

SANDRO RICARDO DA COSTA

**REPRODUÇÃO INDUZIDA DA RÃ-TOURO *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802),
UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS E DOSAGENS DO HORMÔNIO LIBERADOR
DA GONADOTROPINA - GnRH.**

**RECIFE,
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**REPRODUÇÃO INDUZIDA DA RÃ-TOURO *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802),
UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS E DOSAGENS DO HORMÔNIO LIBERADOR
DA GONADOTROPINA - GnRH.**

Sandro Ricardo da Costa

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

Prof. Dr. JOSÉ MILTON BARBOSA

Orientador

**Prof. Dr. ATHIÊ JORGE GUERRA
SANTOS**

Co-orientador

**Recife,
Fevereiro/2012**

Ficha Catalográfica

C837r Costa, Sandro Ricardo da

Reprodução induzida da rã-touro *Lithobates catesbeianus*
(Shaw, 1802), utilizando diferentes tipos e dosagens do
hormônio liberador da gonadotropina - GnRH / Sandro
Ricardo da Costa. – Recife, 2012.

49 f. : il.

Orientador: José Milton Barbosa.

Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2012.

Referências

1. Ranicultura 2. Etologia aplicada 3. Cativeiro I. Barbosa,
José Milton, orientador II. Título

CDD 636.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**REPRODUÇÃO INDUZIDA DA RÃ-TOURO *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802),
UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS E DOSAGENS DO HORMÔNIO LIBERADOR
DA GONADOTROPINA - GnRH.**

Sandro Ricardo da Costa

Dissertação julgada adequada para obtenção do
título de mestre em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
27/02/2012 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. José Milton Barbosa

(Orientador)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. Athiê J. G. Santos

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. William Severi (Suplente)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]
[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, minha família, meu amor
e meus amigos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde e tudo que tive até hoje e que me trouxe até aqui, fazendo com que este caminho, apesar das dificuldades, tenha sido prazeroso.

Aos meus pais João da Costa (*in memoriam*) e Doracy Ferreira da Costa, por me prepararem como homem para estes desafios; e aos irmãos Paula, Patrícia e Wagner, pelo incentivo e apoio.

Às minhas filhas queridas Bêlit, Jade e Morgana, pela compreensão durante minha ausência e simplesmente por existirem, pois nada disso faria sentido se não fosse feito pensando nelas.

À minha esposa Caroline, por me ajudar diversas vezes nos experimentos pilotos e nos cuidados do ranário da UFRPE, me incentivando e dando forças.

Ao grande amigo e coorientador Prof. Dr. Athiê Jorge Guerra Santos, não só pela orientação neste trabalho, mas também pelos conselhos sobre diversos assuntos da vida, pelas longas conversas de fim de tarde olhando para os viveiros, acalmando o espírito e por muitas vezes fazer até o “papel de pai”.

Ao Prof. Dr. José Milton, por todo apoio prestado durante o período do mestrado e pelas orientações de valor.

À Engenheira de Pesca Amanda, por dividir comigo as responsabilidades do ranário e na ajuda com os experimentos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura.

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos Profs. Drs. Paulo Guilherme, Paulo Travassos, Maria Raquel, Maria do Carmo, William Severi, Ronaldo Cavalli, Silvio Peixoto, José Carlos, Alfredo Galvez e Eudes Correia, pelos ensinamentos valiosos durante este período.

Ao Prof. Dr. Alex Poeta Casali da UFPB, por toda infra-estrutura disponibilizada no experimento e pelas valiosas orientações.

Ao amigo Antonio Rosendo, por toda ajuda, parceria, apoio, amizade, “sangue e suor” durante o período de acolhida na cidade de Bananeiras.

À toda equipe de Bananeiras, pela ajuda nos experimentos, pela acolhida e pela amizade.

Aos colegas do LAMARSU, Henrique, Leo, Steves, André “cabeça” e Sergio, pela amizade e companheirismo e a todos os colegas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Resumo

A técnica de uso de hormônios liberadores da gonadotrofina (GnRH) na reprodução de anfíbios pode ser usada para controlar as desovas ao longo do ano, evitando atrasos na produção decorrente da sazonalidade do ciclo reprodutivo. Objetivou-se estudar a reprodução induzida da rã touro *Lithobates catesbeianus*, utilizando diferentes tipos e dosagens do GnRH visando à otimização do hormônio e conseqüente redução nos custos operacionais na produção comercial. Os reprodutores (peso médio de 650 g) foram previamente preparados, sendo climatizados à temperatura média de 26° C, e submetidos a fotoperíodo de 15h luz. Foram testados três diferentes tratamentos hormonais, sendo o tratamento um (T1) com 5 µg/rã de acetato de Etilamida hidratado, o tratamento dois (T2) 2,5 µg/rã de acetato de Etilamida hidratado e o tratamento três (T3) com 0,8 µg/rã de acetato de Busserelina, divididos em três fases experimentais. Em cada tratamento foram feitas três aplicações de hormônios com intervalo de 12 h nas fêmeas, e apenas uma aplicação nos machos. Após o tratamento hormonal foi feita a extrusão dos óvulos nas fêmeas e espermiação nos machos, fecundando e hidratando os ovos com água de pH neutro. Todos os machos responderam aos hormônios aplicados resultando em um “pool espermático”, usado na fertilização das fêmeas. As fêmeas dos Tratamentos T1 e T2 ovularam em sua totalidade havendo uma abstenção apenas no T3. Nas primeira e segunda fase experimental, foi detectado que as dosagens de 2,5 µg/rã de acetato de Etilamida hidratado e 0,8 µg/rã de acetato de Busserelina foram mais tecnicamente e economicamente viáveis para indução à reprodução da rã touro. A média no peso das desovas foi de 92,8 e 93,7 g, respectivamente. A taxa de fecundação foi estimada na porcentagem de eclosão das larvas, com índices de fecundação com medias no T2 com 84,2 % e 60,3 % no T3. Com base nos resultados, é possível concluir que houve eficiência com a redução das dosagens usuais para o acetato de Etilamida hidratado e também houve eficiência com o uso do acetato de Busserelina na ovulação e espermiação de rãs, porém se faz necessário ajuste de dosagens para acetato de Busserelina bem como uma melhor adequação entre as condições de controle ambiental e maturação dos reprodutores, afim de melhorar os índices de fecundação em novos experimentos.

Palavras-chave: *Rana*, ranicultura, etologia aplicada, comportamento animal, cativeiro.

Abstract

The technique of use of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) in the reproduction of amphibians can be used to control spawning throughout the year, avoiding production delays resulting from the seasonality of the reproductive cycle. The objective was to study the induced breeding of bullfrog *Lithobates catesbeianus* using different types and dosages of GnRH to the optimization of the hormone and the consequent reduction in operating costs in commercial production. Breeders (average weight 650 g) were previously prepared, and conditioned to an average temperature of 26°C, submitted to a photoperiod of 15 hours of light. We tested three different hormone treatments; treatment 1 (T1) with 5 µg Etilamid hydrated acetate, treatment (T2) 2.5 µg Etilamid hydrated acetate and treatment 3 (T3) with 0.8 µg of Buserelin acetate, divided in three experimental groups. For each treatment, three applications were made at intervals of 12 hours hormones application in females and a single one for males. After the hormone treatment was done the extrusion of eggs in females and spermiation in males fertilized eggs hydrated with water at neutral pH. All males responded to the hormones applied resulting in a "pool of sperm" used to fertilize the females. Females of treatments T1 and T2 ovulated in its entirety and there was a failure only in T3. From the first and second trials, it could be detected that the dosages of 2.5 µg Etilamid hydrated acetate and 0.8 µg Buserelin acetate are more technically and economic viable for induced breeding of bullfrog. The average weight of spawning was 92.8 and 93.7 g respectively. The fertilization rate was estimated from the percentage of eclosion, with rates of fertilization rates average with 84.2 % (T2) and 60.3 % (T3). Based on the results, we conclude that the reduction in usual dosages for Etilamid hydrated acetate and the use of Buserelin acetate were efficient on ovulation and spermiation in bullfrogs, but it is necessary to adjust the dosage of Buserelin acetate as well to get a better improvement through environmental control and breeder maturation conditions in further experiments.

Key words: *Rana*, frog culture, applied ethology, animal behavior, captive.

Lista de figuras

	Página
Figura 1 - (Revisão bibliográfica) Rã Touro (<i>L.catesbeianus</i>).....	15
Figura 2 - (Fig. 1 - Artigo) Procedures of induced breeding of bullfrog: hormone application, extrusion, spermiation and fertilized and hydrated eggs.....	30
Figura 3 - (Fig. 2 - Artigo) Correlation between the hatching rate in bullfrog females ovulated with the Buserelin hormone at different dosages during the second trial.....	35

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Number of female frog and hormones concentrations per animal used in each trial, between Sept/2010&May/2011 (aE: acetate of Ethylamide; aB: acetate of Buserelin)	29
Tabela 2- Main variables results obtained from the females bullfrog induced with the acetate of Ethylamide and acetate of Buserelin at different dosages during the first trial..	33
Tabela 3- Main variables results obtained from the females bullfrog induced only with the acetate of Buserelin hormone at different dosages, during the second trial.....	34
Tabela 4- Main variables results obtained from the females bullfrog induced with the acetate of Ethylamide and acetate of Buserelin hormones at two selected dosages in the third.....	36
Tabela 5- Summarized results of the main variables obtained from the bullfrogs female induced with the dosage of 2.5 µgaE and 0.8 µgaB in the present investigation.....	38

Sumário

Página

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

1- Introdução.....	12
2- Revisão de literatura.....	14
2.1- <i>Lithobates catesbeianus</i> , Shaw 1802.....	14
2.2 – Ranicultura.....	16
3- Referências bibliográficas.....	20
4- Artigo científico.....	26
4.1- Normas da Revista Aquaculture Research.....	44

1- Introdução

A ranicultura no Brasil teve início na década de 1930, quando Tom Cyril Harrison trouxe da América do Norte os primeiros casais de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802). Esta espécie se adaptou às condições geo-climáticas brasileiras devido à sua precocidade, rusticidade e alta prolificidade, podendo produzir até mais de 10.000 ovos em cada postura. Na década de 1980 ocorreu uma grande expansão desta espécie no Brasil. Estima-se que mais de 2000 ranários foram implantados (LIMA e AGOSTINHO, 1989) e que chegaram a produzir cerca de 400 toneladas de carne de rã por ano, da qual boa foi exportada, sobretudo, para os Estados Unidos e a França. Em 2007, a produção chegou a aproximadamente 600 toneladas (IBAMA, 2009).

O comércio interno de rã-touro é em parte restrito pelo preço, que no atacado estima-se que varia entre R\$ 20 e 27 por quilo, e no varejo pode chegar a R\$ 40. Para reduzir esse valor, pesquisadores e produtores têm trabalhado em parceria para tentar maximizar o processamento de carne e o aproveitamento de subprodutos, assim como reduzir o preço das rações utilizadas (FERREIRA et al., 2001).

No Brasil, foram feitas tentativas de cultivo da rã-pimenta, espécie nativa, em escala comercial, mas a prática foi abandonada pela baixa produtividade da espécie em comparação com a da rã-touro.

A rã norte-americana produz cerca de 10 mil ovos por postura, cerca de cem vezes mais do que sua contrapartida brasileira (*Leptodactylus labyrinthicus*, Spix 1824); além disso, chega ao tamanho de abate mais rápido.

As fêmeas adultas de rã-touro permanecem maduras durante o ano todo (COSTA, 1991), todavia, os processos de maturação final e ovulação somente são desencadeados por estímulos ambientais, como as chuvas e o aumento da temperatura logo após o final do inverno.

A técnica de uso dos hormônios na reprodução de anfíbios vem sendo usada para superar a dificuldade dos ranicultores em controlar as desovas ao longo do ano, visto que o ciclo reprodutivo do animal é sazonal e implica em atraso na produção e consequente diminuição nos lucros na produção.

Os anfíbios representam um grupo extremamente vulnerável às alterações climáticas e aos impactos decorrentes do aumento populacional humano e seu

progresso. O território ora seco e ora alagado pelas águas naturais, de uso comum, acabam por sofrer as conseqüências destas interferências. O conhecimento científico sobre como os ciclos naturais realmente ocorrem a médio e longo prazo, justificam a necessidade do cultivo em cativeiro empregando as técnicas já conhecidas e o investimento em pesquisas para incrementar a viabilização dos investimentos na ranicultura, como exemplo, o controle da reprodução por meio de indutores hormonais, tais como os hormônios liberadores da gonadotropina (GnRH).

A reprodução induzida também tem vantagem sobre a reprodução natural, quando esta é prejudicada por fatores estressantes como o manejo. No período reprodutivo, fêmeas estressadas abortam e produzem coxos característicos enquanto os machos deixam de coaxar. Neste período, os animais tendem a ficar escondidos, tanto embaixo da água, quanto nos abrigos (LIMA e AGOSTINHO, 1992; FERREIRA et al., 2002). Apesar do fator estresse permanecer no trabalho da reprodução induzida, o resultado é garantido pela estimulação artificial e liberação dos hormônios gonadotrópicos e os esteróides sexuais.

Segundo Ferreira et al.(2002), as linhas científicas adotadas pelos pesquisadores sempre objetivaram o aprimoramento dos parâmetros zootécnicos da *L. catesbeianus* (rã touro), a fim de contribuir para o melhoramento dos cultivos intensivos dos ranários brasileiros. Sabe-se que a ovulação e desova da rã-touro têm sido induzidas, utilizando-se o GnRH- Acetato de Etilamida e o Acetato de Buserelina, com dosagens estabelecidas em torno de 5,0 microgramas por fêmea (AGOSTINHO et al., 2000). Eventuais observações (Santos, com. pess.), no entanto, tem demonstrado que o GnRH, em especial o Acetato de Buserelina, tem induzido a ovulação na rã-touro mantida em cativeiro, com dosagens bastante reduzidas, e que confirmando esses resultados se obterá um avanço significativo no controle da reprodução da referida rã, devido a sua praticidade e economicidade.

Diante do exposto, esta pesquisa objetivou estudar a reprodução induzida na rã-touro, utilizando diferentes dosagens de hormônio liberador da gonadotropina para que se analisem tanto os aspectos referentes à prolificidade da espécie em resposta as dosagens, quanto à otimização do hormônio para redução de custos operacionais na produção comercial.

2- Revisão de literatura

2.1- *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)

A ciência reconhece atualmente um total de 6771 espécies de animais representantes do grupo dos anfíbios (FROST, 2011). A importância desses animais é indiscutível, tanto para o equilíbrio de ecossistemas, devido a seu papel chave na cadeia alimentar (DUELLMAN & TRUEB, 1994), uma vez que estão inseridos na ecologia trófica de ambientes aquáticos e terrestres, quanto do interesse farmacológico despertado pela secreção cutânea (SEBBEN et al., 1986; MOODIE, 1978). Destacam-se ainda por serem uma importante fonte de proteínas na alimentação humana, destacando como principal espécie nesta utilização, a *Lithobates catesbeianus*. As espécies da família Ranidae, a qual pertence a rã-touro, se diferenciam das espécies da família Leptodactylidae (dedos terminados em ponta), a qual pertence a rã pimenta brasileira por possuírem membranas natatórias entre os dedos.

A rã-touro (*L. catesbeianus*) enquadra-se dentro da família Ranidae que agrupa as rãs verdadeiras. Essa família possui ampla distribuição mundial, com cerca de 36 gêneros e centenas de espécies, dentre os quais se destaca o gênero *Lithobates*. Este gênero possui grande importância, em decorrência de seu emprego em criações comerciais. Dado o interesse econômico que a rã touro propicia ao país, passou a ser uma espécie intensivamente estudada, sob o ponto de vista biológico e de produção, mantendo o Brasil na vanguarda desses estudos (LIMA & AGOSTINHO, 1989).

A comunicação entre os diversos campos da ciência biológica se dá principalmente pelos nomes científicos das espécies estudadas (BARREIRA, 2009) e tais regras são ditadas pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, que rejeita nomes que possam causar confusão ou ambigüidade, o que garante a universalidade dos nomes científicos, fazendo com que esses sejam reconhecidos por cientistas de qualquer nacionalidade (BERNARDI, 1958). De acordo com o referente código recentemente atualizado, a classificação para a rã touro é:

Reino ANIMALIA: São animais, seres vivos multicelulares;

Filo CHORDATA: Possuem notocorda;

Subfilo VERTEBRATA: Possuem vértebras;

Grupo GNATOSTOMATA: Possuem mandíbula;

Superclasse TETRAPODA: Possuem quatro membros locomotores;
Classe AMPHIBIA: Possuem duas fases distintas de vida (aquática e terrestre);
Superordem: SALIENTIA: São lentas;
Ordem ANURA: Não possuem cauda na fase adulta;
Família RANIDAE: Possuem membranas interdigitais nas patas traseiras;
Gênero: *Lithobates*;
Espécie: *Lithobates catesbeianus*;
Nome Popular: Rã Touro.
(TEIXEIRA et al, 2001)

A rã-touro, *L. catesbeianus* (Shaw, 1802), anteriormente descrita como *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, foi incorporada ao gênero *Lithobates* Fitzinger, 1943 (FROST et al., 2006), embora a maioria da literatura a seu respeito se refira a antiga denominação taxonômica.



Fig.1- Rã Touro (*L.catesbeianus*).

Segundo Wright & Wright (1949) a rã-touro é o maior anfíbio anuro da América do Norte e, quando adulto, apresenta coloração do dorso verde-oliva, com pontos negros. Os machos adultos têm aproximadamente 18 cm de comprimento rostocloacal (CRC), e suas membranas timpânicas possuem um diâmetro maior que os olhos, com sua parte marginal marrom escuro (GEORGE, 1938, 1940; SCHROEDER & BASKETT, 1968). Ao atingir a maturidade sexual, ocorre um desenvolvimento do calo nupcial e a região gular torna-se amarelada (RUFFNER, 1933; STEBBLINS, 1954; CONANT, 1975). As fêmeas, quando adultas, podem medir 20 cm de comprimento rosto-cloacal (CRC) (WRIGHT & WRIGHT, 1949) e apresentam suas membranas

timpânicas com um diâmetro menor se comparadas com os olhos (GEORGE, 1938, 1940; SCHROEDER & BASKETT, 1968).

A rã-touro se reproduz no meio aquático, permanecendo a maior parte do tempo na água. Prefere habitat pantanoso, brejo com vegetação e rio de água calma. Ocorre em uma vasta área, com grandes amplitudes térmicas, desde climas continentais, com invernos frios e verões quentes, como o Centro e o Norte dos Estados Unidos e Sul do Canadá, como também climas semi-tropicais, como o Sul e o Oeste dos Estados Unidos (WRIGHT e WRIGHT, 1949). Segundo Moyle (1973), podem ser encontradas em locais com altitude acima de 1.990m, em particular, nos ambientes modificados pelo homem.

2.2- Ranicultura

O Brasil é considerado um dos países com maior potencial para a expansão da aquicultura (QUEIROZ et al., 2002), principalmente pela extensão de seus recursos hídricos. Dentre as várias modalidades em aquicultura, podemos citar a ranicultura como uma das atividades mais promissoras.

A ranicultura no Brasil desperta enorme interesse junto a produtores investidores e grandes empresas, devido a seu elevado potencial reprodutivo, à eficiência de sua conversão alimentar e ao bom retorno financeiro com a venda de sua carne e outros subprodutos para os mercados interno e externo (LIMA; AGOSTINHO, 1989).

L. catesbeianus é originária da América do Norte, mas foi introduzida no Brasil por empreendedores que viram nesta espécie grandes potencialidades comerciais pelas qualidades nutricionais e sabor delicado de sua carne (FONTANELLO et al., 1984).

A introdução da espécie se deu com intuito de implantação da criação de rãs na Região da Baixada Fluminense, no Estado do Rio de Janeiro, onde 300 casais de rã-touro americana constituíram o primeiro plantel do Ranário Aurora, o primeiro ranário brasileiro (VIZOTTO, 1979). No entanto, as pesquisas científicas necessárias ao avanço tecnológico da ranicultura somente foram iniciadas 40 anos após, época em que se instituiu o primeiro encontro nacional de ranicultura (ENAR), no ano de 1978 em Brasília (AFONSO, 2003). Segundo Vizotto (1979), na região Sudeste pode ser

observado dois períodos reprodutivos da rã-touro, sendo o primeiro do final de setembro a meados de janeiro e o segundo do início de fevereiro a meados de abril. Adicionalmente, Afonso (2003), afirmou que no Estado do Rio de Janeiro, a reprodução da rã-touro ocorre de setembro a abril.

De acordo com Duellman e Trueb (1994), em espécies de anuros de zona temperada, a temporada de reprodução é do tipo cíclico, tendo como principal agente deflagrador uma combinação entre o aumento de temperatura e a ocorrência de chuvas.

A criação de rãs, principalmente a rã-touro, experimentou avanços tecnológicos notáveis nos últimos 20 anos, que permitiram a intensificação da produção sob condições controladas (LIMA et al., 1998; RODRÍGUEZ-SERNA et al., 1996; FLORES-NAVA, 1995, 1999, 2001, 2005).

As rãs têm importância econômica por possuírem carne muito apreciada pelo homem, além de serem historicamente empregadas nas pesquisas biológicas, farmacêuticas e medicinais como cobaias. No Brasil, existem várias espécies de rãs de grande porte, que pertencem à família Leptodactylidae, como a rã-manteiga, rã-pimenta, etc. (STORER e USINGER, 1991).

Praticamente, toda produção brasileira (cerca de 400 t/ano) é absorvida pelo mercado interno, porém o Brasil tem condições de conquistar expressivo espaço no mercado externo, necessitando apenas despertar para essa realidade. Existem ainda novos nichos de mercado interno a serem conquistados (CARVALHO FILHO, 2001).

O Nordeste é uma região definida como preferencial para a criação de rãs pela sua condição climática. Apesar dos frequentes ciclos de seca, existe na região, micro climas com disponibilidade de água durante todo o ano, inclusive no sertão próximo aos grandes açudes, e na faixa litorânea. A ranicultura, especificamente nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte, teve início em 1995. Nessa época alguns empreendedores de ambos os estados, estiveram no Sudeste em visita à ranários e fazendo cursos rápidos. Esses cursos eram na época oferecidos em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (MOURA, 2003).

Um dos principais componentes para uma boa produção, além do manejo adequado, são as técnicas de reprodução, natural ou artificial. O setor de reprodução é a

área do ranário onde os animais reprodutores (matrizes) devem permanecer durante as épocas mais quentes do ano. Isto, porque vários ranários comerciais trabalham com baias (tanques) de manutenção, ou repouso sexual, onde os reprodutores são colocados nas épocas mais frias do ano ou, ainda, para se recuperarem do esforço reprodutivo. Nestes locais, eles são separados por sexo e tamanho, alimentados adequadamente e tratados quando apresentam algum dano externo ou fisiológico (FONTANELLO et al., 1984).

O setor de reprodução deve simular as condições que as rãs encontram na natureza, mas sem prejuízo dos índices zootécnicos desejáveis. Nos ranários comerciais brasileiros, ele é geralmente composto de um tanque principal com uma ilha central, onde é feita a alimentação, e tanques de postura medindo 1,00 x 1,00 x 0,15 m. Esses tanques de postura são procurados pelos machos na época da reprodução, que os defendem como território de acasalamento. Nesta ocasião, os machos começam a coaxar para atrair a atenção das fêmeas e disputam os territórios escolhidos, defendendo-os, muitas vezes, até a morte. O amplexo acontece dentro da água e geralmente à noite. Os óvulos são colocados sobre a água e o esperma depositado sobre eles, ocorrendo então uma fecundação externa (FONTANELLO et al., 1984).

Na região subtropical do Brasil, um dos principais problemas encontrados pelos ranicultores é o retardo da metamorfose dos girinos no inverno. A difícil obtenção de imagos durante esse período acarreta num aumento do tempo de abate e, conseqüentemente, nos custos de produção (FRANÇA, 2003).

Problemas associados aos fatores temperatura e sazonalidade também afetam significativamente a fase de maturação e reprodução. Os organismos ectotérmicos não possuem mecanismos eficientes para manter em níveis constantes a temperatura corporal, assim seu desenvolvimento é afetado pela temperatura ambiente. As baixas temperaturas provocam atraso no desenvolvimento e possibilitam a estocagem de pequenos animais, com baixas exigências para a manutenção. Entretanto, altas temperaturas são ótimas para acelerar o desenvolvimento dos animais (HOFFMANN et al., 1989 apud LIMA et al., 1998).

O processo metabólico é afetado diretamente pela temperatura da água. A cada elevação de 10°C, dobram a taxa metabólica e as taxas de outros processos vitais, aumentando o consumo de oxigênio. A rã-touro leva de 6 a 10 meses para completar sua

metamorfose em uma temperatura entre 15 e 18°C, porém entre temperaturas de 21 a 27°C, esta duração diminui para 3 a 4 meses. Este é um dos fatores que deve ser evidenciado como em alguns casos, o de regiões de baixa temperatura, que pode retardar o processo de desenvolvimento, o ganho de peso e a sua maturidade (VIZOTTO, 1979).

Segundo Lima et al. (1998), no Brasil, a rã-touro é a espécie mais utilizada pelos ranicultores nos criatórios. Porém, há poucas informações disponíveis sobre o ciclo reprodutivo desta espécie, o que traz dificuldades na realização de adequado manejo do plantel de reprodutores.

Através da aplicação de hormônios gonadotróficos é possível a obtenção de desovas por um período maior de tempo quando comparado com situações naturais. Para essa espécie de anfíbio anuro, em condições experimentais adotadas, o estágio de “repouso” dos ovários não foi diagnosticado, o que sugere que a atividade ovogênica desses animais seja contínua, voltando os seus ovários ao estágio de maturação intermediária, após a ovulação (COSTA et al., 1998).

Uma série de mecanismos de ajuste está envolvida no processo de maturação gonadal e desova, basicamente através de controles hormonais. No início do desenvolvimento gonadal ocorre um aumento no nível de gonadotropina na hipófise e no plasma, servindo provavelmente para recrutar os ovócitos e iniciar a vitelogênese no período reprodutivo corrente (ZOHAR, 1989). Essa elevação da gonadotropina estimula o aumento na concentração de testosterona e estrogênio, porém, esses níveis diminuem rapidamente (CAROLSFELD, 1989).

A utilização dos hormônios liberadores de gonadotropinas (GnRH) para a indução a desova de peixes vem sendo utilizada com sucesso desde 1975 (DONALDSON e HUNTER, 1983). Esses hormônios são muito semelhantes entre os vertebrados superiores e inferiores, havendo pequenas alterações na estrutura molecular do decapeptídeo. Por essa razão, o hormônio liberador de gonadotropina de mamífero e os seus análogos são efetivos para induzir a desova de várias espécies de peixes. Como se trata de uma molécula pequena e simples, a síntese desse hormônio foi possível, abrindo possibilidade para alteração da estrutura molecular e a síntese de análogos,

possibilitando a produção de hormônios 50 a 100 vezes mais potentes (HARVEY e CAROLSFELD, 1993).

Apesar da existência de vários análogos no mercado, os mais utilizados para indução à maturação final de peixes são os análogos dos hormônios liberadores de gonadotropina (GnRH) de mamíferos e de salmão.

Uma solução viável para o produtor será o uso de hormônios liberadores de gonadotropina análogos, que têm apresentado excelentes resultados na indução da ovulação e espermição, são facilmente adquiridos e gozam de fácil dosagem e aplicação. Entre eles pode-se citar o acetato de Buserelina (ALONSO, 1997), com o nome comercial de Conceptal e fabricado pela Hoescht do Brasil, e o análogo ((Des-Gli¹⁰, D-His (Bzl)⁶, Pro-NHET⁹)-LHRH)) (FALCON e CULLEY, 1995), fabricado pela Bachem California-USA.

Segundo Agostinho et al. (2000), o emprego de hormônio sintético para a indução à ovulação e espermição é uma técnica rotineira em laboratórios. Entretanto, a utilização da técnica de fertilização artificial em ranários comerciais ainda é limitada, devido à sua complexidade e à baixa fecundidade obtida, quando se emprega a metodologia descrita nos trabalhos publicados até o momento.

3- Referências bibliográficas

AFONSO, A. M. Diagnóstico e caracterização do setor produtivo: Região do Estado do Rio de Janeiro. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, Instituto de Pesca, v. 34, p. 61-65, nov. 2003.

AGOSTINHO, C. A., WECHESLER, F. S. NICTHEROY, P. E., PINHEIRO, D. F. Indução à ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização artificial em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. 29 (5):1261-1265, 2000.

ALONSO, M. Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermição em rã touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802., 136p. **Tese (Doutorado)** - Universidade de São Paulo, 1997.

BARREIRA, V. B. Análise bacteriológica da carne de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) comercializada no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal Fluminense, 2009.

BERNARDI, N. **O Código Internacional de Nomenclatura Zoológica adotado**. XV Congresso Internacional de Zoologia, Londres, 1958. In PAPAVERO, N. Fundamentos práticos de taxonomia Zoológica. 2a Ed. São Paulo, USP, p. 189 – 264, 1994

CAROLSFELD, J. Reproductive physiology and induced breeding of fish as related to culture of *Colossomas*. In: Hernandez A. **Cultivo de Colossoma**. Bogotá: Editora Guadalupe, p.37-73, 1989.

CARVALHO FILHO, J. Ciclo de Palestras da Ranicultura traça Pannel da Atividade. **Rev. Panorama da Aqüicultura**, v.11, n.67,. p.48-53, 2001.

CONANT, R. **A field guide to reptiles and amphibians of eastern and central North America**. Boston: Houghton Mifflin Company,. 429p, 1975.

COSTA, C. L. S., LIMA, S. L., ANDRADE, D. R., AGOSTINHO, C. A. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Bras. de Zootecnia**, v.27, n.4, p.642-650, 1998.

COSTA, C. L. S. Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã-touro no sistema anfigranja. Viçosa-MG: UFV, 90p. **Tese de Mestrado** - Universidade Federal de Viçosa, 1991.

DONALDSON, E. M., HUNTER, GM. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. **Fish physiology**. New York: Academic Press, v.9, pt.B, p.351-403, 1983.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 789p, 1994.

FALCON, G.M., CULLEY, D.D. Workshop on the reproductive control of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). In: International Meeting on Frog Research and Technology & VIII ENAR- Encontro Nacional De Ranicultura, 1, Viçosa, MG. **Anais**. Viçosa: Abetra, p.245-246, 1995.

FERREIRA, C. M.; ALONSO, M.; ROMERO, W. F.; ROSA, F. C.; ARTURO, J. & PIMENTA, A. G. C. Biópsia de ovário de Rã-Touro, *Rana catesbeiana*, para verificação do estágio de maturação gonadal. In: IX Simpósio Brasileiro de Aquicultura. 9, Sete Lagoas, MG. **Anais**. Sete Lagoas. Associação Brasileira de Aquicultura, p. 170, 1996.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C & PAIVA-NETO, J. S. Introdução à Ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, 33, 15 p, 2001.

FERREIRA, C. M.; FRANÇA, F. M., DIAS, D. C. & RANZANI-PAIVA, M. J. Análises hematológicas em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). In: III Encontro Latino-Americano de Patologistas de Organismos Aquáticos e VII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (III ELAPOA e VII ENBRAPOA). Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. Foz do Iguaçu, Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos. p.50, 2002.

FLORES-NAVA, A.,. An overview of frog farming in Mexico. Proc. Info Fish-Aquatech '94. **INFOFISH**, Kuala Lumpur, Malaysia, p. 131–137, 1995.

FLORES-NAVA, A., **Cultivo Intensivo de Rana Toro**. Programa Regional de Apoyo al Desarrollo de la Pesca en el Istmo Centro americano-Unión Europea, Panamá, Rep. de Panamá. 42 p., 1999.

FLORES-NAVA, A. **Generalidades del cultivo de la rana toro *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802**. In: Jaramillo, J.T., Olivera, J., Velásquez, J. (Eds.), Manejo y Reproducción de Vida Silvestre. Univ. Aut. Metropol., México, p. 211–233, 2001.

FLORES-NAVA, A. Cultured Aquatic Species Information Programme — *Rana catesbeiana*. FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). **Cultured Aquatic Species Fact Sheets**. FAO, Rome. Updated Fri Apr 21 11:41:24 CEST 2006. http://www.fao.org/figis/servlet/static?dom=culturespecies&xml=Rana_catesbeiana

FONTANELLO, D.; ARRUDA SOARES, H.; MANDELLI JR., J.; SANTOS, L.E.; PENTEADO, L.A.; CAMPOS, B.E.S.; REIS, J.M. Estação de reprodução da *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, criadas em ranário comercial e a influência de fatores climáticos sobre o número de desovas. **B. Inst. Pesca**, 11 (único): p. 123-130, 1984.

FRANÇA, F. M. Utilização do hormônio tiroxina na metamorfose de girinos de rã-touro. **B. Inst. Pesca**, v.34, p.7-11, 2003.

FROST, D. R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R. H., HAAS, A. The amphibian tree of life. **Bulletin Of The American Museum Of Natural History**, vol.297, 370p, 2006.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Electronic Database acessado em <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American> Museum of Natural History, New York, USA. 2011.

GEORGE, I. D. Late external sex distinction of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) based on tympanum measurements. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.4, p.255-259, 1938.

GEORGE, I. D. A study of the bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw, at Baton Rouge. **Ph. D. Thesis**, 96 p. University of Michigan, Ann Arbor, 1940.

HARVEY, B., CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC, p.144, 1993.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. www.ibama.gov.br, acessado em agosto de 2009.

LIMA, S. L., COSTA, C. L. S., AGOSTINHO, C. A., ANDRADE, D. R., FILHO, H. P. P. Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Bras. de Zootecnia**, v.27, n.3, p.416-420, 1998.

LIMA, S. L., AGOSTINHO, C. A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 168p, 1992.

LIMA, S. L.; Agostinho, C. A. **A Criação de Rãs**. 2ªed., São Paulo: Globo, 187p, 1989.

MOODIE, G.E.E. Observations on the life history of the caecilian *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril and Bibron) in the Amazon Basin. **Canadian Journal of Zoology**: 1005-1008, 1978.

MOURA, O. M. Ranários da região Nordeste do Brasil. **B. Inst. Pesca**, 34: 92-95, 2003.

MOYLE, P. B. Effects of introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin Valley. **Copeia**, v.1, p. 18-22. 1973.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. A Embrapa e a aquicultura. Demandas e prioridades de pesquisa. Texto para Discussão, Embrapa/Brasília, 11: 1-40, 2002.

RODRÍGUEZ-SERNA, M.; FLORES-NAVA, A.; OLIVERA-NOVOA, M. A.; CARMONA-OSALDE, C. Growth and production of bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, at three stocking densities in a vertical intensive culture system. **Aquacultural Engineering**, v.15, p.233-242, 1996.

RUFFNER, B. M. **Practical frog raising**. Louisiana: Southern Frog Farms, Jennings. 80p, 1933.

SCHROEDER, E. E.; BASKETT, T. S. Age estimation, growth rate, and population structure in Missouri bullfrog. **Copeia**, p.583-592, 1968.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; VALENTE, D.; MENDES, E. G. A tetrodotoxin-like substance found in the brazilian frog *Brachycephalus ephippium*. **Toxicon** 24:799-806, 1986.

STEBBLINS, R. C. **Amphibians and reptiles of western North America**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill. 537p, 1954.

STORER, T.I. e USINGER, R.L. **Zoologia Geral**. 6a ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo, 1991.

TEIXEIRA, R. D.; MELLO, S. C. R. P.; SANTOS, C. A. M. L. dos. The world market for frog legs. GLOBEFISH, FAO's **Fishery Industries Division**, Rome, Italy, v. 68, jun 2001.

VIZOTTO, L. D. Aspecto técnicos da ranicultura. In: Encontro Nacional de Ranicultura. 1. Brasília. **Anais...** Brasília. Ministério da Agricultura. p.28-69, 1979.

WRIGHT, A. H. & WRIGHT, A. A. **Handbook of frogs and toads of the United States and Canada**. New York: Comstock Publishing Company. 3 ed. 640p, 1949.

ZOHAR, Y. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth, and smoltification. **Fish Physiol Biochem**, v.7, p.395-405, 1989.

4-Artigo científico

INDUCED BREEDING OF BULLFROG, *Lithobates catesbeianus*, USING DIFFERENT TYPES AND DOSAGES OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONES - GnRH.

Sandro R. da Costa¹, Athiê J. G. Santos, Alex Poeta Casali e Antônio Rosendo da Costa

¹Master Program PPGRPAq of the Federal Rural University of Pernambuco,
e-mail: sandroricardocosta@gmail.com, Recife, PE, Brasil;

Abstract

The technique for using gonadotrophin releasing hormone (GnRH) on the reproduction of amphibians can be used to control the spawns throughout the year, avoiding production delays resulting from the seasonality of the reproductive cycle of this species. Given the above, the objective of this research was to study the induced breeding of bullfrog *Lithobates catesbeianus* using different types and dosages of GnRH to aim for the hormone optimization and a consequent reduction in operating costs in commercial production. Breeders have been previously prepared, and conditioned to an average temperature of 26°C, photoperiod of 15 h light, and fed chow 45 % CP and average weight of 650 g. The breeders were subjected to three hormone applications at intervals of 12 h and three different treatments, treatment 1 (T1) with 5 µg of Etilamid, treatment 2 (T2) 2.5 µg of Etilamid and treatment 3 (T3) with 0.8 µg of Buserelin acetate. After 12 hours it was made extrusion of eggs in females and spermiation in males, fertilized eggs and moisturizing with water of neutral pH. All males answered to the treatment resulting in pool of sperm that was used to fertilize the females. Treatment of females ovulated T1 and T2 in its entirety and there was one failure only in T3. Dosages of 2.5 µg Etilamid and 0.8 µg Buserelin acetate are more technically and economic viable for induced breeding of bullfrog. The average weight of spawning was 92.8 and 93.7 g respectively. The fertilization rate was 84.2 % (T2) and 60.3 % (T3). Based on the results, we conclude that the reduction in usual dosages for Etilamid hydrated acetate and the use of Buserelin acetate were efficient on ovulation and spermiation in bullfrogs, but it is necessary to adjust the dosage of Buserelin acetate as well to get a better improvement through environmental control and breeder maturation conditions in further experiments.

Key words: *Rana*, frog culture, applied ethology, animal behavior, captive.

Introduction

The frog culture in Brazil began in the 30s, when Tom Harrison Cyril brought from North America the first couples of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802). This species has quickly adapted the geo-climatic conditions in Brazil, due to its rusticity, maturation precocity and high prolificacy, which can be able to produce more than 10,000 eggs in each posture. (Ferreira et al, 2001; Lima et al, 1998).

According to Lima et al. (1998), the bullfrog is the species most used in the frog farmers in Brazil, spite of that, there is still a little information available regarding the reproductive cycle of this species, which may causes some difficulties in achieving adequate management and control of the breeding stock.

At the beginning of gonadal development occurs an increase in the level of gonadotropin in the pituitary and plasma, probably serving to recruit oocytes and initiate vitellogenesis in the reproductive chain (Zohar, 1989). This elevation of gonadotropin stimulates an increase in the concentration of testosterone and estrogen, however, these levels decrease rapidly (Carolsfeld, 1989). Through the application of gonadotropin hormones in bullfrog is possible to obtain spawning over a longer period of time, when compared with those under natural conditions. It is known that in this species, under controlled experimental conditions, the “rest” stage of the ovaries was not diagnosed, suggesting that the oogenesis is continuous activity in these animals, bringing soon their ovaries to the “intermediate” stage of maturation after ovulation occurrence (Costa et al., 1998).

The use of gonadotropin releasing hormone (GnRH) can control spawns of bullfrogs throughout the year, avoiding delays in the eggs productions, due to the seasonality of the reproductive cycle of this species. The GnRH (Gonadotropin releasing hormone) acetate of Buserelin showed to be effective in inducing spawning of bullfrog (Alonso, 1997). This hormone is easily found in agricultural market places in Brazil with low price. On the other hand, the hydrated acetate Ethylamid is also commonly used in inducing bullfrog reproduction, however is acquired only through imports with higher prices.

The objective of this research, therefore, was to study the induced breeding of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*, using these two different types of GnRH and dosages, in order to optimize operating costs in the commercial production.

Material e Methods

The experiments were carried out at the Laboratory of Frog Breeding and Aquaculture Products (LRPA), belonging to the Federal University of Paraíba (UFPB), located at Bananeiras City, PB (Latitude 06 ° 45 '00 S", Longitude 35 ° 38'00 W" and altitude of 520 m), between September/2010 and May/2011.

Biologic material

A total of 82 bullfrogs (39 males and 43 females of *Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802) were used in the experiments. The body weight of the frogs varied between 395-735 g (average: 565 g) for males and 420-785 g (average: 602,5 g) for females. Males and females were previously acclimated in a fiberglass structure, denominated “breeders bail maintenance”. Here, the frogs were fed daily *ad libitum* with a 45 % gross protein pelleted food, applied in the presence of fly larvae *Musca domestica*, to promote the food catching. The water temperature inside the breeders bail was 26°C, with constant photoperiod of 15 hours light and 9 hours dark (15L-9D). The frogs were kept under this controlled condition for at least a month before starting the experiments, in order to assure their gonadal maturation. Mature males and females were selected for the experiments according to their state of health, female belly volume, and clear evidences of others secondary mature sexual characteristics, such as color of the goiter region, the presence of the bridal callus on anterior toes of males and ability to embrace.

Frogs Spawning bails structures and handlings

At each trial, mature males and females frogs were transferred from the breeders bail maintenance to the small spawning-bails structures, as proposed by Lima and Agostinho (1992) and described by Casali (2010). Each spawning-bail had the capacity for 55,000 cc in water volume and to keep three mature males or females' frogs. The structure contained a heated swimming pool, shelter and feeding place. During the trials, however, the animals were not fed, in order to not contaminate the eggs and sperms

samples collections. Just before ovulation, the water in the female spawning bails was also drained out, to void the eggs hydration caused by some spontaneous spawning occurrence.

Induced spawning and artificial fertilization

The numbers of bullfrog females, kind of hormones/dosages used in each experiment (trials) are indicted in Table 1.

Table 1. Number of female frog and hormones concentrations per animal used in each trial, between Sept/2010 and May.2011 (aE: acetate of Ethylamide; aB: acetate of Buserelin)

Trials	Hormones and dosages					No. Females
	5,0µg/aE	2,5µgaE	0,4µgaB	0,8µgaB	1,6 µgaB	
1st	3	3	----	3	----	9
2sd	----	----	5	5	5	15
3rd	----	12	----	7	----	19
Total	3	15	5	15	5	43

The body weight of the frogs varied between 395-735g for males and 420-785g for females, among all groups. Notes: A pull of 9, 15 and 15 mature males were used in the first, second and third trials, respectively.

As indicated in Table 1, nine mature females and males frogs were used in the first trial. They were divided equally in three groups: females in group 1 (G1) received 5,0 µg of the acetate of Ethylamid, an concentration commonly used in the frog nursery. The group 2 (G2) received the same hormone of the G1, bur at a reduced concentration of 2,5 µg, while the group 3 (G3) received only 0,8 µg of acetate of Buserelin, as a new hormone concentration test. All females frog were subjected to three applications of the hormones, with an interval of 12 hours.

Twelve hours after the last injection, all females were checked for the ovulation occurrence. The ovulation was detected when the eggs came out from the cloaca with a light pressure on the frog belly. After ovulation occurrence, the eggs were strip out and

fertilized with newly collected sperms. Every each female in the same group was counted as a replication.

The nine mature male's frogs were also divided equally in three groups and received the same kind of hormone and concentrations as the females did, except for the number of injection that was only a single one. Thirty minutes after hormonal injection, spermatic fluid was taken from male cloaca with volumetric pipette and placed in a beaker surrounded with ice. When needed, sperm fluids from the same male were taken twice or more, but always at every 10 minutes intervals.



Fig.1-Procedures of induced breeding of bullfrog: hormone application, extrusion, spermiation and fertilized and hydrated eggs.

The fertilization (Fig. 1) was done by adding 2 ml of the spermatic fluid in 4 g of ovules sample and mixed with 4 ml of water (pH between 7.0 and 7.5) in a 200 ml glass recipient. Here, the gametes were mixed up for three minutes and then transferred to a 20 L capacity plastic box ("incubator"), in which 2 L of water was immediately added. A liter of water was placed every day in each incubator until the larvae hatched out. For the hatching rate were used three replications of 4 grams of ovules per each female.

The estimated total number of eggs in 4 g sample was determined as follows: $NT = (VT * Na) / Va$, where NT = total number of eggs, VT = total volume of spawning, Na= number of eggs in the sample and Va = volume of the sample.

Hatching rate was calculated as follows: $F = (NL/NT) * 100$, where F= hatching rate, NL= total number of alive larvae and NT= total number of eggs incubated.

For the second trial, 15 mature females were used. They were divided equally in three groups. In order to determine the efficiency of the Buserelin hormone in different dosages, the females of the groups received the hormone concentration as follow: 0.4µgaB (G4), 0.8 µgaB (G5) and 1.6µgaB (G6).

In this trial, a total of fifteen mature males were used. All males received a unique dosage of 0.8 µgaB. The fertilization procedures and hatching rate calculation were done as same as described in the first trial.

In the third trial, the real effects of the acetate of Ethylamid at a low dosage of 2.5µg and the acetate of Buserelin at the dosage of 0.8µg were tested again. The total of 19 mature females and 15 males were used in this trial. The female frogs were divided in two groups: the group 1 (G7) was constituted of 12 females and received the dosage of 2.5µg aE, while the rest 7 females received the dosage of 0.8µgaB (G8), totalizing the number of 15 females tested with these hormones and dosages. (Table 1)

All males received a unique dosage of 5.0µgaE, which is normally used in inducing male's reproduction. The fertilization procedures and hatching rate calculation were done as same as described in all trials.

Statistical Analysis

In order to verify the normality of the ovules amount estimated by the ovules volume samples, every averages numbers counted in 2g ovary samples were subjected to Shapiro-Wilk test. The variation coefficient (CV) was used to verify the homogeneity of the samples date inside the groups and the analysis of variance (ANOVA) to investigate if there was significative statistics difference among the hatching rates. Spawning weight (weight of extruded ovules) and hatching ratio averages were calculated only from the ovulated females. The ANOVA was performed using software Excel and BioEstat version 5.0 (AYRES et al., 2007). The proportionality (χ^2 and χ^2) test was used to verify if there was statistic difference

between the proportion of ovulated female frog induced with different hormones and dosages. The level of significance for the variance testes was $\alpha=0,05$ (ZAR, 1996).

Results and Discussion

The technique of induced breeding in bullfrog has been studied by some researchers and has shown promising results in order to minimize the influence on of environmental conditions on its controlled reproduction (Ribeiro Filho et al, 1998; Agostinho et al, 2000) and facilitating increases in the frog culture production.

The present investigation, however, provides important results on the two most commonly inductors of ovulation and spermiation in bullfrog; the acetate of Ethylamide and acetate of Buserelin at different dosages.

The main variables results obtained from the females bullfrog induced with both hormones at different dosages during the first trial are indicate in Table 2. Most of the females bullfrog ovulated with both hormone, except one female induced with 0.8 μgaB (G3). The best spawning weight and hatching rate were obtained in the group of females that received only 2.5 μgaE (G2), showing a high efficiency of this hormone with a reduced dosage, indicating the possibility of that a lower concentration of this hormone can be applied in bullfrog induced reproduction.

All females in this group ovulated, with hatching rate average of 84.3 %. The lowest hatching rate was observed in 0.5 μgaE hormone dosage. Although all selected females in this group were considered mature (Lima et al, 1998), they did not showed high fecundity, producing small amount of ovules, probably with low gametes quality in comparison to the others groups. In teleost fish, high mature females can produce high levels of estradiol hormone in plasma, which can act as inhibitor factor of the GnRH (Gonadotropin Release Hormone) in pituitary gland, affecting negatively GtH (Gonadotropic Hormone) discharge and oocyte ovulation (Zanuy and Carrilo, 1987). Handling can also effect ovulation by the discharge of the dopamine in the brain, which also blocks the action of the GnRH. (Bombardellis et al, 2006).

Table 2. Main variables results obtained from the females bullfrog induced with the acetate of Ethylamide and acetate of Buserelin at different dosages during the first trial.

Dosage and/ Females No.	Variables			
	Female body weight (g)	Ovulation Occurrence (%)	Spawning weight (g)	Hatching (%)
G1 (5.0 µgaE)				
1	590	Pos.	45	7.3
2	640	Pos.	35	0
3	685	Pos.	70	0
Average	638.3^a	100	50^a	2.4^a
G2 (2.5 µgaE)				
1	545	Pos.	95	86.4
2	580	Pos.	130	76.2
3	740	Pos.	130	90.2
Average	621.7^a	100	118.3^b	84.3^b
G3 (0.8 µgaB)				
1	785	Pos.	135	41.1
2	695	Pos.	50	30.1
3	665	Neg.	-	-
Average	715^a	66.6	92.5^b	35.6^c

Equal letters in columns means no statistic difference ($\alpha=0.05$).

Eventual observation showed that the ovulation in bullfrog female can be obtained in laboratory with the GnRH acetate of Buserelin (Santos, 2007, unpublished paper).

In fact, 66.6 % of the female induced with 0.8 µgaB (G3), ovulated in the present study (Table 2). The hatching rate average among them was only 35.6 %, but higher than that obtained in the female induced with 5.0 µgaE dosage, which is commonly used in the bullfrog nursery (Casali, A.P., personal communication).

One female in G3 group could spawn 135 g of ovules, showing a good production of ovulated oocytes, when compared with the other groups.

Important to note that all males spermiated either with the acetate of Ethylamide or the acetate of Buserelin hormone. The same result was observed by Alonso (1997), when used this last hormone in bullfrog males.

In the second trial, where only the acetate of Buserelin hormone was used, it can be observed that no ovulation occurred in the group of females induced with 0.4 µg dosage (G4). Sixty per cent ovulated in the group induced with 0.8 µg (G5), while 80 % ovulated in the group induced with 1.6 µg (G6).

Among the ovulated females, the hatching rates were 74 % and 84.9 %, in G5 and G6, respectively, and showed no significant difference ($p\text{-value} > 0.05$) between them (Table 3), but with better breeding performance in the 1.6 µg dosage.

Correlation between the hatching rates among the females and dosages of the hormone used in the groups is indicted in Figure 1. The relation was $y = 74.228x - 18.638$ with high adherence of the points ($r^2 = 0.9058$).

From the present result, it can be only stated that the minimum efficient dosage with the acetate of Buserelin is between 0.4 µg and 0.8 µg.

Although many works have been done on the inducing breeding of bullfrogs (Alonso, 1997; Afonso, 2004; Tortelly Neto, 2006; Pereira, 2009), the minimum and maximum limits of the efficient dosage of the acetate of Buserelin hormone to induce ovulation and spermiation in bullfrog, still remained to be completely established.

Table 3. Main variables results obtained from the females bullfrog induced only with the acetate of Buserelin hormone at different dosages, during the second trial.

Dosage and/ Females No.	Variables			
	Female body	Ovulation	Spawning weight	Hatching
	weight (g)	Occurrence (%)	(g)	(%)
G4 (4,0 µgaB)				
1	635	Neg.	-	-
2	565	Neg.	-	-
3	620	Neg.	-	-
4	475	Neg.	-	-
5	605	Neg.	-	-
Average	580^a	0	0	0

G5 (0,8 µgaB)				
1	465	Pos.	71,6	57,3
2	545	Pos.	46,5	72,5
3	560	Neg.	-	-
4	635	Pos.	93,3	92,3
5	735	Neg.	-	-
Average	588^a	60	70,5^a	74,0^a
G6 (1,6 µgaB)				
1	555	Pos.	38,6	77,7
2	420	Neg.	-	-
3	640	Pos.	71,5	94,6
4	515	Pos.	111,5	73,1
5	770	Pos.	105,5	94,3
Average	580^a	80	81,8^a	84,9^a

Equal letters in columns means no statistic difference ($\alpha=0,05$).

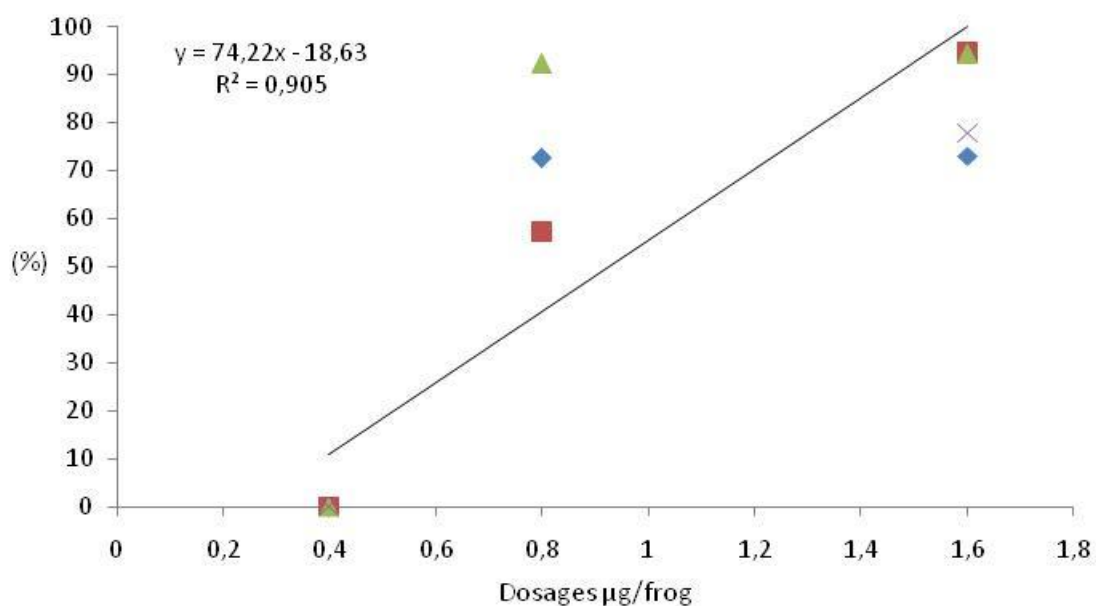


Fig. 2- Correlation between the hatching rate in bullfrog females ovulated with the Buserelin hormone at different dosages during the second trial.

From the first and second trials, it could be detected that the dosages of 2.5 µgaE and 0.8 µgaB are more technically and economic viable for bullfrog, since they could induce ovulation successful with lower dosages. Indeed, 75 % and 86 % of the total number of females ovulated with the above respectively dosages during the third trial. (Table 4), which is considered a high index of ovulated animal in the commercial frog nursery field condition.

The main variables results obtained from the females among the groups induced only with the dosages of 2.5 µgaE and 0.8 µgaB could be summarized in Table 5. The results showed that 80 % and 73.3 % (average values) of the total number of the females ovulated with the above mentioned dosages, respectively. The hatching rate in the acetate of Ethylamide hormone varied from minimum of 40.1 % to maximum of 98.3 %, both values observed in the group G7. With the acetate of Buserelin, the rates varied from 19.0 % to 94.6 %, both also in the group G7.

Table 4. Main variables results obtained from the females bullfrog induced with the acetate of Ethylamide and acetate of Buserelin hormones at two selected dosages in the third.

Dosage and/ Females No.	Variables			
	Female body	Ovulation	Spawning weight	Hatching
	weight (g)	Occurrence (%)	(g)	(%)
G7 (2.5 µgaE)				
1	545	Pos.	91.2	40.1
2	515	Neg.	-	-
3	625	Pos.	71.1	91.4
4	470	Neg.	-	-
5	530	Neg.	-	-
6	570	Pos.	67.9	98.3
7	495	Pos.	61.6	97.0
8	575	Pos.	77.7	83.4

9	610	Pos.	61.7	68.6
10	580	Pos.	115.7	91.9
11	560	Pos.	98.2	94.0
12	560	Pos.	114	92.6
Average	553^a	75%	84.3^a	84.1^a
G8 (0.8 µgB)				
1	630	Pos.	84.4	42.1
2	710	Pos.	121.2	86.3
3	735	Pos.	80.1	19.0
4	770	Neg.	-	-
5	680	Pos.	136.5	94.6
6	745	Pos.	132.3	82.2
7	700	Pos.	80.2	46.3
Average	710^b	86%	105.8^a	61.7%^a

Equal letters in columns means no statistic difference ($\alpha=0,05$).

Spite of the significant difference (p-value > 0.05) in the hatching rate between these two groups, there was no significant difference (p-value < 0.05) in the spawning weight, indicating that both hormones dosages do not influence the production of ovulated oocytes. There was a low correlation ($r^2 = 0.0619$) between the spawning weight and hatching rate (fig 2). Many factors, however, could have influenced the hatching rate between these two groups; a negative physiological factor caused by the handling or other physiological mechanism not yet identified in the reproductive system of the specie that could have also influenced the quality of the gametes. Important to note that all females in the present study were classified as “mature” by the external features of the animals (a secondary sexual characteristics), but not examined from the endocronologic point of view (Rodrigues, 2005). As it happens in fish, levels of sex steroids, such as progesterone, circulation in plasma before and after the injection of synthetic GnRH can influence ovulation performance. (Muniz et al, 2008)

Table 5. Summarized results of the main variables obtained from the bullfrogs female induced with the dosage of 2.5 µgaE and 0.8 µgaB in the present investigation.

Dosage and/ Females Grp.No	Variables			
	Female body	Ovulation	Spawning weight	Hatching
	weight (g)	Occurrence (%)	(g)	(%)
(2.5 µgaE)				
G1	590	Pos.	95	86.4
G1	640	Pos.	130	76.2
G1	685	Pos.	130	90.2
G7	545	Pos.	91.2	40.1
G7	515	Neg.	-	-
G7	625	Pos.	71.1	91.4
G7	470	Neg.	-	-
G7	530	Neg.	-	-
G7	570	Pos.	67.9	98.3
G7	495	Pos.	61.6	97.0
G7	575	Pos.	77.7	83.4
G7	610	Pos.	61.7	68.6
G7	580	Pos.	115.7	91.9
G7	560	Pos.	98.2	94.0
G7	560	Pos.	114	92.6
Average	570^a	80%^a	92.8^a	84.2^a
(0.8 µgaB)				
G1	785	Pos.	135	41.1
G1	695	Pos.	50	30.1
G1	665	Neg.	-	-
G5	465	Pos.	71.6	57.3
G5	545	Pos.	46.5	72.5
G5	560	Neg.	-	-

G5	635	Pos.	93.3	92.3
G5	735	Neg.	-	-
G7	630	Pos.	84.4	42.1
G7	710	Pos.	121.2	86.3
G7	735	Pos.	80.1	19.0
G7	770	Neg.	-	-
G7	680	Pos.	136.5	94.6
G7	745	Pos.	132.3	82.2
G7	700	Pos.	80.2	46.3
Average	670,3^a	73,3%^a	93.7^a	60.3^b

Equal letters in columns means no statistic difference ($\alpha=0.05$).

Modified fertilization protocols may also improve the hatching rate in bullfrog. Recent studies on inducing spermiation on bullfrog male showed better results when the semen were collected one hour after application of the hormone (Agostinho et al, 2011; Pereira, 2009). In the present investigation, the semen were collected at 30 minutes after hormone application and this can also explain the low hatching rate observed in the groups.

Animal acclimation is also very important for the controlled reproduction in bullfrog. (Agostinho et al., 2002). According to Agostinho et al (2011), induction of ovulation was more effective when the bullfrog female were kept under 16 hours light, and less effective under 12 hours light and constant dark. High water temperature (28.7°C) can also enhance gonadal maturation of the specie (Figueiredo et al 2001). It seems that season of the year, in the same way, can influence the induced reproduction in bullfrog, as it happens in fish (Sheperd & Bromage, 1988; Woynarovich & Horvvath, 1983; Ohta et al, 1996). Ovulation performance was not uniform when the bullfrogs were submitted to spawn during a cold (July) and hotter season (September and December) (Agostinho, 2000).

Under the environmental conditions presented in the present investigation it can be concluded that the dosage of 0.8 µg acetate of Buserelin and 2.5 µg of acetate of Ethylamide/bullfrog is highly recommended as a new tool in the bullfrog induced reproduction procedures, for its efficiency and lower cost production methodology.

Acknowledgments

Thanks are due to Federal University of Paraíba, Brazil for the use of their facilities. This study was sponsored by a grant and scholarships from the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES).

References

- Afonso, A. F. Efeito do acetato de buserelina na indução á reprodução de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2004, 86 p.
- Agostinho, C. A., Wechesler, F. S. Nictheroy, P. E.; Pinheiro, D. F. Indução à ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização artificial em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. 29 (5): 1261-1265, 2000.
- Agostinho, C. A.; Wechsler, F. S.; Castro, C. S.; Agostinho, L. M.; Ribeiro, R. R.; Agostinho, S. M. M. Time interval from ovulation to extrusion in female bullfrog in different photoperiods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40(8), 1625-1628, 2011.
- Agostinho, C. A.; Chaves, M. A.; Lima, S. L. Curva de crescimento de rã-touro criada em laboratório. In Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 39.2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002.1CD.
- Alonso, M. Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermiação em rã touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. **Tese (Doutorado)** - Universidade de São Paulo. São Paulo, SP: USP, 1997. 136p.

Ayres, M; Ayres Jr., M. Ayres, D. L. Santos, A. A. S. **Biostat 5.0**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 364 p. 2007.

Bombardellis, R. A., Syperreck, M. A., & Sanches, E. A. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: Aspectos básicos e suas aplicações. **Arq. ciên. vet. zool.** Jan/Jun 2006. pp. 59-65.

Carolsfeld, J. Reproductive physiology and induced breeding of fish as related to culture of Colossomas. In: Hernandez A. **Cultivo de Colossoma**. Bogotá: Editora Guadalupe, 1989. p.37-73.

Casali, A. P. Atividades comportamentais e comportamento alimentar de rã touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), de pigmentação normal e albina em cativeiro. **Tese (Doutorado)**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

Costa, C. L. S., Lima, S. L., Andrade, D. R., Agostinho, C. A. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Bras. de Zootecnia**, 27(4), 642-650, 1998.

Ferreira, C. M.; Pimenta, A. G. C & Paiva - Neto, J. S. 2001 Introdução à Ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, 33, 15 p

Figueiredo, M. R. C., Agostinho, C. A., Baêta, F. C. & Lima, S. L. (2001). Efeito da temperatura e do fotoperíodo sobre o desenvolvimento do aparelho reprodutor de Rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(3), 916-923.

Lima, S. L., Costa, C. L. S., Agostinho, C. A., Andrade, D. R., Filho, H. P. P. Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Bras. de Zootecnia**, 27(3), 416-420, 1998.

Lima, S. L., Agostinho, C. A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1992. 168p.

Muniz, J. A., Catanho, M. J., & Santos, A. G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818).. **B Inst. Pesca**, 34(2), 2008. pp. 205-211.

Ohta, H.; Kagawa, H.; Tanaka, H. et al. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguila japonica*. **Aquaculture**, 1(39), 291-301, 1996.

Pereira, M. M. Indução à espermiacção e características seminais do anuro nativo rã-manteiga (*Leptodactylus ocellatus*) e do exótico rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2009, 75 p.

Ramos, E. M. Características alométricas e químicas de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). 2000. 103 p. **Dissertação (Mestrado)** Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, MG.

Ribeiro Filho, O. P., Lima, S. L., Andrade, D. R., Seixas Filho, J. T. Estudo da desova de rã-touro, *Rana catesbeiana*, mediante indução do acasalamento. **Rev. Bras. Zootec.**, 27(4): 658-663, 1998.

Rodrigues, M. L. Curva de crescimento média e efeitos de energia e relação energia/proteína sobre o desempenho e fecundidade da rã-touro. **Tese (Doutorado)**, Universidade Federal da Paraíba, 2005, 87.

Sheperd, J.; Bromage, N. **Intensive fish farming**, first publishing, Billing & sons Ltd, Worcester, 1988, 404p.

Tortelly Neto, R. Tempos de coleta, avaliação espermática e histopatologia de machos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 2006, 37p.

Wojnarovich, E.; Horvvath, L.A. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. 80 p.

Zanuy, S.; Carrillo, M. La reproduccion de los teleosteos y su aplicacion en acuicultura; In: Monteros, J.E; Labata, U. (Ed). **Reproduccion en Acuicultura**, Madri, 1987, p.1-132.

Zar, J. H. **Biostatistical Analysis**. 3rd. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA. 1996, 662 p.

Zohar, Y. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth, and smoltification. **Fish Physiol Biochem**, 7, 395-405, 1989.

4.1- Normas da Revista AQUACULTURE RESEARCH

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA AQUACULTURE RESEARCH

<http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=1355-557x>

TopAuthor Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6.

After Acceptance. Relevant Documents: Exclusive Licence Form, Colour Work Agreement Form Useful Websites: Submission Site, Articles published in Aquaculture Research, Author Services, Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

All sections of the typescript should be on one side of A4 paper, double-spaced and with 30mm margins. A font size of 12pt should be used. Line numbering should be included, with numbering to continue from the first line to the end of the text (reference list). Line numbers should be continuous throughout the manuscript and NOT start over on each page. Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editors. Authors will be notified when a decision on their paper is reached. Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. Japanese authors can

also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Manuscripts in which poor English makes it difficult or impossible to review will be returned to authors without review.

Units and Spellings: Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL⁻¹. Use the form g mL⁻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.

5.2. Structure A manuscript (original article) 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 location (town, state/county, country) included. 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.

Optimizing Your Abstract for Search Engines Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/ or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article. 5.3. 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. Lie 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. For example: 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.

The Editor and Publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable

138 online published material should have - see www.doi.org/ for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable. 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: www.endnote.com/support/enstyles.asp

Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: 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. Figures: Illustrations should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig.1, Fig.2 etc. in order of appearance. Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling, including scale bars if necessary, should be clearly indicated. Magnifications should be included in the legend. Line drawings should be on separate sheets of paper; 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.

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

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Blackwell Publishing's

guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> Check your electronic artwork before submitting it: www.blackwellpublishing.com/bauthor/eachecklist.asp. Permissions: If all or parts of previously published tables and figures are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher. Colour Charges: 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 139 Publishing require you to complete and return a Colour Work Agreement Form before your paper can be published. Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor are@wiley.com. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, Aquaculture Research offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Figure Legends: 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.