

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

FERNANDO JUN-HO PEIXOTO KIM

EFEITOS DO HORMÔNIO 17 α -METILTESTOSTERONA NA MASCULINIZAÇÃO DO
PEIXE *Betta splendens* REGAN, 1909.

Recife, PE

Novembro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

FERNANDO JUN-HO PEIXOTO KIM

EFEITOS DO HORMÔNIO 17 α -METILTESTOSTERONA NA MASCULINIZAÇÃO DO
PEIXE *Betta splendens* REGAN, 1909.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Athiê Jorge Guerra Santos

Recife, PE

Novembro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

EFEITOS DO HORMÔNIO 17 α -METILTESTOSTERONA NA MASCULINIZAÇÃO DO
PEIXE *Betta splendens* REGAN, 1909.

Por: Fernando Jun-ho Peixoto Kim

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura** e aprovada em __/__/____ pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, em sua forma final.

Prof. Dr. Paulo Travassos
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Athiê Jorge Guerra Santos - Orientador
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Valdir Luna - Membro externo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Maria do Carmo Figueredo Soares - Membro interno
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. William Severi - Membro interno
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. José Milton Barbosa – Membro interno (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

A biotecnologia tem se espalhado por todos os ramos da aqüicultura, especialmente no que se refere à reversão sexual e masculinização de peixes. O macho da espécie *Betta splendens* apresenta coloração vibrante em seu corpo e nadadeiras maiores em relação as fêmeas, características essas, procuradas pelos criadores ornamentais. Estudos visando a masculinização, bem como técnicas e protocolos para a reversão sexual do beta através de indução hormonal são de grande aplicabilidade na aqüicultura ornamental. A reversão se deu por um único banho de imersão com 500 µg/L do hormônio 17 α-metiltestosterona (MT) durante 24 horas em peixes com 2, 4, 10, 30 de vida, inclusive em seus ovos. Apesar da proporção sexual fenotípica de 100% de machos, quanto mais jovens os peixes submetidos ao tratamento, maior sua mortalidade. Além do crescimento de todos os peixes tratados ter sido inferior significativamente ao controle. Na masculinização foram utilizadas concentrações de 10, 30 e 60 mg/Kg de MT na ração em fêmeas adultas de beta. Ao final de 90 dias, todas as fêmeas tratadas apresentaram crescimento do corpo e nadadeiras significativamente maiores que as do controle, além de apresentarem características fenotípicas masculinas, inclusive quanto ao comportamento reprodutivo. O presente trabalho demonstrou que ao invés da reversão sexual, a masculinização de fêmeas adultas de beta pode ser utilizada por produtores que buscam aumentar os seus lucros.

ABSTRACT

Biotechnology has been spread by all branches of aquaculture, especially in the reverse sexual and masculinization of fish. The male of the species *Betta splendens* presents vibrant color in your body and fins larger than the females, these characteristics, sought by breeders ornamental. Studies aimed at masculinization, as well as techniques and protocols for the reversal of sexual beta through hormonal induction are of great applicability in ornamental aquaculture. The reversal occurred for a single bath of immersion with 500 μ g / L of the hormone 17 α - metiltestosterona (MT) during 24 hours in fish with 2, 4, 10, 30 to life, even in their eggs. Despite the sexual phenotypic proportion of 100% of males, the more young fish subjected to the treatment, the greater his mortality. Besides the growth of all fish processed have been significantly lower than the control. Masculinization were used in concentrations of 10, 30 and 60 mg / kg of ration MT in adult females in the beta. At the end of 90 days, all females treated showed growth of the body and fins significantly larger than those of control, in addition to submitting male phenotypic characteristics, including about the reproductive behavior. The present study showed that instead of reverting sexual, the masculinization of adult females of beta can be used by producers seeking to increase their profits.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2. ARTIGO 1.....	20
3. ARTIGO 2.....	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
4. REFERÊNCIAS.....	42
5. ANEXOS.....	45

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1.....25

ARTIGO 2

Tabela 1.....34

Tabela 2.....36

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1.....14

Figura 2.....14

Figura 3.....15

ARTIGO 1

Figura 1.....25

Figura 2.....26

ARTIGO 2

Figura 1.....35

Figura 2.....36

INTRODUÇÃO

Na aqüicultura os principais interesses para a produção de machos são variados de acordo com a espécie cultivada, estando relacionado com as características ornamentais (GEORGE e PANDIAN, 1995), maiores taxas de crescimento e controle da maturidade sexual (HENDRY, et. al., 2003). Embora o sexo genotípico seja estabelecido no momento da fertilização do óvulo pelo espermatozóide, a diferenciação do sexo fenotípico ocorre em etapas posteriores do desenvolvimento (PANDIAN, et al., 1994).

A gonadogênese em peixes pode ser um processo muito complexo e maleável. Embora a determinação sexual esteja sobre controle genético, a diferenciação das gônadas em peixes também depende de sinais endócrinos (ANDERSEN, et al., 2003). Substâncias indutoras e hormônios foram postuladas como controladoras da iniciação do crescimento cortical no momento de diferenciação, pois a gônada inicial possui caráter bipotencial de formação dos dois sexos (LOWE e LARKIN, 1975). A diferenciação sexual das gônadas é bastante lábil nos primeiros dias de vida e a inversão sexual¹ pode ser facilmente obtida através do fornecimento de estrógenos ou andrógenos (PANDIAN e SHEELA, 1995).

A indução hormonal para a inversão sexual é possível em 47 espécies (15 famílias) de gonocoristas (34 espécies, 9 famílias) e hermafroditas, usando um dos 31 (16 andrógenos, 15 estrógenos) esteróides (PANDIAN e SHEELA, 1995). O controle sexual é tipicamente realizado por exposição do peixe indiferenciado sexualmente a esteróides exógenos. Esses tratamentos podem durar dias, meses ou anos, e os resíduos de esteróides desaparecem em menos de um mês após o fim do tratamento (PIFERRER, 2001).

O hormônio esteróide 17 α -metiltestosterona (MT) tem sido comumente usado em estudos para masculinização² e inversão sexual em camarões como o gigante da Malásia, *Macrobrachium rosenbergii*, (BAGHEL, LAKRA e RAO, 2004), peixes de corte como a tilápia, *Oreochromis niloticus*, (ABUCAY e MAIR, 1997; WASSERMANN e AFONSO, 2003), Truta, *Salmo gairdneri*, (SCHMELZING e GALL, 1991) e peixes ornamentais como o guppy, *Poecilia reticulata*, (LOW, et. al., 1994; TURAN, et. al., 2005), Molinésia preta, *Poecilia sphenops*, (GEORGE e PANDIAN, 1998), Bluegill, *Lepomis macrochirus*, (ARSLAN e PHELPS, 2003) e beta, *Betta splendens*, (KAVUMPURATH e PANDIAN, 1993; KIRANKUMAR e JEGAJOTHIVEL, 2002).

O peixe de briga *Betta splendens*, pertence à família Osphronemidae, nativo do sudeste da Ásia onde habita águas rasas e com vegetação densa em plantações de arroz (Fishbase. 2007). Segundo Jaroensutasinee e Jaroensutasinee (2001), o beta selvagem é pequeno, imperceptível e com cores que variam entre marrom e verde. Diferente do beta selvagem, o domesticado apresenta diversas variedades e cores, com porte maior e apreciado comercialmente na aquicultura ornamental (MILLS, 1997).

Estudos visando a masculinização e inversão sexual através de indução hormonal, são de grande aplicabilidade na aquicultura ornamental. O presente trabalho, portanto, investigou o uso do hormônio (MT) na inversão sexual e masculinização de beta, bem como técnicas e protocolos que podem possibilitar aumento de lucros para os piscicultores ornamentais de todo o mundo.

²O termo masculinização é usado para designar apenas as características secundárias masculinas e não a inversão sexual.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. AQUICULTURA ORNAMENTAL

1.1. Histórico da aquicultura ornamental

A vida aquática sempre fascinou o homem, que se aprofundou na arte do mergulho para desvendar os segredos e participar, mesmo que por pouco tempo, da harmonia das inúmeras espécies que representam um espetáculo de cores. Mas, como nem todos podem gozar dos privilégios do mergulho, o homem criou a aquariofilia (LOURENZI, 2003).

O cultivo de peixes ornamentais é uma prática antiga e o chinês Chang Chi'En-Tê, que em 1596 escreveu “O livro dos peixes vermelhos”, é tido como o pai da aquariofilia. Entretanto os maiores estudos feitos com peixes ornamentais devem-se a William Innes e foram realizados no início do século XX, Innes é por isso considerado o maior aquariólogo que o mundo já conheceu.

Além de desempenhar um importante papel na educação juvenil, servindo como laboratório de ciências naturais, e na psicoterapia, onde atuam como um tipo de calmante, a aquicultura ornamental é de grande importância comercial nos países onde o comércio de peixes, aquários e materiais correlatos é intensamente praticado atingindo cifras de milhões de dólares (BOTELHO e ARAUJO, 1984; VIDAL JR., 2002).

1.2. Aspecto comercial da aquicultura ornamental

O comércio de peixes ornamentais no mundo propicia o sustento de milhões de pessoas, tanto no mundo industrializado ocidental como também em países tropicais em desenvolvimento (LIMA, BERNARDINO e PROENÇA, 2001). Países que investiram no

desenvolvimento da piscicultura ornamental através de grandes investimentos do governo em projetos de extensão universitária, obtiveram êxito, pois repassavam a tecnologia e manejo adequado aos produtores.

Cingapura, na Ásia, exporta mais de 57 milhões de dólares em peixes ornamentais para a Europa e os Estados Unidos, o que representa cerca de 30% do comércio mundial. Uma parte significativa desta produção é formada por espécies nativas do Brasil que tiveram, infelizmente para nós, sua tecnologia de produção desenvolvida no exterior (VIDAL JR., 2002).

O Brasil integra o comércio mundial de peixes ornamentais movimentando aproximadamente US\$ 3 milhões vindos do cultivo e da captura em rios, lagoas e oceanos (LIMA, BERNARDINO e PROENÇA, 2001). Embora o maior criatório de peixes ornamentais ainda seja o ambiente natural, a oferta desses peixes, oriundos de piscicultores particulares, já é bastante significativa no mercado nacional e internacional, com sinalização para maiores investimentos (SCOOT, 1991).

O número de agricultores brasileiros interessados em fazer nas suas terras, o cultivo de peixes ornamentais vem crescendo continuamente, já que os custos de investimento são relativamente pequenos e a procura desses peixes é grande, desta forma o cultivo de peixes ornamentais torna-se uma boa alternativa econômica.

2. O PEIXE *Betta splendens*

2.1. Biologia da espécie

O beta, conhecido como peixe de briga devido a grande agressividade entre os machos, pertence ao gênero *Betta* (Figura 3) da família Osphronemidae (Fishbase. 2007) ou seja, são peixes pulmonados. Ocorre na península da Malásia e Tailândia vivendo em pântanos, charcos tropicais e arrozais, que contêm grandes quantidades de vegetação em decomposição.

Esses peixes suportam baixos índices de oxigênio dissolvido, pois apresentam um mecanismo de respiração especial para utilização do ar atmosférico (SCHIMDT-NIELSEN, 2002). O órgão responsável pelas trocas gasosas diretamente com o ar atmosférico se chama labirinto, formado quando o peixe está com aproximadamente 20 dias de vida e permite que o animal sobreviva em águas com baixo ou nenhum teor de oxigênio dissolvido, facilitando seu cultivo (VIDAL JR., 2004).

Esses peixes preferem temperaturas entre 25 e 30° C e pH de 6,6 a 7,2 podendo chegar até os dois anos de vida e tamanhos que variam entre 4 a 10 cm (Fishbase. 2007). São peixes territoriais com característica agressivas, sobretudo entre os machos que podem lutar até a morte. Com outra espécie, porém, este peixe pode se tornar tímido e dificilmente o agride. De acordo com Damázio (1991), a anatomia e o dimorfismo sexual no peixe beta se dá pelas seguintes características:

- A espécie caracterizada por reprodução ovípara, apresenta a nadadeira dorsal com I acúleo e 8 a 9 raios e a anal, II - IV acúleos e 21 a 24 raios.
- A linha lateral é constituída de 30 à 32 escamas e o cuidado parental é feito pelo macho, que fica encarregado desde a formação do ninho reprodutivo até os três primeiros dias de vida dos alevinos.
- Os machos possuem coloração mais vistosa e colorida com nadadeiras maiores (Figura 1).



Figura 1. Machos adultos de *Betta splendens*.

- As fêmeas são menores e apresentam nadadeiras pequenas e quase sem coloração, sendo mais evidente uma faixa transversal acentuada (Figura 2).



Figura 2. Fêmeas adultas de *Betta splendens*.

2.2. Classificação

Classe Osteichthyes

Subclasse Actinopterygii

Superordem Teleostei

Ordem Peciliformes

Subordem Anabantoidei

Família Osphronemidae

Subfamília Macropodinae

Gênero *Betta*

Espécie *Betta splendens*. Regan, 1909. (Fishbase. 2007)



Figura 3. Algumas espécies do gênero *Betta*. A) *Betta akarensis* B) *Betta fusca* C) *Betta macrostoma* D) *Betta taeniata*.

2.2. Importância econômica da espécie

Esses peixes apresentam excelentes valores comerciais sendo normalmente comercializados em casal, onde o macho é quem determina o valor devido aos aspectos sexuais secundários, que pode variar de R\$1,00 a 10,00/casal no atacado. Segundo Nascimento (2003) um pequeno produtor de betas de Pernambuco chega a produzir cinco mil betas por mês, tendo um lucro mensal de R\$ 3.000,00.

3. FISIOLOGIA DA DETERMINAÇÃO DO SEXO

Na aquicultura os principais interesses para produção de machos são variados, de acordo com a espécie cultivada, estando relacionado às características ornamentais (GEORGE e PANDIAN, 1995), maiores taxas de crescimento e controle da maturidade sexual (HENDRY et. al., 2003).

As técnicas que visam à inversão sexual têm por objetivo o aparecimento de caracteres inerentes a um dos sexos, para a obtenção de fatores que otimizem a produção: como atingir um maior tamanho e peso, diminuição do tempo para atingir tamanho comercial, proteção contra o excesso de prolificidade, ou a obtenção de aspectos estéticos mais valorizado comercialmente, como é o caso da inversão sexual em peixes ornamentais (LEITE e MENDES, 1999).

Embora o sexo genotípico seja estabelecido no momento da fertilização do óvulo pelo espermatozóide, a diferenciação do sexo fenotípico ocorre em etapas posteriores do desenvolvimento (TABATA, 2004). O sexo fisiológico dos peixes é determinado na ontogênese por processo bioquímico controlado geneticamente e depende do tipo primário de gônada, ou seja, do sexo gonadal.

Os indivíduos são classificados em dois grupos quanto aos mecanismos controladores e determinantes do sexo: hermafroditas e gonocoristas. Neste trabalho nos interessa os gonocoristas, aqueles onde os testículos ou ovários são separados e formam a gônada de um peixe.

O gonocorismo pode ser diferenciado ou indiferenciado. Nos peixes gonocorísticos indiferenciados as gônadas desenvolvem-se primeiro como estrutura semelhante a dos ovários, depois metade dos indivíduos desenvolve-se em machos e a outra metade em fêmeas. Nas espécies diferenciadas as gônadas desenvolvem-se diretamente em ovários ou testículos (YAMAZAKI, 1983).

Na maioria dos vertebrados, a diferenciação sexual começa com uma gônada indiferente que consiste de um córtex e medula. Se a diferenciação ocorrer na direção do macho, há uma proliferação da medula e uma diminuição do córtex. Esse não é o caso em *Betta splendens* ou em teleósteos como um todo. Nesse peixe, um único primórdio celular cresce do epitélio peritoneal que corresponde unicamente ao córtex dos outros vertebrados (ARTZ, 1964).

Substâncias indutoras e hormônios foram postuladas como controladoras da iniciação do crescimento cortical no momento de diferenciação, pois a gônada inicial possui caráter bipotencial de formação dos dois sexos (LOWE e LARKIN, 1975). A diferenciação sexual das gônadas é bastante lábil nos primeiros dias de vida e a inversão sexual pode ser facilmente obtida através do fornecimento de estrógenos ou andrógenos na alimentação.

4. O HORMÔNIO NA INVERSÃO DE SEXO

Os esteróides mais usados atualmente para a inversão sexual em peixes são o estrógeno natural 17 β -estradiol (E2) e o andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona (MT) (PANDIAN e SHEELA, 1995). Entretanto, como o MT é naturalmente convertido em E2 via aromatase (BAROILLER, et. al., 1999).

Segundo Carvalho (1985) a indução à mudança de sexo em peixes com uso de diferentes tipos de hormônios esteróides, vêm sendo pesquisada há várias décadas. O hormônio 17 alfa-metiltestosterona têm sido utilizado com excelentes resultados no processo da indução da reversão de sexo masculinizante em *Tilapia áurea*, (GUERRERO III, 1975) e em *Sarotherodon niloticus*, (TAYAMEN e SHELTON, 1978). Esses pesquisadores, usando

doses de 30 ou 60 mg do hormônio 17 alfa-metiltestosterona por Kg de ração, num período de 18 à 59 dias de tratamento, obtiveram linhagens com mais de 98% de machos nessas espécies.

Nakamura e Iwahashi (1982), demonstraram a importância da idade das larvas (que está relacionada com o tamanho) para o início do tratamento hormonal. Testando a metiltestosterona entre 12h de nascidos até 10 dias de vida, durante 30 dias de tratamento, nas doses de 50 e 100 mg/Kg de ração em larvas de *Tilapia nilotica*, demonstrando que os tratamentos iniciados entre 5 a 10 dias de vida continham indivíduos machos, fêmeas e intersexos e que os tratamentos iniciados com alevinos de 12h de nascidos resultaram em 100% de indivíduos machos.

O hormônio masculinizante 17 α -metiltestosterona, é usado freqüentemente em pesquisas com peixes ornamentais, com o intuito de estimular o aparecimento das características sexuais secundárias, já que estas características darão o valor comercial do peixe. Leite e Mendes (1999) testaram a viabilidade da inversão sexual na criação de Guppy, *Poecilia reticulata* e Arslan e Phelps (2003) observaram a masculinização do peixe Bluegill *Lepomis macrochirus* com o uso do hormônio 17 alfa-metiltestosterona, sendo buscado nesses peixes ornamentais as características secundárias masculinas.

A forma de inoculação do hormônio no peixe pode ser feita geralmente por duas formas: a primeira e mais prática e feita através da mistura do hormônio com a ração, calculando a concentração pelo peso, sendo o hormônio absorvido no trato digestório do peixe. A segunda forma, que requer um pouco mais de trabalho, é a imersão do peixe em água contendo o hormônio, já que a substância será absorvida pelas brânquias.

De qualquer forma a concentração do hormônio, seja na ração ou na água, é a chave para a diferenciação do sexo nos peixes. Tabata (2004) afirma que para a masculinização de fêmeas de truta, doses de até 0,5 mg/Kg de hormônio na ração é eficaz sendo fornecida durante 60 dias. Cunha *et. al.* (2003), assim como Leite e Mendes (1999) usaram doses de 20 mg/Kg em Guppy *Poecilia reticulata* por um período de 30 dias e conseguiram a reversão de 100% dos peixes.

O tempo de duração do tratamento hormonal também influi bastante na frequência de reversão. Shelton *et al.* (1981) afirmaram que a duração do tratamento e a idade das larvas são fatores mais críticos para o sucesso da inversão, além daqueles que afetam diretamente o crescimento (como a densidade e a temperatura).

Revista: Aquaculture Research

Titulo: Influência da idade do alevino na reversão sexual do *Betta splendens* regan, 1909 por imersão hormonal.

Title: Induction of masculinization in Siamese fighting fish by hormonal immersion with emphasis on labile period to sex reversal

Fernando Jun-ho Peixoto Kim¹, Athiê Jorge Guerrea Santos², Anita Rademaker Valença, George Nilson Mendes.

Institution: Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Andress: Universidade Federal Rural de PernambucoR. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos 52171-900 - Recife/PE - F: (81) 3320.6011 E-mail: reitoria@reitoria.ufrpe.br

Author: Fernando Jun-ho Peixoto Kim

Address: Rua: Romeu Jacobina, nº146, Ouro preto, Olinda – Pernambuco, Brazil. CEP: 53370-800

Telephone: (55)81-3494-0104

e-mail address: Fernando_kim@hotmail.com

Suggested running title: Sex reversal of *Betta splendens* by 17 α -methyltestosterone hormonal immersion, with special reference to labile period to sex reversal.

Indexing purposes: *Betta splendens*, Sex reversal, Testosterone, hormonal immersion

RESUMO

Atualmente a biotecnologia tem se espalhado por todos os ramos da aquicultura, especialmente no que se refere às técnicas de reversão sexual. O macho da espécie *Betta splendens* apresenta coloração vibrante, corpo e nadadeiras maiores em relação às fêmeas, o que o torna tão procurado no comércio de peixes ornamentais. No presente trabalho, foram submetidos a imersão com 500 µg/L do hormônio 17 α-metiltestosterona (MT) durante 24h, betas com 2, 4, 10, 30 dias pós eclosão e ovos, num total de 150 peixes por tratamento inclusive o controle. Ao final do experimento os peixes em cada tratamento foram separados, pesados, medidos quanto ao comprimento total, determinados sexualmente através dos caracteres secundários externos e determinada a sobrevivência final. Foi atingida uma proporção de 100% de machos nos tratamentos hormonais, de acordo com os caracteres secundários fenotípicos. Os peixes tratados com hormônio apresentaram baixo peso e pequeno comprimento total. A sobrevivência foi considerada baixa para os peixes tratados com hormônio. O valor aproximado da idade inicial que poderia produzir indivíduos machos com maior peso e comprimento total seria de 19 dias de vida segundo os modelos: $\text{Peso} = 1.3389 + 0.0625*x - 0.0016*x^2$ $R^2 = 67.38\%$ e $\text{Comprimento total} = 4.2647 + 0.1343*x - 0.0035*x^2$ $R^2 = 40,50\%$

INTRODUÇÃO

Atualmente a biotecnologia tem se espalhado por todos os ramos da aquicultura, especialmente no que se refere a reprodução de peixes e manipulação de suas proles. A indução hormonal para a inversão sexual tem servido como uma valiosa ferramenta para o entendimento do processo de diferenciação sexual, bem como para a produção de populações monosexuais para a indústria aquicultora (Pandian & Sheela, 1995).

A produção de proles monosexuais de peixes tem sido aplicada pela diferenciação gonadal em alevinos por administração de esteróides exógenos (Arslan & Phelps, 2003). Essa administração de esteróides atualmente se faz na maioria dos casos por inoculação do hormônio na ração (George & Pandian, 1998; Hendry, Martin-Robichaud & Benfey 2003; Arslan & Phelps, 2003), banhos de imersão em água com hormônio diluído (Andersen, et. al. 2003; Wassermann & Afonso 2003; Iwamatsu, et. al. 2006) e em alguns casos por implantes contendo doses hormonais (Benton & Berlinsky, 2006)

A busca na produção de proles monosexuais depende principalmente da espécie de peixe cultivada, devido aos atrativos comerciais que ela oferece: podendo ser pelo consumo da carne ou apenas ornamentação em aquários. Muitas espécies de peixes ornamentais exibem um dimorfismo sexual e na maioria dos casos o macho possui coloração mais evidente no corpo, e tipicamente maior desenvolvimento nas nadadeiras, o que os tornam mais preferidos sobre as fêmeas pelos compradores (Piferrer, 2001).

O *Betta splendens* pertence a família Osphronemidae e são peixes territoriais com característica agressivas, sobretudo entre os machos que podem lutar até a morte. Mas, com outra espécie este peixe pode se tornar tímido e dificilmente o agride (Fishbase, 2007). Nas variedades domésticas, o macho apresenta coloração vibrante e seu corpo e nadadeiras são maiores em relação as fêmeas, o que o torna tão procurado no comércio de peixes ornamentais.

Pesquisas na tentativa de inversão sexual do *Betta splendens* foram feitas com empenho por Kavumpurath & Pandian, 1993 e Kirankumar & Pandian 2002, mas obtiveram influência negativa dos tratamentos hormonais principalmente no crescimento dos peixes. O hormônio masculinizante 17 α -metiltestosterona têm sido utilizado no processo da indução a inversão sexual em peixes ornamentais, mas no caso do beta, não se atingiu ainda técnicas para a produção de lotes 100% masculinos.

Estudos visando à inversão sexual através de indução hormonal, são de grande aplicabilidade na aqüicultura ornamental. O presente trabalho, portanto, investigou a influência da idade inicial de tratamento do beta sobre a inversão, com o uso do hormônio (MT).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Aqüicultura da UFPE. Os tratamentos hormonais consistiram de somente um banho por imersão durante 24h, com água na concentração de 500 μ g/L (Pandian & Sheela, 1995; Kirankumar & Pandian, 2002) de 17 α -metiltestosterona (MT). A preparação da solução hormonal seguiu metodologia descrita por Kirankumar & Pandian (2002).

Para a reprodução do *B. splendens*, foi usada a técnica adaptada descrita por Jaroensutasinee & Jaroensutasinee (2003). Os alevinos foram alimentados *ad libitum* 2 vezes por dia com náuplios de artêmia. até 30 dias de vida e depois com ração comercial. O tratamento hormonal foi feito transferindo os alevinos para aquários de 1L contendo água com MT.

Cinco tratamentos, cada um de proles diferentes, foram utilizados, de acordo com a idade dos peixes: ovos fertilizados (0 dia de vida) larvas (2 dias de vida) e pós-larvas com 4, 10 e

30 dias de vida pós-eclosão. Houve um grupo não tratado mantido como controle. foram usadas 3 réplicas e 150 peixes por tratamento, inclusive o controle.

Até o 30° dia de vida, os peixes foram mantidos em aquários de vidro de 30x15x20 e capacidade 9L sem aeração e nenhum filtro, com trocas parciais de água a cada 2 dias. Após o 30° dia os peixes foram transferidos para tanques de alvenaria com capacidade de 3000L e cultivados até 140 dias de vida (Bustamante & Salas, 2002). Os parâmetros hidrológicos foram monitorados e medidos quanto à temperatura e concentrações de amônia e pH.

Ao final do experimento, os peixes em cada tratamento foram separados, pesados, medidos quanto ao comprimento total, determinados sexualmente através dos caracteres secundários externos (Snekser, et. al.,2006) e determinada a sobrevivência final.

Para análise estatística dos dados e comparação das médias de peso e comprimento foi utilizado o teste não paramétrico KRUSKAL-WALLIS devido a não normalidade dos dados, e para a proporção sexual o teste de χ^2 ambos com $\alpha = 5\%$ (Calegari-Jacques, 2004).

RESULTADOS

Os parâmetros hidrológicos apresentaram-se estáveis e ideais para o cultivo do beta durante o tratamento hormonal com temperatura média de $28\pm 1,5^\circ\text{C}$. Os machos do tratamento controle foram significativamente maiores que os machos revertidos de todos os tratamentos hormonais quanto ao peso e ao comprimento total, ao final de 140 dias de vida (Tabela 1).

Todos os peixes tratados com hormônio apresentaram baixo peso e pequeno comprimento total quando comparados aos machos do tratamento controle. Apesar disso,

entre os tratamentos hormonais, os que obtiveram maior média de peso e comprimento total foram os peixes tratados por imersão aos 10° e 30° dia de vida (Tabela 1).

Tabela 01. Resultados da Sobrevivência e Médias de peso, comprimento total, com seus respectivos erros padrões, ao final dos tratamentos.

	Controle (machos)	Início do tratamento em dias				
		0	2	4	10	30
Peso (g) ¹	2.31±0.04 ^a	1.3±0.02 ^b	1.45±0.02 ^b	1.64±0.01 ^c	1.76±0.01 ^d	1.76±0.01 ^d
Comprimento total (cm) ¹	6.47±0.07 ^a	4.1±0.05 ^b	4.66±0.03 ^c	4.94±0.03 ^d	5.12±0.04 ^d	5.17±0.04 ^d
Sobrevivência (%) ²	73.3 ^a	48 ^b	50.7 ^b	54.7 ^b	58 ^b	74 ^a
Proporção de machos (%) ²	38.18 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^b

1- Letras diferentes diferem significativamente entre as médias de cada parâmetro, segundo o teste Kruskal-wallis, $\alpha=5\%$.

2- Letras diferentes diferem significativamente entre as proporções observadas de cada parâmetro segundo o teste de X^2 $\alpha=5\%$.

A sobrevivência foi significativamente menos para os peixes tratados com hormônio com exceção dos peixes com idade de 30 dias de vida, submetidos ao banho hormonal. O gráfico da Figura 1, mostra o aumento da sobrevivência em relação ao aumento da idade inicial de tratamento hormonal.

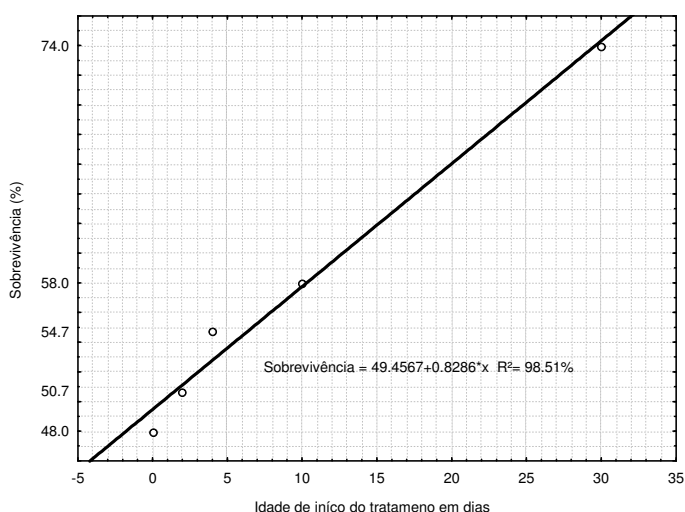


Figura 1. Regressão linear da sobrevivência em relação a idade de início do tratamento hormonal.

Foi atingida uma proporção de 100% de machos nos tratamentos hormonais, de acordo com os caracteres secundários fenotípicos apresentados pelos mesmos ao final de 140 dias de cultivo.

A regressão polinomial quadrática (Figura 2), demonstra a melhor idade para início do tratamento hormonal com a concentração usada nesse estudo. Através do uso da derivação mediante o modelo da regressão para o peso e comprimento total, a melhor idade de início de tratamento seria de aproximadamente 19 dias de vida.

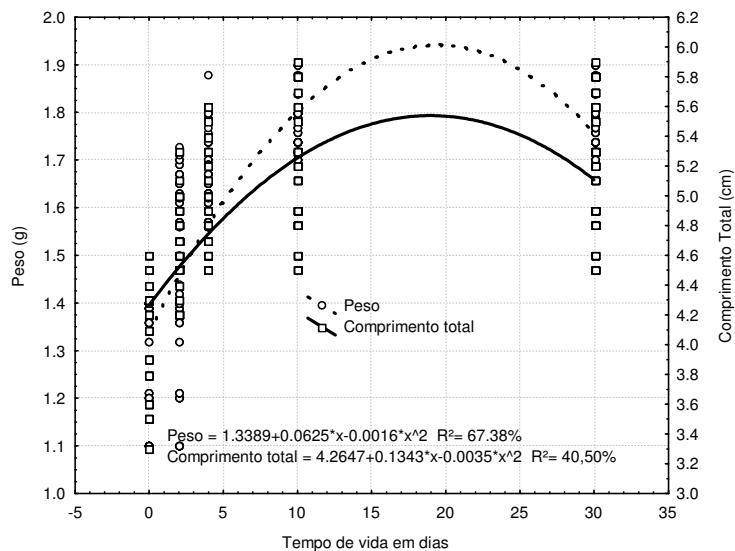


Figura 2. Regressão polinomial quadrática do crescimento em relação ao peso e comprimento total sobre a idade inicial de tratamento.

DISCUSSÃO

Em estudos de Kirankumar & Pandian (2002), Betas tratadas com doses de 500 a 1000 $\mu\text{g/L}$ de hormônio MT com discretas imersões de 3h de duração no segundo, quinto e oitavo dia, apresentaram atrofiamento no seu crescimento. George & Pandian, (1998) observaram em *Poecilia sphenops* a diminuição do peso corporal em relação ao aumento da concentração de MT administrada através da ração.

Em nosso estudo, peixes tratados com 500 µg/L com um banho de 24h obtiveram influencia negativa em seu crescimento quando comparados ao controle, mas a atrofia foi mais evidente nos tratamentos com peixe de 0 e 2 dias de vida.

O uso de esteróides na indução da masculinização é um processo mais estressante que a feminização, o que evidencia a alta mortalidade da prole ou seu baixo crescimento (Pandian, Sheela & Kavumpurath, 1994). Kirankumar & Pandian (2002) observaram que o aumento da dosagem de MT diminui a sobrevivência final em *Betta splendens* e Kim, Nam & Jo (1997) relataram que o aumento das dosagens de MT e o tempo de tratamento, diminuem a sobrevivência em *Misgurnus mizolepis*. A idade inicial afetou a sobrevivência nos betas estudados, o que nos leva a crer que quanto mais novo o peixe submetido ao tratamento hormonal de imersão, menor será sua sobrevivência.

Em estudo de Andersen et. al. (2003); Wassermann & Afonso (2003) e Iwamatsu et. al. (2006), o calculo da concentração hormonal é baseado no volume de água e seu início e duração segue a teoria que, o principio fundamental no controle sexual em peixes é que o tratamento precisa começar antes da diferenciação sexual das gônadas (Yamamoto, 1969), simplesmente porque com a não diferenciação, o caráter sexual bipotencial pode ser explorado com o uso de terapia hormonal.

Kavumpurath & Pandian, (1993) administrando hormônio através da ração, conseguiram a masculinização de indivíduos com 45 dias de vida. Apesar do uso de concentração constante neste trabalho, as diferentes idades para início do tratamento foram postuladas como melhor forma de se achar o período de indiferenciação gonadal. No presente trabalho, todos os tratamentos hormonais apresentaram proles com 100% de machos, o que nos leva a crer que até o 30º dia de vida, as gônadas em *Betta splendens* estejam ainda indiferenciadas.

Fatores como o tipo de esteróide usado, sua dosagem, forma de inoculação, o tempo de começo e término do tratamento (Piferrer, 2001) e a temperatura (Karayucel1, Ak & Karayucel1, 2005), são fundamentais para a reversão sexual. A maioria das técnicas não leva em conta a biomassa do peixe tratado e seu estado de desenvolvimento fisiológico interno. A concentração de hormônio está diretamente ligada a idade inicial de tratamento não só pelo caráter gonadal indiferenciado, mas também pela biomassa apresentada pelas larvas e pós-larvas e seu desenvolvimento fisiológico interno.

Por se tratar de um peixe de porte pequeno e ovulíparo, hormônios esteróides podem promover uma alta mortalidade e ou influenciar negativamente o crescimento do beta quando administrados a indivíduos com idades inferiores à 30 dias. O valor aproximado da idade inicial para o tratamento com 500 µg/L e banho de MT de 24h, que poderia produzir indivíduos machos com maior peso e comprimento total, seria de 19 dias de vida. Contudo, Lowe e Larkin (1975) evidenciaram o caráter bipotencial das gônadas de fêmeas de betas adultas. Possivelmente a reversão sexual do beta poderia ser aplicada em indivíduos mais velhos, não usando banhos discretos, e sim uma administração contínua dos hormônios para os peixes por mais tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, A., Norrgren, L & Petersen, G. I. (2003) Effects of exposure to 17 a-ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **134**, Part C, 365- 374.

Arlan, T. & Phelps, R. P. (2003) Masculinization of bluegill *Lepomis macrochirus* by multiple androgen immersion and effect of percutaneous permeation enhancers. *Journal of the World Aquaculture Society* **34**, n. 3, 403-411.

Ayres, M., Ayres Jr., Ayres, D.L. & Santos, A. S. (2003) Bioestat. Versão 3.0, Sociedade Civil, Marnirauá, MCT-CNPQ, Belém, Para, Brasil.

Benton, C. B., Berlinsky, D. L. (2006) Induced sex change in black sea bass. *Journal of Fish Biology* **69**, 1491- 1503.

Bustamante, H. R. & Salas, A. A. O. (2002) Initial sexual maturity and fecundity of two anabantids under laboratory conditions. *North American Journal of Aquaculture* **64**, n. 1, 224-227.

Calegari-Jacques, S. M. (2004) Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 255 p.

Fishbase. Consultado dia 23/05/2007 às 17:30.

<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=4768&genusname=Betta&speciesname=splendens>

George, T. & Pandian, T. J. (1998) Dietary administration of androgens induces sterility in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops* (Cuvier & Valenciennes, 1846). *Aquaculture Research* **29**, 167- 175.

Hendry, C. I., Martin-Robichaud, D. J. & Benfey, T. J. (2003) Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **219**, 769- 781.

Iwamatsu, T., Kobayashi, H., Sagegami, R., Shuo, Takuya. (2006) Testosterone content of developing eggs and sex reversal in the medaka (*Oryzias latipes*). *General and Comparative Endocrinology* **145**, 67- 74.

Jaroensutasinee, M. & Jaroensutasine, K. (2003) Type of intruder and reproductive phase influence male territorial defence in wild-caught Siamese fighting fish. *Behavioural Processes* **64**, 23 – 29.

Karayucel1, I., Ak, O. & Karayucel1, S. (2005) Effect of temperature on sex ratio in guppy *Poecilia reticulata* (Peters 1860). *Aquaculture Research* **41**, 1-12

Kavumpurath, S. & Pandian ,T. J. (1993) Determination of labile period and critical dose for sex reversal by oral administration of estrogens in *Betta splendens*. *Indian Journal of Experimental Biology* **31**, 16 - 20.

Kim D.S., NamY.K. & Jo J.Y. (1997) Effect of 17 beta-estradiol immersion treatments of sex reversal of mud loach. In: *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture Research* **28**, 941- 946.

Kirankumar, S. & Pandian ,T. J. (2002) Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. *Journal of Experimental Zoology* **293**, 606 - 616.

Lowe, T. P. & Larkin, J. R. (1975) Sex reversal in *Betta splendens* Regan with emphasis on the problem of sex determination. *Journal of Experimental Zoology* **191**, n. 1, 25- 32.

Pandian, T. J., Sheela, S. G. & Kavumpurath, S. (1994) Endocrine sex reversal in fishes: Masculinization evokes greater stress and mortality. Research Communications. *Current Science* **66**, n. 3, 240- 243.

Pandian, T.J. & Sheela, S.G. (1995) Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* **138**, 1- 22.

Piferrer, F. (2001) Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* **197**, 229 - 281.

Snekser, J. L., McRobert, S. P. & Clotfelter, E. D. (2006) Social partner preferences of male and female fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes* **72**, 38 - 41.

Wassermann, G. J. & Afonso, L. O. B. (2003) Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research* **34**, 65 - 71.

Yamamoto, T., (1969) Sex differentiation. In: *Fish Physiology*. (by W.S. Hoar & D.J. Randall) Vol. III, New York: Academic Press, pp. 117-175.

Revista: Aquaculture Research

Título: Efeito do hormônio 17 α -metiltestosterona em fêmeas adultas de *Betta splendens* Regan, 1909.

Title: running title: Growth and reproductive behavior responses in Siamese fighting fish adult female treat with 17 α -methiltestosterone.

Fernando Jun-ho Peixoto Kim¹, Athiê Jorge Guerrea Santos²,

Institution: Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Andress: Universidade Federal Rural de Pernambuco R. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos 52171-900 - Recife/PE - F: (81) 3320.6011 E-mail: reitoria@reitoria.ufrpe.br

Author: Fernando Jun-ho Peixoto Kim

Address: Rua: Romeu Jacobina, nº146, Ouro preto, Olinda – Pernambuco, Brazil. CEP: 53370-800

Telephone: (55)81-3494-0104

e-mail address: Fernando_kim@hotmail.com

Suggested title: Efects of 17 α -methiltestosterone on adult female of Siamese fighting fish.

Indexing purposes: *Betta splendens*, Hormonal masculinization, Growth, methiltestosterone.

RESUMO

Os motivos para o controle sexual em peixes são diferenças de crescimento entre os sexos, controle de população e características ornamentais. O uso de hormônios andrógenos e seus efeitos em fêmeas de *Betta splendens* adultas ainda são desconhecidos. Três concentrações de 17 α -metiltestosterona (MT) foram usadas (10, 30 e 60mg/Kg), administradas na alimentação de fêmeas durante 90 dias. Os parâmetros analisados foram: peso, comprimento total e comprimento das nadadeiras caudal, dorsal, ventral e anal. Para a análise comportamental foram observados o número de aberturas do opérculo, mordidas, perseguições e rabadas que os machos do tratamento controle e fêmeas tratadas com hormônio faziam sobre as fêmeas. Todos os tratamentos hormonais apresentaram médias iguais entre si e diferentes significativamente maiores para os parâmetros observados de crescimento, em relação ao controle. Não houve diferenças significativas entre as sobrevivências. A comparação entre as regressões demonstrou o melhor crescimento para o tratamento de 30mg/Kg. Quanto aos parâmetros comportamentais, a abertura de opérculo e a perseguição não apresentaram diferenças. Para os produtores de beta, essa técnica pode ser utilizada ao invés da reversão.

INTRODUÇÃO

No mundo, as técnicas de produção de proles monosexuais de peixes, através do uso de hormônios, é bastante difundida. Os motivos para o controle sexual em peixes são principalmente: diferenças de crescimento entre os sexos, controle de população (Schmelzing e Gall., 1991; Abucay e Mair,1997; Wassermann e Afonso 2003) e características ornamentais (Low, et. al., 1994; Arlan e Phelps, 2003; Turan, Çek e Atik, 2005).

O controle sexual é tipicamente realizado por exposição do peixe indiferenciado sexualmente a esteróides exógenos. Esses tratamentos duram dias, meses ou anos, e os resíduos de esteróides desaparecem em menos de um mês após o fim do tratamento (Piferrer, 2001).

Em alguns casos, o uso de esteróides na indução da masculinização é um processo mais estressante que a feminilização, o que evidencia a alta mortalidade da prole ou seu baixo crescimento (Pandian, Sheela e Kavumpurath, 1994). Para o peixe *Betta splendens*, a prática de técnicas de reversão sexual com uso de hormônios masculinizantes obteve baixos crescimentos, apesar de uma taxa de machos próxima de 100% (Pandian, Sheela e Kavumpurath, 1994; Kirankumar e Pandian, 2002).

As características mais procuradas no beta são seu comportamento pacífico com outras espécies de peixes e sua coloração. Nas variedades domésticas, o macho apresenta coloração vibrante e seu corpo e nadadeiras são maiores em relação as fêmeas. O uso do hormônio 17 α -

metiltestosterona (MT), tem ação anabólica e androgênica em peixes, porém, seus efeitos no crescimento e comportamento reprodutivo, em fêmeas de betas adultas ainda são desconhecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Aqüicultura da Universidade Federal de Pernambuco de maio a julho de 2007. Os exemplares fêmeas de *B. splendens* foram obtidos através de criador comercial, com idade em torno de 140 dias de vida.

Para analisar os efeitos do hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) em fêmeas de *B. splendens*, três concentrações foram usadas (10, 30 e 60 mg/Kg), administradas na alimentação dos peixes durante 90 dias, Havendo também um grupo não tratado mantido como controle. Foi utilizada ração comercial, com PB=55%, usando metodologia descrita Hendry, Martin-Robichaud e Benfey (2003) para diluição do hormônio na ração.

Cada tratamento foi composto por 30 réplicas, cada réplica era composta de uma fêmea, colocada separadamente em recipientes de plástico transparente com uso útil de 1.5L, para evitar brigas entre os peixes. A ração foi oferecida 3 vezes ao dia (10h, 12h, 14h) *ad libitum* e o fotoperíodo natural de (12C:12E). A cada 3 dias eram feitas a limpeza e troca total da água dos recipientes.

Realizou-se uma biometria inicial com a finalidade de homogeneizar os parâmetros iniciais quanto as diferenças significativas entre os tratamentos. Mais 3 biometrias realizadas a cada 30 dias até o final do experimento, totalizando de quatro biometrias. Os parâmetros analisados para determinação do crescimento foram: peso, comprimento total e comprimento das nadadeiras caudal, dorsal, ventral e anal.

Para a análise comportamental reprodutiva foram selecionados 10 indivíduos de cada tratamento hormonal, ao final dos 90 dias de tratamento, e colocados separadamente em aquários de vidro (30x15x20 e capacidade utilizada de 4L) sem aeração e filtro, segundo método descrito para reprodução da espécie por Jaroensutasinee e Jaroensutasinee (2003). Dez machos normais adultos foram usados como controle.

No mesmo dia, ao final da tarde, eram colocadas em cada aquário uma fêmea adulta normal separada do macho (tratamento controle) e uma fêmea masculinizada, separada da fêmea normal (tratamentos hormonais). As fêmeas foram separadas por divisórias transparentes, com finalidades de evitar brigas. Na manhã seguinte eram retiradas as divisórias e contados durante 15 minutos o número de aberturas do opérculo, mordidas, perseguições e rabadas que os machos normais e fêmeas masculinizadas, faziam sobre as fêmeas normais (Jaroensutasinee e Jaroensutasinee 2003). Levou-se em conta também a produção do ninho de bolhas e o sucesso na reprodução.

Para análise estatística dos dados foram utilizados os testes ANOVA complementado com teste de Tukey, ANCOVA e X^2 para sobrevivência e proporções observadas, todos com $\alpha = 5\%$. Para comparação do crescimento foi utilizada Regressão polinomial quadrática.

RESULTADOS

Ao final de 90 dias de cultivo, todos os tratamentos hormonais apresentaram médias diferentes significativamente maiores em relação ao tratamento controle, segundo o teste ANOVA, para os parâmetros de peso, comprimento total e comprimento de todas as nadadeiras (Tabela 1). Quanto a sobrevivência, não houve diferenças significativas entre todos os tratamentos de acordo com o teste de X^2 (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da Sobrevivência e Médias de peso, comprimento total e nadadeiras com seus respectivos erros padrões, ao final dos tratamentos.

Comprimento das

	Sobrevivência (%) ²	Peso (g)	Nadadeiras (cm)				
			Comprimento Total (cm)	Caudal	Dorsal	Ventral	Anal
Controle	96.67 ^a	1.72±0.04 ^{a1}	5.03±0.04 ^a	1.24±0.03 ^a	1.02±0.04 ^a	1.03±0.06 ^a	1.07±0.04 ^a
10mg/Kg	96.67 ^a	2.32±0.06 ^b	6.56±0.13 ^b	2.55±0.06 ^b	2.10±0.06 ^b	1.75±0.04 ^b	2.26±0.04 ^b
30mg/Kg	96.67 ^a	2.24±0.06 ^b	6.48±0.10 ^b	2.57±0.07 ^b	2.08±0.07 ^b	1.84±0.06 ^b	2.23±0.06 ^b
60mg/Kg	93.33 ^a	2.23±0.05 ^b	6.56±0.07 ^b	2.5±0.06 ^b	2.15±0.05 ^b	1.73±0.08 ^b	2.14±0.05 ^b

1- Letras diferentes diferem significativamente entre as médias de cada parâmetro segundo ANOVA, complementado com teste de Tukey $\alpha=5\%$.

2-Letras iguais não diferem significativamente entre as sobrevivências segundo o teste de X^2 $\alpha=5\%$.

As quatro biometrias foram usadas para a construção de regressões de crescimento de peso e comprimento total para todos os tratamentos. A comparação entre as regressões duas a duas (MENDES, 1999) foi feita a fim de evidenciar a que demonstrou o melhor crescimento, sendo a curva do tratamento de 30mg/Kg a que obteve melhores crescimentos de peso e comprimento total (Figura 1).

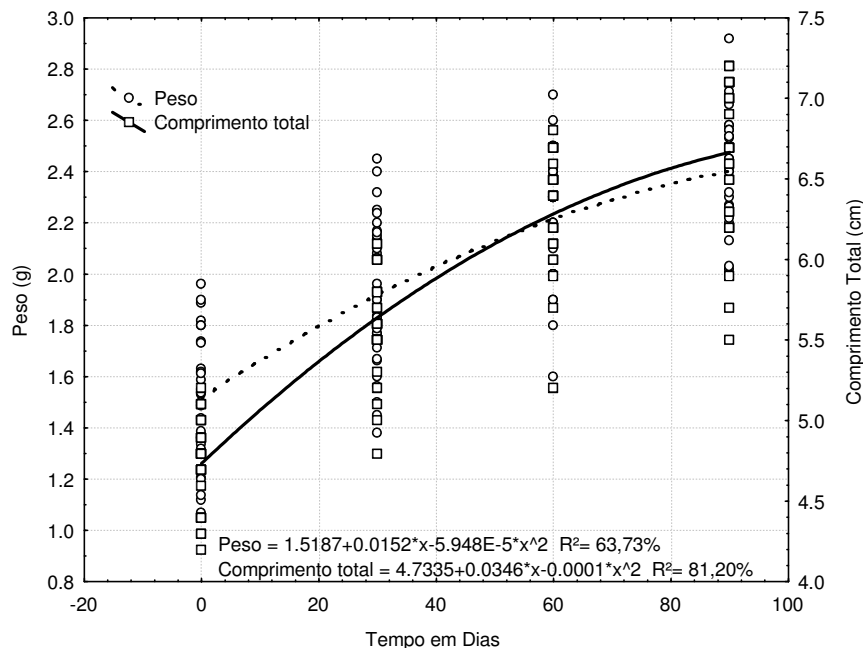


Figura 1. Regressões polinomiais quadrática do crescimento em relação ao peso e comprimento total do tratamento 30mg/Kg.

A curva da regressão polinomial quadrática da Figura 2, demonstra a melhor concentração de hormônio para se atingir maiores médias de peso e comprimento total. De

acordo com o cálculo de derivação do modelo estatístico, a melhor concentração de hormônio na ração para ambos os parâmetros, seria de aproximadamente 32 mg/Kg.

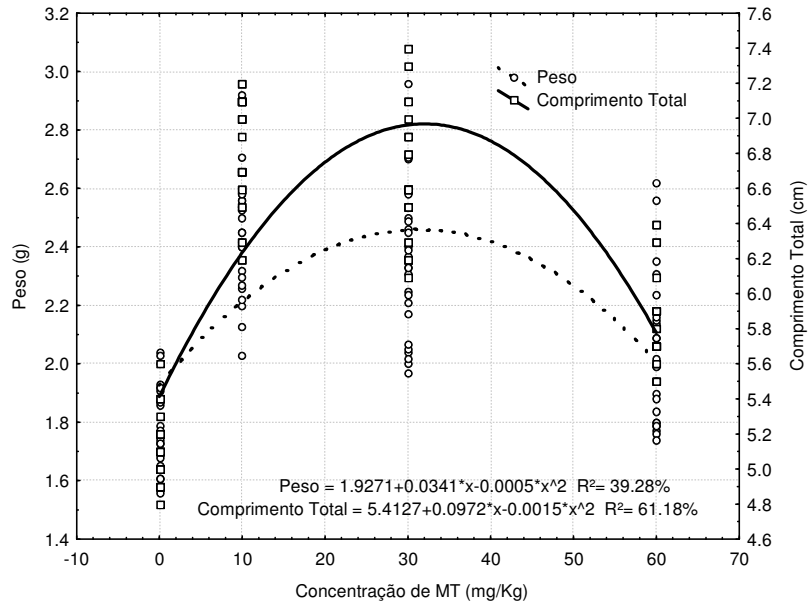


Figura 2. Regressão polinomial quadrática, para peso e comprimento total em relação a concentração de MT.

Quanto aos parâmetros comportamentais analisados, a abertura de opérculo e a perseguição, não apresentaram diferenças significativas entre todos os tratamentos segundo a ANOVA. Para mordidas o único tratamento diferente do controle foi o de 30mg/Kg e para a rabada, somente o tratamento de 60mg/Kg foi significativamente igual ao controle (Tabela 2).

A produção de ninho de bolhas não foi diferente significativamente entre o controle e o tratamento de 10mg/Kg e o sucesso na reprodução só foi atingido no tratamento controle, com a desova de 5 proles (Tabela 2), todos segundo o teste X^2 .

Tabela 2. Médias dos parâmetros comportamentais analisados e seus respectivos erros padrões.

	Abertura do Opérculo	Mordida	Rabada	Perseguição	Produção de Ninho ²	Sucesso na Reprodução ²
Controle	20.9 ±1.20 ^{a1}	7.3 ±0.82 ^a	6.3 ±0.92 ^a	13.8 ±2.10 ^a	10 ^a	5 ^a
10mg/Kg	21.9 ±3.91 ^a	3.3 ±0.90 ^{ab}	2.7 ±0.79 ^b	12.7 ±2.59 ^a	9 ^{ab}	0 ^b
30mg/Kg	19.1 ±2.61 ^a	3 ±0.98 ^b	2 ±0.65 ^b	11.3 ±2.33 ^a	4 ^c	0 ^b
60mg/Kg	23.9 ±4.97 ^a	5 ±1.58 ^{ab}	3.3 ±1.10 ^{ab}	13 ±3.93 ^a	7 ^{bc}	0 ^b

1- Letras diferentes diferem significativamente entre as médias de cada parâmetro segundo ANOVA, complementado com teste de Tukey $\alpha=5\%$.

2- Letras diferentes diferem significativamente entre as proporções observadas de cada parâmetro segundo o teste de X^2 $\alpha=5\%$.

Quanto aos parâmetros comportamentais observados, não houve diferenças significativas para a rabada e perseguição, somente o tratamento de 10mg/Kg foi igual significativamente ao controle para as mordidas e nenhum tratamento hormonal foi igual ao controle para a abertura de opérculo (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de variação para os parâmetros comportamentais.

	Abertura do			
	Opérculo	Mordida	Rabada	Perseguição
Controle	18.11% ^{a1}	35.4% ^a	46.16% ^a	48.16% ^a
10mg/Kg	56.52% ^b	85.77% ^{ab}	92.47% ^a	64.4% ^a
30mg/Kg	43.21% ^b	103.04% ^b	102.74% ^a	65.17% ^a
60mg/Kg	65.7% ^b	100.22% ^b	105.02% ^a	95.53% ^a

1- Letras diferentes diferem significativamente entre as covariâncias de cada parâmetro segundo ANCOVA $\alpha=5\%$.

DISCUSSÃO

Pesquisas com o peixe *Betta splendens* tem demonstrado os efeitos do hormônio metil-testosterona (MT) na produção de proles monossexuais masculinas, que em geral atingem taxas de reversão próximas a 100%, mas com influências negativas no crescimento e sobrevivência dos indivíduos (Kavumpurath e Pandian 1993; Kirankumar e Pandian 2002). A masculinização de fêmeas adultas no presente estudo demonstrou um alto grau de influência nas características sexuais secundárias, bom crescimento e baixa mortalidade.

Sabe-se que o hormônio testosterona pode aumentar o crescimento na maioria dos vertebrados, mas retarda o crescimento em outras (Cox e John-Alder 2005). Os parâmetros aqui observados tais como peso, comprimento total e comprimento das nadadeiras das fêmeas tratadas com o MT apresentaram-se maiores que as fêmeas do controle.

O anabolismo que a testosterona propicia é o estado diferenciado de acúmulo de nitrogênio, que pode estar associado a produção de proteínas (Kuhn 2002). Certamente, os efeitos androgênicos do hormônio MT possibilitaram um aumento do SSD (Sexual Size

Dimorphism) das fêmeas adultas tratadas, deixando as com fenótipos secundários masculinos bastante expressivos.

Altas doses de MT, porém, podem comprometer o crescimento e sobrevivência de peixes (Pandian, Sheela e Kavumpurath 1994; Pandian e Sheela 1995; Kirankumar e Pandian 2002). As regressões polinominais demonstraram que os melhores resultados em masculinização fenotípica em fêmeas adultas de beta podem ser alcançados com doses entre 30 e 32 mg/kg do MT.

Aspectos comportamentais na reprodução (Jaroensutasinee e Jaroensutasinee 2001; Jaroensutasinee e Jaroensutasinee 2003; Snekser, McRobert e Clotfelter 2006) e da agressividade (Halperin et. al. 1998; Higa e Simm 2004; Verbeek, Iwamoto e Murakami 2007) foram amplamente estudados. Com base nesses estudos, o presente experimento demonstrou que fêmeas adultas tratadas com MT apresentaram aspectos comportamentais reprodutivos de machos.

Observou-se uma maior heterogeneidade nos parâmetros comportamentais analisados para as fêmeas tratadas com MT, quando comparadas a machos normais durante o período reprodutivo. Não houve, porém, o sucesso do ato reprodutivo e desova das fêmeas masculinizadas, provavelmente devido a uma não-mudança morfológicas de suas gônadas.

Poucos são os trabalhos científicos sobre a influência de esteróides sexuais na expressão fenotípica de vertebrados. Em seres humanos, a tentativa de indução das características sexuais trans-gêneros em transexuais com o uso de hormônios, geralmente homens e mulheres normais em idade adulta, biologicamente diferenciados, é incompleta (Assheman e Gooren 1992).

A alta labilidade gonadal apresentada pelo beta (Lowe, Larkin 1975), provavelmente não se assemelhou a de peixes, que por influencia ambiental, mediada por *inputs* fisiológicos, controlam a mudança de sexo em indivíduos adultos (Benton e Berlinsky 2006).

O presente trabalho demonstrou que, a masculinização fenotípica de fêmeas adultas por meio do andrógeno 17α -metiltestosterona foi bastante eficiente no peixe beta, ao contrário das reversões sexuais tradicionais por inclusão do hormônio na ração ou por imersão na água.

As fêmeas masculinizadas apresentaram fenótipos e comportamentos masculinos, deixando-as mais atraentes e conseqüentemente mais valorizadas no comércio de peixes ornamentais. Produtores ligados ao ramo da piscicultura ornamental, que buscam aumentar os seus lucros, podem usar facilmente esta técnica de masculinização fenotípica do beta descrita no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abucay, J. S. & Mair, G. C. (1997) Hormonal sex reversal of tilapias: implications of hormone treatment application in closed water systems. *Aquaculture Research* **28**, 841 – 845.
- Arlan, T. & Phelps, R. P. (2003) Masculinization of bluegill *Lepomis macrochirus* by multiple androgen immersion and effect of percutaneous permeation enhancers. *Journal of the World Aquaculture Society* **34**, n. 3, 403-411.
- Benton, C. B., Berlinsky, D. L. (2006) Induced sex change in black sea bass. *Journal of Fish Biology* **69**, 1491–1503.
- Cox, M. R. & John-Alder, B. H. (2005) Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *The Journal of Experimental Biology* **208**, 4679-4687.
- Halperin, J. R. P., Giri, T., Elliott, J. e Dunham, D. W. (1998) Consequences of hyper-aggressiveness in Siamese fighting fish: cheaters seldom prospered. *Animal Behavioral* **55**, 87–96.
- Hendry, C. I., Martin-Robichaud, D. J. & Benfey, T. J. (2003) Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **219**, 769 – 781.
- Higa, J.J. & Simm, L.A. (2004) Interval timing in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes* **67**, 501–509.
- Jaroensutasinee, M., & Jaroensutasine, K. (2001) Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *Journal of Fish Biology* **58**, 1311 – 1319.
- Jaroensutasinee, M. & Jaroensutasine, K. (2003) Type of intruder and reproductive phase influence male territorial defence in wild-caught Siamese fighting fish. *Behavioural Processes* **64**, 23 – 29.

- Kavumpurath, S. & Pandian, T. J. (1993) Determination of labile period and critical dose for sex reversal by oral administration of estrogens in *Betta splendens*. *Indian Journal of Experimental Biology* **31**, 16 – 20.
- Kirankumar, S. & Pandian, T. J. (2002) Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. *Journal of Experimental Zoology* **293**, 606 – 616.
- Kuhn, C. M. (2002) Anabolic Steroids. *Recent Progress in Hormone Research* **57**, 411-434.
- Low, W. P., Theo, S. H., Lim, L. C. & Phang, C. H. (1994) Anabolic and androgenic effects of 17 –methyltestosterone on guppies. *Singapore Journal of Primary Industry* **22**, 81 – 89.
- Lowe, T. P. & Larkin, J. R. (1975) Sex reversal in *Betta splendens* Regan with emphasis on the problem of sex determination. *Journal of Experimental Zoology* **191**, n. 1, 25 – 32.
- Pandian, T. J., Sheela, S. G. & Kavumpurath, S. (1994) Endocrine sex reversal in fishes: Masculinization evokes greater stress and mortality. Research Communications. *Current Science* **66**, n. 3, 240 – 243.
- Pandian, T.J. & Sheela, S.G. (1995) Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* **138**, 1– 22.
- Piferrer, F. (2001) Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* **197**, 229 – 281.
- Schmelzing, Th. O. & Gall, G.A.E. (1991) Use of 17 α -methyltestosterone to sex inverse gynogenic female rainbow trout. *Journal of Applied Ichthyology* **07**, 120–128.
- Snekser, J. L., McRobert, S. P. & Clotfelter, E. D. (2006) Social partner preferences of male and female fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes* **72**, 38 – 41.
- Turan, F., Çek, S. & Atik, E. (2005) Production of monosex guppy, *Poecilia reticulata*, by 17 α -methyltestosterone. Short Communication. *Aquaculture Research* **39**, 1 – 4.
- Wassermann, G. J. & Afonso, L. O. B. (2003) Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research* **34**, 65 – 71.
- Verbeek, P., Iwamoto, T. & Murakami, N. (2007) Differences in aggression between wild-type and domesticated fighting fish are context dependent. *Animal Behavior* **73**, 75-83.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnicas de inversão sexual e masculinização utilizando o hormônio 17 α -metiltestosterona, são utilizadas para peixes de corte em todo o mundo. As mesmas técnicas podem ser aplicadas na aquicultura ornamental, com o intuito de melhorar as características fenotípicas dos peixes e assim possibilitar um aumento nos lucros dos produtores. A inversão sexual do beta foi possível, apesar do hormônio ter interferido no crescimento dos mesmos, o que pode ser mito proveitoso do ponto de vista fisiológico, mas não comercial devido a mortalidade e baixo crescimento. A continuidade na segunda pesquisa procurou uma forma de masculinizar fêmeas adultas ao ponto que não se diferenciasssem as mesmas de um macho normal. Isso foi atingido, dando de certa forma um respaldo para os produtores, que podem usar essa técnica em suas proles de fêmeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCAY, J. S.; MAIR, G. C. Hormonal sex reversal of tilapias: implications of hormone treatment application in closed water systems. *Aquaculture Research* 28, 841 - 845, 1997.

ANDERSEN, L.; HOLBECH, H.; GESSBO, A.; NORRGREN, L.; PETERSEN, G. I. Effects of exposure to 17 a-ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 134, 365 - 374, 2003.

ARLAN, T.; PHELPS, R. P. Masculinization of bluegill *Lepomis macrochirus* by multiple androgen immersion and effect of percutaneous permeation enhancers. *Journal of the World Aquaculture Society* 34, n. 3, 403-411, 2003.

ARLAN, T.; PHELPS, R. P. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion. *Aquaculture* n. 234, 561- 573, 2004.

AYRES, M.; AYRES JR.; AYRES, D.L.; SANTOS, A. S. Bioestat, Versão 3.0. Sociedade Civil, Marnirauá, MCT-CNPQ, Belém, Para, Brasil. 2003.

BAGHEL, D. S.; LAKRA, W. S.; RAO, G. P. S. Altered sex ratio in giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) using hormone bioencapsulated live *Artemia* feed. *Aquaculture Research* 35, 943 - 947, 2004.

BAROILLER, J. F.; GUIGEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Molecular Life Science* 55, 910 - 931, 1999.

BENTON, C. B.; BERLINSKY, D. L. Induced sex change in black sea bass. *Journal of Fish Biology* n. 69, 1491 - 1503, 2006.

BUSTAMANTE, H. R.; SALAS, A. A. O. Initial sexual maturity and fecundity of two anabantids under laboratory conditions. *North American Journal of Aquaculture*, [S.l.], v.64, 224 - 227, 2002.

CALEGARI-JACQUES, S. M. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed, 255p, 2003.

COXAN, M. R.; JOHN-ALDER, B. H. Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *The Journal of Experimental Biology* 208, 4679 - 4687, 2005.

Fishbase. Consultado dia 23/05/2007 às 17:30.

<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=4768&genusname=Betta&speciesname=splendens>

GEORGE, T.; PANDIAN, T. J. Dietary administration of androgens induces sterility in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops* (Cuvier & Valenciennes, 1846). *Aquaculture Research* 29, 167 - 175, 1998.

- GUERRERO, R. D.; SHELTON, W. L. An acetorcamine squash method of sexing juvenile fishes. *Progress Fish Culture* 36 - 56, 1974.
- HALPERIN, J. R. P.; GIRI, T.; ELLIOTT, J. E.; DUNHAM, D. W. Consequences of hyper-aggressiveness in Siamese fighting fish: cheaters seldom prospered. *Animal Behavioral* 55, 87 - 96, 1998.
- HENDRY, C. I.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; BENFEY, T. J. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 219, 769 – 781, 2003.
- HIGA, J. J.; SIMM, L. A. Interval timing in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes* 67, 501 – 509, 2004.
- IWAMATSU, T.; KOBAYASHI, H.; SAGEGAMI, R.; SHUO, TAKUYA. Testosterone content of developing eggs and sex reversal in the medaka (*Oryzias latipes*). *General and Comparative Endocrinology* 145, 67 – 74, 2006.
- JAROENSUTASINEE, M.; JAROENSUTASINE, K. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *Journal of Fish Biology* 58, 1311 – 1319, 2001.
- JAROENSUTASINEE, M.; JAROENSUTASINE, K. Type of intruder and reproductive phase influence male territorial defence in wild-caught Siamese fighting fish. *Behavioral Processes* 64, 23 – 29, 2003.
- LOW, W. P.; THEO, S. H.; LIM, L. C.; PHANG, C. H. Anabolic and androgenic effects of 17 –methyltestosterone on guppies. *Singapore Journal of Primary Industry* 22, 81 – 89, 1994.
- LOWE, T. P.; LARKIN, J. R. Sex reversal in *Betta splendens* Regan with emphasis on the problem of sex determination. *Journal of Experimental Zoology* 191, n. 1, 25 – 32, 1975.
- MILLS, D. *Peixes de aquário*. Tradução de: Eyewitness handbook: Aquarium Fish. Ediouro Publicações S.A, Rio de Janeiro, 140 - 142, 1997.
- PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G.; KAVUMPURATH, S. Endocrine sex reversal in fishes: Masculinization evokes greater stress and mortality. Research Communications. *Current Science* 66, n. 3, 240 – 243, 1994.
- PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1 - 22, 1995.
- PANDIAN, T. J.; GEORGE, T. Production of ZZ females in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops*, by endocrine sex reversal and progeny testing. *Aquaculture* 136, 81 – 90, 1995.
- PANDIAN, T. J.; GEORGE, T. Dietary administration of androgens induces sterility in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops* (Cuvier & Valenciennes, 1846). *Aquaculture Research* 29, 167-175, 1998.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197, 229 - 281, 2001.

- KARAYUCEL, I.; AK, O.; KARAYUCEL, S. Effect of temperature on sex ratio in guppy *Poecilia reticulata* (Peters 1860). *Aquaculture Research* **41**, 1 - 12, 2005
- KAVUMPURATH, S.; PANDIAN, T. J. Determination of labile period and critical dose for sex reversal by oral administration of estrogens in *Betta splendens*. *Indian Journal of Experimental Biology* **31**, 16 – 20, 1993.
- KIM, D. S.; NAM, Y. K.; JO, J. Y. Effect of 17 beta-estradiol immersion treatments of sex reversal of mud loach. In: *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture Research* **28**, 941 – 946, 1997.
- KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T. J. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. *Journal of Experimental Zoology* **293**, 606 – 616, 2002.
- KUHN, C. M. Anabolic Steroids. *Recent Progress in Hormone Research* **57**, 411- 434, 2002.
- SCHMELZING, T. H. O.; GALL, G. A. E. Use of 17 α -methyltestosterone to sex inverse gynogenic female rainbow trout. *Journal of Applied Ichthyology* **7**, 120 – 128, 1991.
- SNEKSER, J. L.; MCROBERT, S. P.; CLOTFELTER, E. D. Social partner preferences of male and female fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioral Processes* **72**, 38 – 41, 2006.
- TURAN, F.; ÇEK, S.; ATIK, E. Production of monosex guppy, *Poecilia reticulata*, by 17 α -methyltestosterone. Short Communication. *Aquaculture Research* **39**, 1 – 4, 2005.
- WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research* **34**, 65 – 71, 2003.
- YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: *Fish Physiology*. (by W.S. Hoar & D.J. Randall) Vol. III, New York: Academic Press, pp. 117-175, 1969.
- VERBEEK, P.; IWAMOTO, T.; MURAKAMI, N.; Differences in aggression between wild-type and domesticated fighting fish are context dependent. *Animal Behaviour* **73**, 75-83, 2007.

ANEXOS

Aquaculture Research

TopAuthorGuidelines

Submission. Aquaculture Research prefers to receive all manuscript submissions electronically using Manuscript Central.

Preparation of the manuscript. All sections of the typescript should be on one side of A4 paper, double-spaced and with 30mm margins. Line numbering and a font size of 12pt should be used. Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editor(s). Authors will receive prompt receipt of their paper and a decision will be reached within 3 months of receipt. A manuscript should consist of the following sections:

Title page. This should include:

the full title of the paper

the full names of all the authors

the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present address of the authors, if different from the above, should appear in a footnote)

the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be sent

a suggested running title of not more than 50 characters, including spaces

four to six keywords for indexing purposes

Main text. Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150-200 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgments, (7) References, (8) Figure legends, (9) Tables, (10) Figures.

The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and address given.

All pages must be numbered consecutively from the title page, and include the acknowledgments, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the left-hand margin.

Units and spellings. Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL⁻¹. Use the form gmL⁻¹ not g/ml. Avoid the use of g per 100 g, for example in food composition, use g kg⁻¹. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the *Concise Oxford Dictionary* published by Oxford University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific names and statistics. Complete scientific names, including the authority with correct taxonomic disposition, should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words together with authorities in brackets, e.g. 'rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)' but 'Atlantic salmon *Salmo salar* L.' without brackets. For further information see American Fisheries Society Special Publication No. 20, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada*.

Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

References (Harvard style). References should be cited in the text by author and date, e.g. Lie & Hemre (1990). Joint authors should be referred to in full at the first mention and thereafter by *et al.* if there are more than two, e.g. Hemre *et al.* (1990).

More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc. placed after the year of publication. Listings of references in the text should be chronological. At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The full titles of papers, chapters and books should be given, with the first and last page numbers.

Chapman D.W. (1971) Production. In: *Methods of the Assessment of Fish Production in Freshwater* (ed. by W.S. Ricker), pp. 199-214. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.

Utting, S.D. (1986) A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* **56**, 123-128.

Authors are responsible for the accuracy of their references. References should only be cited as 'in press' if they have been accepted for publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited. Personal communications should be cited as such in the text.

It is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. A letter of permission should accompany the manuscript.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Illustrations and tables. These should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig.1, Fig.2 etc. in order of appearance. Three copies of each figure should be submitted and each figure should be marked lightly on the back with its appropriate number, together with the name(s) of the author(s) and the title of the paper. Where there is doubt as to the orientation of an illustration, the top should be marked with an arrow.

Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling, including scale bars if necessary, should be clearly indicated on an overlay or photocopy. Magnifications should be included in the legend.

It is the policy of *Aquaculture Research* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a pdf from the internet. The web address for the form is:
http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf

If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor are@oxon.blackwellpublishing.com, and they will be able to email or FAX a form to you.

Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned.

Line drawings should be on separate sheets of white paper in black indelible ink (dot matrix illustrations are not permitted); lettering should be on an overlay or photocopy and should be no less than 4 mm high for a 50% reduction. Please note, each figure should have a separate legend; these should be grouped on a separate page at the end of the manuscript. All symbols and abbreviations should be clearly explained.

Tables should be self-explanatory and include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. No vertical rules should be used. Units should appear in parentheses in the column headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote.

All tables and figures that are reproduced from a previously published source must be accompanied by a letter of permission from the Publisher or copyright owner.

Please send us digital versions of your figures. These should be supplied as eps or tif files only. See <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp> for further details.

Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse.

In the full-text online edition of the Journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Acknowledgments. These should be brief and must include references to sources of financial and logistical support.

Short Communications. These should differ from full papers on the basis of scope or completeness, rather than quality of research. They may report significant new data arising from problems with narrow, well defined limits, or important findings that warrant rapid publication before broader studies are complete. Their text should neither exceed 1500 words

(approximately six pages of typescript) nor be divided up into conventional sections. When submitting Short Communications, authors should make it clear that their work is to be treated as such.

Disks. The Journal encourages submission of accepted manuscripts on disk. These should be IBM-compatible. An accurate hard copy must accompany each disk, together with details of the type of computer used, the software employed and the disk system if known. *Do not justify.* Particular attention should be taken to ensure that any articles submitted in this form adhere *exactly* to the journal style in all respects. Further details can be obtained from the Publisher; the Editor(s) will supply 'disk submission' forms on acceptance of a manuscript. Disks will not be returned to the author.

Copyright. It is a condition of publication that authors grant Blackwell Publishing Ltd the exclusive licence to publish all articles including abstracts. Papers will not be passed to the publisher for production unless the exclusive licence to publish has been granted. To assist authors an exclusive licence form will be supplied by the editorial office. Alternatively authors may like to download a copy of the form [click here](#). Correspondence to the Journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Page proofs and reprints. The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Only typographical errors can be corrected at this stage. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Offprints. A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG If you have any queries about offprints please email offprint@cosprinters.com

Author material archive policy. Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two issues after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.