 2004.

Bernardo, J. The particular maternal effect of propagule size, especially egg size: patterns, models, quality od evidence and interpretations. *Amer. Zoology*, 36: 216 – 236, 1996.

Blaxter, J. H. S.; Hempel, G. The influence of egg size on Herring larvae (*Clupea harengus* L.). *Journal Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 28: 211 -1240, 1963.

Bock, C. L.; Padovani, C. R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu em viveiros. *Acta Scientiarium*, 22 (2): 495 – 501, 2000.

Bobe, J.; Labbe, C. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 535 – 548, 2010.

Borghetti, J. R. and C. Canzi. The Effect of Water Temperature and Feeding Rate on the Growth Rate of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Raised in Cages. Aquaculture. 61: 91 – 101, 1993.

Boyd, C. E. Water quality management for pond fish culture. *Development in Aquaculture and Fisheries Science*, New York: Elsevier scientific Publishing Company, (9) 318p.,1982.

Branco, G. S.; Santos, A. P.; Jesus, L. S.; Senhorini, J. A.; Ninhaus- Silveira, A.; Veríssimo – Silveira, R. Desempenho reprodutivo de F6emeas de *Piaractus mesopotamicus* induzidas com hipófises de *Geophagus proximus* provenientes da pesca profissional no Rio Paraná. CEPTA/ ICMBIO - Instituto Chico Mendes – Pirassununga – SP, 2011.

Bromage, N.R., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J. and Barker, G. Egg quality in fish. Broodstock management, fecundity, egg quality and the

timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss). Aquaculture* 100: 141- 166, 1992.

Brooks S, Tyler CR, Sumpter J. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in fish and fisheries*, 7: 387-416, 1997.

Callebaut,I., Labesse,G., Durand,P., Poupon,A., Canard,L., Chomilier, J., Henrissat,B. and Mornon,J.-P. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster (HCA): current status and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53, 621–645, 1997.

Carolsfeld, J.; Ramos, S. M.; Ormanezi, R.; Gomes, J. H.; Barbosa, J. M.; Harvey, B. Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887). *Aquaculture*, 74: 49 – 55, 1988.

Carr, J. P.; Kaufman, L. Estimating the importance of maternal age, size, and spawning experience to recruitment of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Biological Conservation*, 142: 477 – 487, 2009.

Castagnolli, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisa em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia. p.157-170, 1992.

Chambers, R.C. and Trippel, E.A. (eds). *Early Life History and Recruitment in Fish Populations*. Chapman & Hall, London, 596 p., 1997.

Ceccarelli, P.S.; Senhorini, J.A.; Volpato, G.P. *Dicas em piscicultura; perguntas e respostas.* Botucatu: Santina Gráfica Editora. 247p., 2000.

Criscuolo-Urbinati E., Urbinati, E.C., Kuradomi R.Y., Batlouni, S.R. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, 78: 2087-2094, 2012.

Dabrowski, K., J. Rinchard, J. S. Ottobre, F. Alcantara, P. Padilha, A. Ciereszko.. Effect of oxygen saturation in water on reproductive performances of pacu Piaractus brachypomus. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34: 441-449, 2003.

Dairiki, J.K; Baldessin Jr., I.; Pena, S. V.; Cyrino, J. E. P. *Manual técnico de Extensão (2): Pacu e Tambacu.* ESALQ – USP, 1 – 9, 2010.

Delahunty, G. and V. L. DeVlaming. Seasonal relationships of ovary weight, liver weight and fat stores with body weight in the goldfish, *Carassius auratus* (L.). *J. Fish. Biol.* 16:5-13, 1988.

Dunham A. E., B. W. Grant, and K. L. Overall. Interfaces between biophysical and physiological ecology and the population ecology of terrestrial vertebrate ectotherms. Physiol. Zool. 62:335-355, 1989.

Estay, F. J., Noriega, R., Ureta, J. P., Martin, W., Colihueque, N. Reproductive performance of cultured brown trout (*Salmo trutta* L) in Chile. *Aquaculture research*, 35: 447 – 452, 2004.

Fenerich-Verani, N.; Narahara, M.Y.; Godinho, H.M. The size composition of the eggs of curimbatá *Prochilodus scrofa*, Steind., 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture*, 42: 37-41, 1984.

Ferraz De Lima J.A., G. Barbieri y J. R. Verani. Período de reprodução, tamanho da primeira aturação gonadal do pacu, C*olossoma mitrei*, em ambiente natural. Anais Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. São Carlos, Brasil,1984.

Finch C. E. *Longevity, senescence and the genome. Chicago, IL: University of Chicago Press*, 1990.

Fitzpatrick M. S., van der Kraak G. and Schreck C. B. (1986) Profiles of plasma sex steroids and gonadotropins in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch***,** during final maturation. *Germ. camp. Endocr. 62, 43745* I.

Gagliano, M., and McCormick, M. I. Maternal condition influences phenotypic selection on offspring. *J. Anim. Ecol*. 76, 174–182, 2007.

Gazola, R.; Borella, M. I.; Donaldson, E. M.; Val – Sella, M. V.; Sukumasavin, N.; Fava – De – Moraes, F.; Bernardino, G. Plasma steroids and corticosteroids levels in female pacu, *Piaractus mesopotamicus*, teleostei – Characidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 659 – 664, 1996.

Godinho, H.M., Fenerich, N.A., Narahara, M.Y. end Barker, J.M.B. Sobre a reprodução induzida do pacu *Cobeeoma mitrei* (Berg, 1895). Cienc. Cult., 29(7): 796 – 797, 1977.

Godinho, H. P.; Godinho, A. L. Induced spawning of the pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985), by hypophysation with crude carp pituitary extract. *Aquaculture*, 55: 69 – 73, 1986.

Godinho, H.M.; Dias, E.R.A.; Jacobsen, O. et al. Reprodução induzida de tainha *Mugil liza* Val. 1836 da região de Cananéia, SP, Brasil (25° 21' S). SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQÜICULTURA, 3., 1984, São Paulo. *Anais***...** São Paulo: 661-671, 1984a.

Godinho, H.M.; Kavamoto, E.T.; Andrade-Talmelli, E.F. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880, in Cananéia, SP, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 20 (único): 59-66, 1993.

Godinho, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(3): 351-360, 2007.

Green, B. S. *Maternal Effects in fish populations*. Chapter 1, p. 105, 2008.

Gosden, R.G. *Biology of Menopause: The Causes and Consequences of Ovarian Ageing*. London: Academic Press, 1985.

Guerreiro, L. R. J.; Dias, J. A. D.; Fornari, D.; Ribeiro, R. P.; Zanoni, M. A. Incubação de ovos e larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) em incubadoras do tipo israelense e Woynarowich. *Ciência Agrária***,** Londrina, 32 (2): 781 – 794, 2011.

Hare, J. A.; R. K. Cowen. Size, growth, development and survival of the planktonic larvae of *Pomatomus saltatrix* (Pisces: Pomatomidae). *Ecology,* 78:2415–2431, 1997.

Hainfellner P, de Souza, T.G., Muñoz, M.E., Freitas G.A., Batlouni, S.R. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 64: 515–517, 2012.

Hinckley, S. Variation of egg size of wallece pollack *Theragra chalcogramma* with a preliminary examination of the effect of egg size on larval size, *Fish. Bull.* 88: 471–483, 1990.

Hutchings, J. A., Myers, R. A. Effects of age on the seasonality of maturation and spawning of Atlantic Cod, *Gadus morhua*, in the Northwest Atlantic. *Can. J. Fish. Aquat. Sci***.,** 50, 1993.

IBAMA/DIFAP.CGREP. *Estatística da pesca***.** Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. Brasil: grande regiões e unidades de federação. Brasília, 17 p., 2002.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. e*statística da pesca 2007. Brasil, grandes regiões e unidades da Federação*. Brasília, 151p., 2008.

Jomori, K.R., Carneiro, D. J., Malheiros, E. B., Portella, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus (*Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture***,** 221: 277 – 287, 2003.

Kamler, E. Parent – egg – progeny relationships in teleost fish: as energetic perspective. *Reviews in Fish and Fisheries*, 15: 399 – 421, 2005.

Kerrigan, B. A. (1997). Variability in larval development of a tropical reef fish (Pomacentridae: Pomacentrus amboinensis): The parental legacy. *Mar. Biol*. 127, 395–402, 1997.

Kime D. E. and Manning N. J. Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout, *Salmo trutta. Gen. camp. Endocr.* 48, 222-231, 1982.

Lambert, T. C. Duration and intensity of spawning in herring (*Clupea morhua*) as related to the age structure of the mature population. *Marine Ecology Progress* Series, 39: 209 – 220,1987.

Last, J. M. The food of twenty species of fish larvae in the west-central North Sea. *Fisheries Resources Technical Report*, MAFF Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, 60: 44 p., 1980.

Lemanova, N. A.; Sakum, O. F. Metodiseeskoe posiblilie pogor monalmoistimulacji proizvoditielei Karpa pré rannom poluccnii licinok. Izvestiya. *Gosudartvennogo Nauchno - Isseledivatel Skogo Instituta*, 88: 3-23, 1975.

Le Cren, E. D. The length–weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (Perca flavescens). *J. Anim. Ecol*. 20: 201–219, 1951.

Lima, R.V.A.; Bernardino, G.; Val-Sella, M.V. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacu *(Piaractus mesopotamicus,* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiros. *Bol. Téc. Cepta*, 4(1):1-46, 1991.

Lovatto P.A. *Suinocultura geral.* 83p., 2002.

Macchi, G.J., M. Pájaro and M. Ehrlich, Seasonal egg production pattern of the Patagonian stock of Argentine hake (*Merluccius hubbsi*), *Fish. Res.* 67: 25–38, 2004.

Marteinsdottir, G.; Steinarsson, A. Maternal influence on the size and viability of Iceland *Gadus morhua* eggs and larvae. *Journal of Fish Biology*. 52: 1241 – 1258, 1998.

Marteinsdottir, G.; Begg, G. Essential relationship incorporating the influence of age, size and condition on variables required for estimation of reproductive potential in Atlantic cod *Gadus morhua. Marine Ecology Progress Series***,** 235: 235 – 256, 2002.

Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A. and Marschall, E.A. Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Can J. Fish. Aquat. Sci*. 45: 1657 – 1670, 1988.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura: *Estatística da Pesca e Aquicultura em 2010*, http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura, 2011.

Moodie, G.E.E., Loadman, N.L., Wiegand, M.D. and Mathias, J.A. Infuence of egg characteristics on survival, growth and feeding in larval walleye (Stizotedion vitreum**).** *Can. Journal of Fisheries Aquatic Science***,** 46: 516 - 521, 1989.

Mylonas, C. C., Fostier, A. & Zanuy, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol*. 165: 516–534, 2010.

Munro, A. D., Scott, A. P. Lam, T. J. *Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences*, 1990.

Nagahama, Y.17α, 20β-Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62, 190–196, 1997.

Nagahama, Y., Yamashita, M., Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth Differ*. 50: 195 – 219, 2008.

Nissling, A.; Vallin, L. Maternal effects on egg size and egg buoyancy of *Gadus morhua* implications for stock structure effects on recruitment. *Fisheries Research.*, 49: 21 – 37, 2000.

Nomura H.. Fecundidade e hábitos alimentares da Piava *Leporinus copelandii* (Stendachthner, 1975) do rio mogi guaçu, SP (Osterchthyes, Anostomidae). *Rev. Bra. Biologia*, 36(2): 269 – 273, 1978.

Ostrensky, A.; Boeger, W.A. Principais problemas enfrentados atualmente pela aqüicultura brasileira. In: Ostrensky, A. et al. *Aqüicultura no Brasil: O desafio é cresce***r.** brasília: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca /FAO,. p.135-158, 2008.

Pai, V.D.; M.D. Pai-Silva; E.D. Carvalho; C.Y. Fujihara; E.A. Gregório and P.R. Curi. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anat. Histol. Embryol*. 29: 283-289, 2000.

Pagni, K., Atse, B. C., Kouassi, N. G. J. Influence of broodstock age on reproductive success in the African Catfish *C. nigrodigitatus* (Claroteidae Lacépede, 1803). *Research Journal of Animal Science*, 2(5): 139 – 143, 2008.

Peixoto, S.; Cavalli, R. O.; Wasielesky, F. D. I.; Krummenauer, D.; Milach, A. M. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Fanfatepenaeus paulensis* broodstock. *Aquaculture*, 238: 173 – 182, 2004.

Pepin P., Orr S. C., Armstrong J. T. Time to hatch and larval size in relation to temperature and egg size in Atlantic cod (Gadus morhua). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54 (1) :2-10, 1997.

Pitt, T.K. Sexual maturity and spawning of the American plaice, *Hippoglossoides platessoides* (Fabricius), from the Newfoundland and Grand Bank areas. *Journal of the* ***Fish****eries Research Board of Canada* 23*:*651–672, 1966.

Pullela, S. V. S. Aquaculture of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and a comparison of its quality: microbiological, sensory and proximate composition. *Thesis submitted to the Faculty* of t*he Virginia Polytechnic Institute and State University, Master of Science in food Science and Technology*. 204p., 1997.

Rana, R.S. Freshwater fish otoliths from the Deccan Trap associated sedimentary (Cretaceous–Tertiary transition) beds of Rangapur, Hydera− bad, District, Andhra Pradesh, India. *Géobios*, 21: 465–493, 1988.

Resende, F.D.; Signiretti,R. D. Sistema orgânico de produção de carne bovina. *Pesquisa & Tecnologia*, 2 (2): jul – dez, 2005.

Richter, C.J.J., Eding, E.H., Leuven, S.E.W. and Van des Wijst, J.M.G.M. Effects of feeding levels and temperature on the development of the gonad in the African catfish, Clarias lazera (C. & V.). In: C.J.J. Richter and H.J.Th. Goos (eds.), *Proc. Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish*, Wageningen, the Netherlands, 2–6 August 1982. Pudoc, Wageningen : 147–150, 1982.

Romagosa, E. et al. Reprodução induzida do pacu Colossoma mitrei Berg, 1895, mantidos em condições de cultivo intensivo. *Cienc. Cult*., Campinas, 37: (7) (supl.), p. 849, 1985.

Romagosa, E. Desenvolvimento gonadal (morfologia, ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro Vale do Ribeira,

São Paulo. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1998. 218p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, 1998.

Romagosa, E. Paiva, P., Godinho, H. M. Pattern effects of oocytes diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (Holmberg 1887) (*Colossoma mitrei* Berg, 1895). Aquaculture, 86 (1): 105 – 110, 1990.

SAS-STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, Inc. *SAS user's guide: Statistics*. Cary: SAS Inst., Inc. 956 p., 1998.

Schmidt – Baulain, R., Holtz, W. Effects of age and stage of spawning season on output, fertilizing capacity and freezability of Rainbow Trout (*O. mykiss*) sperm. *Proceedings of the 4th International Symposium on the Reproductive physiology of fish Norwich,*. 338 p., 1991.

Simpson, A.C. The fecundity of the plaice. *Fishery Investigation*, v.5, n.17, p.1-27, 1951.

Sipaúba-Tavares, L.H. Influência da luz, manejo e tempo de residência sobre algumas variáveis limnológicas em um viveiro de piscicultura. *Biotemas,* 8 (1): 61-71, 1995.

Shehadeh, Z.H.; Kuo C.M.; Milsem, K.K. Induced spawning of grey mullet (*Mugil cephalus)* with fractionated salmon pituitary extract. *Journal of Fish Biology*, 5: 471-478, 1973.

Solemdal, P. Intraspecific variations in size, buoyancy and growth of eggs and early larvae of Arcto-Norwegian cod, Gadus morhua L., due to parental and environmental effects. I*CES CM./F*:28, 11 p., 1970.

Stearn, S.C. Life-history tactics: a review of the ideas. *Q. Rev.Biol.*, Chicago, 51 (1): 3-47, 1976.

Streit Jr., D. P.; Moraes, G.V.; Ribeiro, R. P.; Sakaguti, E. S.; Povh, J. A.; Moreira, H. L. M. Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarium Animal Science*, 27 (4): 438 – 447, 2005.

Trippel, E. A., and M. J. Morgan.. Age-specific paternal influences on reproductive success in Atlantic cod (*Gadus morhua*) of the Grand Banks, Newfoundland. *ICES Mar. Sci. Symp.*, 198: 414–422, 1994.

Trippel, E. A. Egg size and viability and seasonal offspring production of young Atlantic cod. *Transactions of the American Fisheries Society***,** 127: 339 – 359, 1998.

Vom Saal, F. S.; Finch, C. E.; Nelson, J. F. Natural histories and mechanism of aging in humans , laboratory rodents and other selected vertebrates. *In: Physiology of reproduction*, New York, 1213 – 1314p., 1994.

Warner, K. The Landlocked salmon spawning run at cross lake through fare, *Marine*. 1: 131 – 138, 1962.

Wieland K, Jarre-Teichmann A, Horbowa K. Changes in the timing of spawning of Baltic cod: possible causes and implications for recruitment. *ICES J. Mar Sci.;* 57*:* 452–464, 2000.

Wootton, R.J. Life histories as sampling devices: optimum egg size in pelagic fishes, *J. Fish Biol.* 45*:* 1067–1077, 1994.

Zuckerman, S. In *The ovary* ed. 1: 361-434. New York, Academic Press, 1962.