



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PARASITÁRIA DE *Prochilodus argenteus* E
Astyanax aff. bimaculatus DO BAIXO SÃO FRANCISCO- SERGIPE**

ALESSA CAROLINE PEDROZA DE VASCONCELOS

ARACAJU
Fevereiro – 2013



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PARASITÁRIA DE *Prochilodus argenteus* E
Astyanax aff. bimaculatus DO BAIXO SÃO FRANCISCO- SERGIPE**

Dissertação de Mestrado
submetida à banca examinadora
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Saúde e Ambiente, na área de
concentração em Saúde e
Ambiente.

ALESSA CAROLINE PEDROZA DE VASCONCELOS

**ORIENTADOR:
RUBENS RISCALA MADI, D. Sc.**

ARACAJU
Fevereiro – 2013

V331d Vasconcelos, ALESSA CAROLINE PEDROZA DE
Diversidade genética e parasitária de *Prochilodus argenteus* e *Astyanax* aff
bimaculatus do baixo São Francisco-Sergipe. / ALESSA CAROLINE PEDROZA
VASCONCELOS; orientador: RUBENS RISCALA MADI. – Aracaju, 2013.

55p. : il
Inclui bibliografia.

Dissertação de mestrado (Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1. Ictioparasitas 2. Diversidade genética. 3. *Prochilodus argenteus*. 4. *Astyanax*
aff *bimaculatus*. 5. Baixo São Francisco. I. Madi, Rubens Riscala. (orient.) II.
Universidade Tiradentes. III. Título.

CDU: 504:591.69:639.3.09

ALESSA CAROLINE PEDROZA DE VASCONCELOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA E PARASITÁRIA DE *Prochilodus argenteus* E
Astyanax aff. bimaculatus DO BAIXO SÃO FRANCISCO- SERGIPE**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rubens Riscala Madi (Orientador)
Universidade Tiradentes – UNIT

Profa. Dra. Cláudia Moura Melo
Universidade Tiradentes - UNIT

Prof. Dr. José Alberto Iannacone-Oliver
Universidad Nacional Federico Villareal

Profa. Dra. Verónica de Lourdes Sierpe Jeraldo
Universidade Tiradentes - UNIT

Prof. Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto
Embrapa – Tabuleiro dos Costeiros

EPÍGRAFE

*“Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

(Fernando Pessoa)

DEDICATÓRIA

À minha família, meu porto seguro e minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo apoio e conforto espiritual em todos os momentos da minha caminhada.

Aos meus pais Luiz e Delza pelo apoio incondicional em todas as horas e pelo incentivo para o meu crescimento intelectual e profissional. Amo vocês!

Ao meu irmão Alisson pelo carinho a mim dedicado sempre na torcida pelo o meu melhor. Obrigada!

Ao meu sobrinho Matheus pelo companheirismo mesmo sem saber direito o que eu estava fazendo... obrigada por tentar ficar acordado ao meu lado durante as madrugadas. Você é um príncipe!

Ao meu namorado Higor pela paciência, dedicação e companheirismo em todos os momentos dessa jornada. Obrigada Coração!

A toda a minha família que direta ou indiretamente contribuíram para o meu sucesso.

Ao meu orientador Rubens Madi pelas orientações, apoio e ensinamentos à mim dedicados. Obrigada!

A Prof. Dr. Cláudia Melo pela ajuda e apoio no meu entendimento sobre biologia molecular. Muito obrigada!

A Prof. Dr. Veronica Sierpe pelas colaborações nas bancas.

Ao Cnpq pela bolsa de estudos a mim concedida para que eu pudesse iniciar e terminar todo o meu Mestrado e a CAPES pelo financiamento do PROCAD - NF2009

A Eng. Ana Helena Silva, do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Betume (CODEVASF) e a Piscicultura São Francisco por permitir que as coletas dos peixes fossem feitas.

Aos alunos Danilo Maciel, Joane Marília dos Santos, Camila de Almeida, Danielle Maia, Paloma Felix e Hallana Santos pela colaboração durante esses anos de pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado pelo acolhimento e carinho em especial a minha amiga Adriana Guimarães pelo apoio e companheirismo durante toda a jornada! A Isana Leal pelo carinho e conversas nos corredores do ITP. Rose Nely Pereira Filho pelo apoio no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural. A todos os meus professores e ao coordenador do programa Ricardo Albuquerque Jr. pelos ensinamentos.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | Xii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1- Objetivo Geral..... | 3 |
| 2.2- Objetivos Específicos..... | 3 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 3.1- Aquicultura e pesca..... | 4 |
| 3.2- Parasitas..... | 7 |
| 3.3- Biologia Molecular..... | 9 |
| 3.4- <i>Prochilodus argenteus</i> | 11 |
| 3.5- <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> | 11 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| 4.1- Áreas de estudo..... | 12 |
| 4.2- Coleta de peixes..... | 14 |
| 4.3- Avaliação parasitária..... | 15 |
| 4.4- Avaliação molecular..... | 16 |
| 5. ARTIGO 1- Fauna parasitária e variabilidade genética de <i>Prochilodus argenteus</i> Spix & Agassiz, 1829 cultivados no Rio São Francisco, Sergipe, Brasil..... | 18 |
| 6. ARTIGO 2- Análise molecular e biodiversidade de metazoários parasitas do lambari-de-rabo-amarelo, <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> (Teleostei; Characidae), no baixo São Francisco, Nordeste do Brasil..... | 30 |
| 7. CONCLUSÕES GERAIS..... | 48 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 49 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Localização de Neópolis e Propriá, municípios onde foram realizadas as coletas dos espécimes estudados..... | 12 |
| Foto aérea do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aqüicultura de Betume, localizado no município de Neópolis/SE. (Fonte: http://www.codevasf.gov.br)..... | 13 |
| Vista aérea da Piscicultura São Sebastião, localizado no município de Propriá/SE. Fonte: Google Earth..... | 13 |
| <i>Prochilodus argenteus</i> | 14 |
| <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> | 14 |
| Perfil eletroforético dos fragmentos de DNA obtidos por RAPD de <i>Prochilodus argenteus</i> do Baixo São Francisco, Sergipe..... | 23 |
| Perfil eletroforético dos fragmentos de DNA obtidos por ISSR de <i>Prochilodus argenteus</i> do Baixo São Francisco, Sergipe..... | 24 |
| Dendograma obtido a partir da distância genética de Nei para <i>Prochilodus argenteus</i> coletados no baixo São Francisco, Sergipe..... | 25 |
| Gráfico de estruturação genética da população de <i>Prochilodus argenteus</i> coletados no baixo São Francisco, Sergipe..... | 25 |
| Perfil eletroforético das amostras de DNA dos municípios de Propriá e Neópolis, SE, submetidos à amplificação via PCR-RAPD, utilizando o iniciador OPR-4 (CCCGTAGCAC)..... | 46 |
| Árvore filogenética com dois ramos/grupos distintos, independentes do local de origem..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Média da prevalência (P) e da intensidade de infecção (II) dos metazoários parasitas encontrados no <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> da região do baixo São Francisco, municípios de Propriá e Neópolis, Sergipe, Brasil..... | 38 |
|--|----|

RESUMO

A bacia do rio São Francisco é intensamente explorada em pisciculturas da região com grande importância econômica. O objetivo do presente estudo foi a identificação de linhagens de peixes silvestres e cultivados em pisciculturas do baixo São Francisco resistentes/suscetíveis a infecções parasitárias utilizando marcadores moleculares. Foram coletados 46 espécimes de *Prochilodus argenteus* e 67 de *Astyanax aff. bimaculatus* no território sergipano. Os peixes foram eutanasiados por choque térmico, medidos, pesados e submetidos a exame da superfície externa. Em seguida, foi realizada a necropsia e exames da cavidade geral, musculatura e órgãos internos, sendo calculadas as taxas de prevalência e intensidade de infecção. Amostras de tecido muscular foram processadas e submetidas à extração de DNA. Posteriormente, o material genômico foi submetido às condições de amplificação em termociclador Biocycler[®] e analisados com marcadores RAPD e ISSR. Foi determinada a distância e identidade genética de Nei construindo-se um dendrograma baseado na distância genética através do método UPGMA, utilizando-se o programa Pop Gen32[®]. Nos espécimes de *Prochilodus argenteus* foram encontrados *Spinitectus asperus* no intestino (P=65,2%; I=8,5), *Tereancistrum toksonum* nas brânquias (P=50,0%; I=7,6) e *Dolops* sp. no tegumento (P=13,0%; I=1,7). Em relação à riqueza parasitária interespecífica, 45,7% dos peixes apresentaram infecção simples, 34,8% infecção concomitante por duas espécies, 4,3% por três e 15,2% não estavam parasitados. Entre as infecções simples, o parasita *S. asperus* foi o mais frequente (30,4%), seguido da associação *S. asperus-T. toksonum* (28,3%) e de *T. toksonum* (13,0%). A avaliação molecular revelou que o percentual de loci polimórficos e o índice de diversidade genética de Shannon foram de 98,45% e 0,49 respectivamente. Apesar do alto potencial polimórfico, o grau de divergência genética intra populacional foi baixo. Os resultados apresentados demonstram que espécimes de *P. argenteus* com maior proximidade genética são mais suscetíveis à infecção parasitária por *T. toksomun*. Com relação a *Astyanax aff. bimaculatus*, observou-se presença de *Laernea* na superfície do corpo, monogênea nas brânquias, metacercária nas brânquias e bexiga natatória, além dos nematódeos intestinais *Procamallanus* sp., *Rabdochona* sp. e *Dolops*

(tegumento). Aproximadamente 41% dos *Astyanax* sp. apresentaram perfil eletroforético homogêneo, ao utilizar-se o iniciador CCCGTAGCAC. Entre os espécimes oriundos de Propriá, o material genômico apresentou perfil eletroforético com bandas < 800pb (n=11) e > 800pb (n=4), sendo o último padrão mais prevalente nos hospedeiros de metacercárias nas brânquias. A análise de cluster originou uma árvore filogenética com dois ramos/grupos distintos, independentes do local de origem, entretanto homogênea com relação à expressão do caráter suscetibilidade/resistência à infecção parasitária. Os resultados apresentados sugerem a necessidade de aprofundamento/ ampliação de estudos sobre a variabilidade genética em populações de peixes com o uso de marcadores moleculares para melhorar o manejo dos estoques com enfoque seletivo de linhagens visando à resistência/suscetibilidade às infecções parasitárias.

Palavras-chave: Ictioparasitas; Diversidade Genética; *Prochilodus argenteus*; *Astyanax* aff. *bimaculatus*; Baixo São Francisco.

ABSTRACT

The São Francisco River basin is heavily exploited fish farms in the region having great economic importance. This study aims to identify strains of wild fish and farmed fish farms in the Lower São Francisco resistant / susceptible to parasitic infections using molecular markers. We collected 46 specimens of *Prochilodus argenteus* and 67 specimens of *Astyanax* aff. *bimaculatus* within Sergipe. The fish were killed by heat shock, weighed, measured and examined the outer surface. We then carried out the autopsy were examined where the general cavity, muscles and internal organs were calculated prevalence rates and infection intensity. Samples of muscle tissue were processed and subjected to DNA extraction. Subsequently, the DNA subjected to conditions in amplificação Biocycler® thermocycler and analyzed by RAPD. Was determined distance and genetic identity of Nei constructing a dendrogram based on genetic distance using the UPGMA method, using the program Pop Gen32®. In *Prochilodus argenteus* specimens were found in the intestine *Spinitectus asperus* (P = 65.2%, I = 8.5), *Tereancistrum toksonum* gills (P = 50.0%, I = 7.6) and *Dolops* sp. the integument (P = 13.0%, I = 1.7). Regarding interspecific parasite richness, 45.7% had single infections, 34.8% concomitant infection by two species, 4.3% for three and 15.2% were not parasitized. Among the simple infections, the parasite *S. asperus* was the most frequent (30.4%), followed by the association *S. asperus-T. toksonum* (28.3%) and *T. toksonum* (13.0%). The matrix of Nei's genetic distance and dendrogram revealed that the percentage of polymorphic loci and genetic diversity index of Shannon, were 98.45% and 0.49 respectively. Despite the high potential polymorphic, the degree of genetic divergence intra population was low. The results show that specimens of *P. argenteus* with greater genetic similarity are more susceptible to parasitic infection by *T. toksomun*. In relation to *Astyanax* aff. *bimaculatus*, we observed the presence of *Lernaea* on the body surface, gill Monogenea, metacercariae in gills and swim bladder, in addition to nematodes *Procamallanus* sp., *Rabdochona* sp. (Intestine) and *Dolops* (integument). Approximately 41% of *Astyanax* sp. electrophoretic profile showed homogeneous, using up the initiator CCCGTAGCAC. Among the specimens from Propriá, the genomic material presented electrophoretic profile with bands < 800pb (n = 11) and > 800pb (n =

4), the latter being more prevalent in standard hosts of metacercariae in gills. Cluster analysis yielded a phylogenetic tree with two branches / groups, independent of the place of origin, however homogeneous with respect to the expression of the trait susceptibility / resistance to parasitic infection. The results presented suggest the need for deepening / enlargement of studies on the genetic variability in populations of fish with the use of molecular markers for improve the handling of inventories with approach selective lineages aiming resistance / susceptibility to infections parasitic.

Keywords: Ictioparasitas; Genetic Diversity; *Prochilodus argenteus*; *Astyanax* aff. *bimaculatus*; Lower São Francisco.

1- INTRODUÇÃO

A aquicultura é praticada em todos os estados brasileiros, sendo que em Sergipe os municípios do Baixo São Francisco estão diretamente ligados a esse tipo de produção. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, o Brasil produz aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados, gerando um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões, mobilizando 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores além de proporcionar 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos (BRASIL, 2011).

A intensificação do uso de recursos aquáticos tem produzido grande impacto nas comunidades pesqueiras. Na piscicultura intensiva, a incidência de parasitoses podem causar significativas perdas durante o cultivo necessitando de um manejo mais adequado (HENRIQUES, 2007).

O crescimento populacional, a alteração no padrão de consumo e o aumento do poder de compra têm gerado uma pressão sobre a demanda por alimentos de boa qualidade. Dentre estes alimentos o pescado apresenta um grande destaque, por ser considerado um alimento facilmente digerível, altamente protéico e de baixo valor calórico, e ainda excelente fonte de vitaminas e minerais (SANTOS, 2006). Relacionado com a alimentação humana e o desenvolvimento da pesca, a parasitologia se destacou com um nível relevante de importância, pois a tecnologia do pescado, no seu aspecto de criação e inspeção, visa à segurança do consumidor (SILVA; SÃO CLEMENTE, 2001).

Os peixes apresentam grandes índices de infecção por parasitos, devido às características próprias do seu habitat natural que é favorável ao acesso e penetração de patógenos, podendo estar diretamente relacionado ao aparecimento de doenças (ALMEIDA; COHEN, 2011). Para estudar um determinado organismo, é importante conhecer as possíveis alterações que possam acometê-lo. A epidemiologia das doenças de peixes tem usado a ocorrência dessas doenças como indicador de fatores ambientais impactantes podendo ser de ordem natural ou antropogênica, tendo como consequência possíveis perturbações fisiológicas (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Os parasitas ocorrem, virtualmente, em todas as cadeias alimentares e em praticamente todos os níveis tróficos, freqüentemente possuindo ciclo de vida complexo, com transmissão dependente da presença de uma variedade de hospedeiros intermediários, paratênicos e definitivos dentro do ecossistema (ANDERSON, 1988). Considerando as características biológicas dos peixes e a diversidade ictiofaunística e a importância econômica da pesca, torna-se necessário o aprimoramento de estudos correlacionando a variabilidade genética e a conservação de recursos pesqueiros visando a melhoria no manejo dos estoques com enfoque seletivo de linhagens resistentes a infecção parasitária.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

O presente trabalho teve como objetivo geral a identificação de linhagens de peixes *Prochilodus argenteus* e *Astyanax aff. bimaculatus* cultivados em pisciculturas e silvestres do baixo São Francisco resistentes/suscetíveis a infecções parasitárias através de marcadores moleculares.

2.2- Objetivos Específicos:

- Determinar os principais metazoários parasitas que acometem as espécies de peixe *Prochilodus argenteus* e *Astyanax aff. bimaculatus*;
- Caracterizar as infecções parasitárias em termos de prevalência e intensidade de infecção;
- Identificar linhagens de *Prochilodus argenteus* e *Astyanax aff. bimaculatus* resistentes/suscetíveis à infecções parasitárias.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aquicultura e pesca

A aquicultura é uma atividade que estuda e aplica os meios de promover o povoamento dos animais aquáticos e é um sistema de produção de alimentos com ritmo de crescimento acelerado. A piscicultura, uma das ramificações da aquicultura, é o setor de maior importância econômica, sendo desenvolvida mediante o aumento da demanda de alimentos. A piscicultura teve início na China há cerca de 4 mil anos, tornando-se o maior produtor aquícola do mundo 62% da produção mundial, sendo 47,5 milhões de toneladas de pescado em 2008 (FAO, 2010; PIZAIA et al., 2008; SILVA, 2005).

No Brasil, somente a partir da década de 1960 através de incentivos do governo a produção pesqueira teve a sua evolução. No entanto, esses incentivos eram voltados exclusivamente à pesca industrial. No final da década de 1980, com a redução da produção da pesca extrativa nacional é motivada pelo avanço da aquicultura mundial foi que o Brasil começou a desenvolver seus primeiros projetos comerciais, apesar de continuar esbarrando em diversos entraves. A partir de meados da década de 1990 o Brasil começou seu grande avanço na aquicultura (SEBRAE, s/d; SILVA, 2005).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2010), a aquicultura segue crescendo mais rapidamente que qualquer outro setor de produção de alimentos de origem animal, com um aumento aquícola per capita de 0,7 kg em 1970 para 7,8 kg em 2008, o que constitui um crescimento médio anual de 6,6%. A produção brasileira tem aumentado na proporção de 30% ao ano, desempenhando um importante papel no cenário nacional, consolidando-se como atividade de expansão, gerando alimentos, empregos, impostos e divisas.

O Brasil é considerado atualmente como o país com maior potencial para a aquicultura no mundo relacionado aos 8.400 km de costa marinha, os 5.500.000 hectares de reservatórios de águas doces, aproximadamente 12% de água doce disponível no planeta. O clima favorável, quente o ano todo, na maior parte do país, a vasta extensão territorial, mão de obra abundante, muitos reservatórios, crescente demanda por pescado no mercado interno e a grande diversidade de espécies com potencial para cultivo (SANTOS *et al.*,

2008). Segundo informações do IBAMA (2007), a região Nordeste do Brasil foi a que representou o maior índice de crescimento relativo com 22% das duzentas mil toneladas de pescado produzidos.

Situado no Nordeste brasileiro, o estado de Sergipe possui uma área territorial de 22.050km², correspondente a 0,26% do território nacional, sendo banhado por regiões hidrográficas – do rio São Francisco e do Atlântico Leste. As bacias do território sergipano são Bacia do rio São Francisco, Bacia do rio Japarutuba, Bacia do rio Sergipe, Bacia do rio Vaza-Barris, Bacia do rio Piauí, Bacia do rio Real, Bacia Costeira I e Bacia Costeira II. Nesse cenário, a aquicultura e a pesca estão presentes em praticamente todas as microrregiões de Sergipe como um setor de grande importância social, e também por seu potencial e rentabilidade, apresentando os mais diversos níveis de tecnificação. Elas apresentam potenciais para desenvolvimento da aquicultura, porém as pisciculturas concentram-se preferencialmente naqueles municípios localizados às margens do Rio São Francisco (SERGIPE, s/d; SOUZA *et al.*, 1999).

Em relação ao mercado consumidor de peixes, é relevante ressaltar as comunidades ribeirinhas locais que desenvolvem atividades de piscicultura caracterizadas por aspectos culturais tradicionais e com fins de subsistência. O uso sustentável dos recursos hídricos na produção do pescado e na geração de emprego e renda pode contribuir para a manutenção das populações ribeirinhas em seu habitat, reduzindo, conseqüentemente, o êxodo rural para as cidades pólos da região, assim como os problemas sociais gerados por esse fluxo migratório (VERMULM JUNIOR; GIAMAS, 2009).

A pesca artesanal, considerada fonte de alimento e sustento para as comunidades pesqueiras da bacia do rio São Francisco, tem sofrido intenso declínio nas últimas décadas. As atividades humanas parecem ser as causas mais comuns atingindo as comunidades ribeirinhas onde a pesca predatória, turismo desorganizado e alterações artificiais dos ambientes têm levado à alteração de habitat, à perda da biodiversidade e desequilíbrios nos ecossistemas naturais. A bacia do rio São Francisco já foi bastante piscosa, tanto no Alto como no Baixo curso, assegurando alimentos aos habitantes da região e atraindo muitos pescadores (MELO, 2008).

Os sistemas de criação de peixes adotados em cada região variam de acordo com um conjunto de fatores como situação socioeconômica e hábito

alimentar dos consumidores, recursos naturais, humanos e tecnológicos, nível de desenvolvimento de setores da iniciativa privada, sistemas de produção e das políticas públicas implementadas, principalmente no que se refere ao financiamento da atividade e à atuação dos órgãos de pesquisa e extensão. Ao mesmo tempo em que ocorre a expansão desta atividade, ocorrem também problemas sanitários, pois com a intensificação dos meios produtivos, o transporte dos peixes e a má qualidade da água, entre outros, atuam como agentes estressantes, resultando em depressão dos mecanismos de defesa e aumentando a suscetibilidade às enfermidades, o que conseqüentemente causa prejuízos na produção do pescado (ISHIKAWA *et al.*, 2008; SILVA, 2005).

Na piscicultura intensiva, a incidência de parasitoses aumenta proporcionalmente com a redução na qualidade nutricional dos alimentos e na qualidade da água, e podem causar significativas perdas durante o cultivo. A carência de estratégias tem levado a aquicultura a agregar problemas no ambiente de produção como agressões e alterações no ecossistema, baixa qualidade da água, deficiências nutricionais e falta de conforto animal devido à alta densidade de estocagem, favorecendo deste modo à proliferação e estabelecimento de doenças infecciosas e parasitárias, culminando em perdas econômicas e ambientais. Os organismos aquáticos encontram-se constantemente rodeados por patógenos potenciais, incluindo bactérias, fungos e parasitas. As águas dos reservatórios com baixa qualidade associadas à nutrição inadequada e o sistema imune deprimido favorecem a manifestação das enfermidades. Para a tentativa de controle e erradicação das doenças, aliadas a necessidade de incrementação da produção e a eficiência produtiva da atividade, antibióticos, pesticidas, fertilizantes, desinfetantes, anestésicos, hormônios, promotores de crescimento, e algicidas tem sido empregados pelos operadores diretamente nos tanques de criação, cujas águas voltam o leito original do rio em estado bruto ou sem um tratamento adequado (CAMPOS, 2006; LOPES, 2006).

3.2- Parasitas

O conhecimento sobre os parasitas de peixes é fundamental para a obtenção de produtos de boa qualidade. Os parasitas podem ser encontrados em todo o corpo dos peixes, como por exemplo, nas brânquias que são estruturas de vital importância no metabolismo e homeostase dos peixes. Lesões de brânquias causadas por parasitas geralmente incluem desorganização estrutural, hiperplasia do epitélio, hipertrofia celular, necrose e inflamação. Estas anormalidades são desencadeadas através de inúmeros fatores como, duração da exposição, intensidade da infecção, grau de regeneração, podendo levar ao comprometimento das trocas gasosas e metabólicas e conseqüentemente, a integridade do animal (CAMPOS *et al.*, 2011).

Lernaea sp. é um parasita pertencente ao filo Artropoda, classe Crustacea. Estes parasitas são bilateralmente simétricos, com corpo segmentado coberto por uma cutícula de quitina rígida ou semi-rígida, provido de apêndices articulados, possuem a cabeça menor que o corpo onde estão localizados os órgãos dos sentidos e têm capacidade adaptativa e resistência aos tratamentos convencionais por ser um crustáceo (BOEGER, 1999). Este é um parasita importante para a piscicultura, pois pode afetar diretamente na economia da mesma por causar uma má aparência nos peixes e também por gerar problemas ecológicos já que este parasita quando introduzido no meio ambiente pode ocasionar na mortalidade dos peixes devido a infecções secundárias causadas por fungos ou bactérias (GALLIO *et al.*, 2007).

Existem várias maneiras que os parasitas utilizam para alterar o comportamento do hospedeiro intermediário, aumentando assim sua vulnerabilidade à predação, onde incluem: redução da histamina, aumento da conspicuidade, desorientação e alterações nas reações à estímulos, como luz, temperatura. A presença de metacercárias no encéfalo pode levar o peixe hospedeiro a uma natação errática e diferente do seu comportamento normal. (HOLMES; BETHEL, 1972).

Tais parasitas têm os peixes como um dos seus hospedeiros definitivos, onde na fase adulta podem parasitar principalmente seu tubo digestivo, mas também outros órgãos e estruturas. Os nematódeos caracterizam-se por possuírem o corpo alongado, redondo e recoberto por uma cutícula protetora,

com as extremidades afiladas. Estes parasitas apresentam sexos separados, exibindo dimorfismo sexual e seu comprimento varia de milímetros até centímetros (PINTO; VICENTE, 1999).

Procamallanus sp. tem seu ciclo de reprodução iniciado quando as fêmeas vivíparas liberam para o meio aquático suas larvas que realizam movimentos semelhantes a uma mola helicoidal atraindo, assim, a atenção dos copépodos. O peixe irá se infectar através da ingestão do copépodo parasitado (COSTA; CAMARGO, 2009).

Os trematódeos possuem maior ação patogênica quando os peixes atuam como hospedeiros intermediários, pois as metacercárias, como são chamadas as larvas dos digenéticos, são mais agressivas para os hospedeiros do que as formas adultas. Ao migrarem pelos tecidos para alcançarem o sítio de infecção, podem causar lesões e, ao se encistarem, também podem causar alterações nos tecidos (OLIVEIRA, 2005). As metacercárias do tipo *Neascus* são as causadoras da Doença dos Pontos Pretos que ocorre quando em resposta à formação do cisto da metacercária, o peixe forma uma cápsula de tecido conjuntivo que contém melanóforos, caracterizando, assim, o aspecto de pontos pretos dos cistos. Esta doença está relacionada ao retardo do crescimento, à perda de peso e até a alta mortalidade de peixes mais jovens, podendo ter consequências econômicas importantes na piscicultura, como a mortalidade dos alevinos e a diminuição do valor comercial dos peixes infectados devido a aparência pouco atrativa (CARVALHO *et al.*, 2008).

As monogeneas são platelmintos ectoparasitas, apresentam ciclo de vida direto podendo encontrar estágio em um único hospedeiro e são encontrados na superfície corporal, narinas, olhos e principalmente nas brânquias. Elas são parasitas que se caracterizam, principalmente, pela presença de um aparelho de fixação localizado geralmente na parte posterior do corpo, o haptor. Esta estrutura é formada por uma série de ganchos e âncoras, de número e tamanhos variáveis, que são introduzidos no corpo dos peixes para a fixação. A diversidade e adaptabilidade dessa estrutura permitem a fixação em diferentes hospedeiros, característica que permitiu o sucesso evolutivo da classe e sua influência sobre os hospedeiros (WHITTINGTON; 2004).

As doenças provocadas por monogeneas estão entre as mais importantes para a piscicultura. Elevados índices de mortalidade já foram verificadas, principalmente em sistemas de criação intensiva, onde existe grande densidade populacional de espécimes. A presença de monogeneas nas brânquias dos peixes pode acarretar hiperplasia celular, hipersecreção de muco e em alguns casos, fusão de filamentos das lamelas branquiais. Tais reações variam de intensidade, dependendo da espécie do parasita e, principalmente, de sua abundância no órgão e estrutura afetados (DIAS, 2010; PAVANELLI *et al.*, 2002; SANCHES, 2008).

Considerando-se a gravidade da parasitose, sugere-se como medida profilática, que todos os novos peixes adquiridos sejam submetidos a banhos e a quarentena, isso é motivado pelo fato de os parasitas serem de ciclo evolutivo direto, o que facilita sua propagação, e pela dificuldade de se erradicar essa enfermidade, após instalada na piscicultura. Devido ao fato desses elementos estarem normalmente presentes no ambiente ou no organismo dos peixes, possivelmente causando enfermidades quando há ruptura do equilíbrio da relação ambiente – parasito - hospedeiro (PAVANELLI *et al.*, 2002; SCHALCH *et al.*, 2006).

3.3- Marcadores moleculares e piscicultura

Através das características biológicas dos peixes, da grande diversidade da ictiofauna e da importância da pesca é que o estudo da variabilidade genética populacional e específica tem sido possível, pois, a utilização de marcadores moleculares pode auxiliar no manejo e conservação de recursos pesqueiros. Nesse sentido, os marcadores moleculares vem permitido avanços nos estudos de análise de estrutura de estoque, aquicultura e taxonomia/sistemática de peixes (BONI *et al.* 2009; HERNRIQUES *et al.*, 2007).

O manejo reprodutivo nestes sistemas de cultivo pode levar a grande redução da variabilidade genética e conseqüentemente promover prejuízo à aquicultura, devido ao número reduzido de espécimes. Se estes apresentarem alto grau de parentesco, pode ocorrer um aumento da consanguinidade na prole resultando em endogamia (ARTONI; MATIELLO, 2003), que tem como principal consequência à redução na heterozigosidade, permitindo que alelos

deletérios recessivos entrem em homozigose e manifestem fenótipos indesejáveis, tais como deformidades grosseiras, diminuição da sobrevivência das larvas e da viabilidade de juvenis e o aumento da suscetibilidade a doenças (CAMPOS, 2009).

Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma), podendo ser utilizados como marcadores genéticos, caso se comportem segundo as leis básicas da herança Mendeliana. Em um mapa genético, tanto os marcadores dominantes (RAPD; AFLP; ISSR) como os co-dominantes (RFLP; SSR) podem ser empregados (CAMPOS, 2009).

Para que um mapa seja considerado completo, todos os marcadores genéticos deverão estar ligados, sugerindo que todas as regiões do genoma estejam representadas, e quando o número de grupos de ligação obtida for igual ao número de cromossomos haploides da espécie estudada. No entanto, outros requisitos são fundamentais quando se têm como objetivo a construção de um mapa genético, como i) o tamanho da população de mapeamento, ii) a escolha dos genitores, e iii) o tipo de cruzamento a ser realizado (CAMPOS, 2009).

A técnica de “Random Amplified Polymorphic” DNA (RAPD) consiste em amplificar o DNA genômico via PCR através de sequências nucleotídicas arbitrárias usando “primers” ou iniciadores, possibilitando detectar altos níveis de polimorfismo e gerar marcadores genéticos específicos – espécie (SALEM *et al.* 2007).

O RAPD possui como vantagem não ser necessário requerer nenhum tipo de informação prévia do genoma que se pretende estudar e o uso do conjunto de primers aumenta significativamente a eficácia da técnica para a obtenção de marcadores espécie- específicos. Porém existem algumas limitações quanto a não separação dos organismos homozigotos dos heterozigotos demonstrando a sua herança dominante, demonstrando que as populações estão em equilíbrio de Hard – Weinberg e os alelos diferentes loci migram para a mesma posição no gel (TORRES *et al.* 2004).

Marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) são utilizados por não requerem informações prévias das sequências de DNA da

espécie alvo, embora sejam conhecidos como menos polimórficos, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade quando comparados a outros marcadores com base de PCR não específico. Esses marcadores são escolhidos para evitar os problemas que os alelos nulos de microssatélites poderiam trazer para as análises desejadas (SOUZA *et al.*, 2008).

3.4- *Prochilodus argenteus*

A família Prochilodontidae é constituída por um dos peixes mais importantes da América Latina, além de que é um nutriente importante no ciclo dos rios Neotropicais. A espécie *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 conhecida como curimatá-pacu é endêmica do rio São Francisco, sendo uma espécie detritívora, de grande importância como recurso pesqueiro e a maior espécie da família Prochilodontidae podendo alcançar até 15kg (BARBOSA *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2005).

De acordo com levantamentos da fauna parasitária em *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 tem registrado-se diversos grupos de parasitas sendo entre as espécies mais comuns os *Diplostomum* sp., Godinho & Godinho (2003), *Saccocoeloides nani*, Digenea; *Valipora* sp. (larva), Cestoda; *Neoechinorhynchus prochilodorum*, Acantocephala; *Spinitectus asperus*, Nematoda (Monteiro *et al.*, 2009); *Myxobolus franciscoi*, Myxozoa (EIRAS *et al.*, 2010). No entanto, a maioria dos estudos com *Prochilodus argenteus* ainda se concentra na região do alto São Francisco e em peixes não cultivados.

3.5- *Astyanax aff. bimaculatus*

Os peixes do gênero *Astyanax* pertencentes ao grupo *bimaculatus*, conhecidos como lambari-de-rabo-amarelo são encontrados principalmente nas bacias Amazônicas e do São Francisco (FROESE; PAULY, 2012). Caracterizam-se por apresentarem uma mancha preta horizontal e duas listras marrons na região umeral, além de uma mancha preta no pedúnculo caudal que se estende até aos raios medianos da nadadeira caudal de cor amarela (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Neste grupo estão incluídas cerca de vinte espécies todos apresentando o mesmo padrão de coloração e com pequenas variações de peso e comprimento (PERES *et al.*, 2012).

O gênero *Astyanax*, por apresentar hábito alimentar onívoro e por se localizar em posição intermediária na cadeia alimentar, pode servir como hospedeiro intermediário e definitivo de várias espécies de parasitas distribuídos em diversos grupos, dentre estes parasitas podem ser encontrados Copépodos, Branquiuros, Monogeneas e Nemátodas (LIZAMA *et al.*, 2008).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Áreas de estudo

As coletas dos espécimes foram realizadas no município de Neópolis (10° 24' 26" S e 36° 34' 28" O) e de Propriá (10° 10' 17" S e 36° 52' 90" O), ambos localizados no baixo São Francisco, estado de Sergipe, Nordeste brasileiro. (Figura 1).

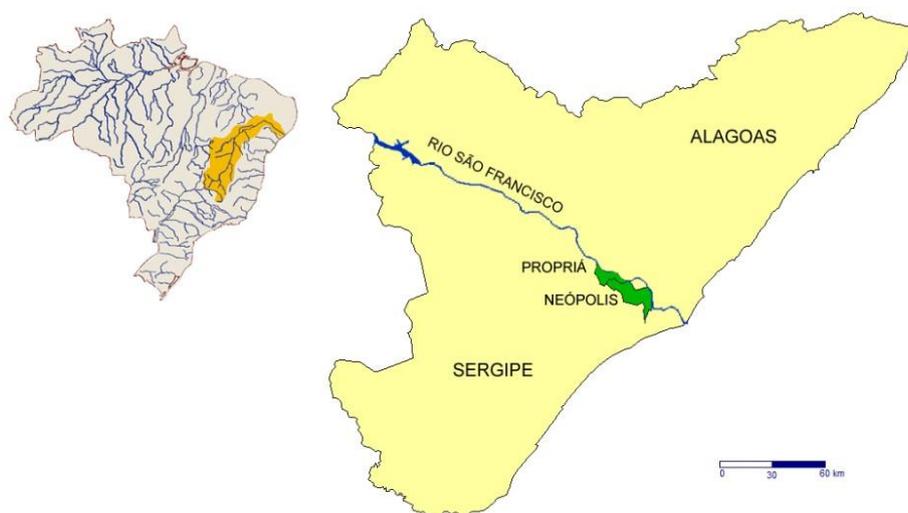


Figura 1. Localização de Neópolis e Propriá, municípios onde foram realizadas as coletas dos espécimes estudados.

O Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aqüicultura de Betume da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba (CODEVASF), onde foram coletados os espécimes de *Prochilodus argenteus* e próximo ao riacho onde foram coletados os *Astyanax aff. bimaculatus*, localiza-se no perímetro irrigado do Betume, município de Neópolis, possui 13 viveiros para alevinos, 5 viveiros para reprodutores e matrizes, 4 viveiros para engorda demonstrativa, 8 viveiros desativados, totalizando 30 viveiros, com área de 16,72 ha (CODEVASF, 2007) (Figura 2)



Figura 2. Foto aérea do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aqüicultura de Betume, localizado no município de Neópolis/SE. **(Fonte:** <http://www.codevasf.gov.br>).

Os espécimes de *Astyanax* aff. *bimaculatus* foram coletados em lagoas adjacentes a Piscicultura São Sebastião, localizada no município de Propriá. A piscicultura é composta por 19 tanques de cultivo e engorda de várias espécies de peixes como Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Pirarucu (*Arapaima gigas*), Tambaqui (*Colossoma macropomus*), Xira (*Prochilodus argenteus*) e Pintado (*Pseudoplatystoma* sp.). Possui também um laboratório de reprodução e criação de alevinos (Figura 3).

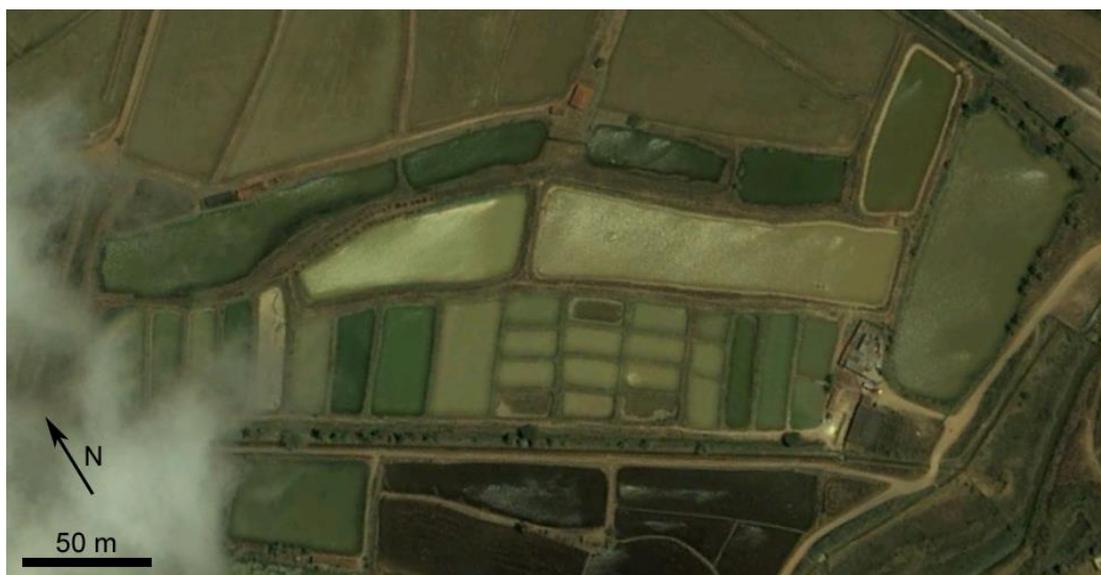


Figura 3. Vista aérea da Piscicultura São Sebastião, localizado no município de Propriá/SE. Fonte: Google Earth

4.2- Coleta de peixes

No período de março a dezembro de 2011 foram coletados 46 exemplares de *Prochilodus argenteus* (Figura 4) em Neópolis. De agosto de 2011 a abril de 2012 foram coletados 67 espécimes de *Astyanax aff. bimaculatus* (Figura 5) em Neópolis e 35 em Propriá. Os exemplares coletados foram resfriados e transportados em caixas térmicas, até o Laboratório de Biologia Tropical do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (LBT/ITP), onde foram medidos, pesados, examinados externamente em busca de ectoparasitas e em seguida necropsiados.



Figura 4: *Prochilodus argenteus*



Figura 5: *Astyanax aff. bimaculatus*

4.3- Avaliação parasitária

Para pesquisa de helmintos e artrópodos parasitos primeiramente observou-se a superfície externa do peixe, incluindo as nadadeiras para verificação da presença e contagem de ectoparasitos (larvas de trematódeos, artrópodos e monogêneas de superfície) e em seguida, foi feita uma incisão longitudinal na região ventral do peixe, da abertura urogenital em direção à cabeça, expondo assim os órgãos internos. Foram examinados em busca de parasitos: musculatura, cavidade geral e opercular, intestino, estômago, bexiga natatória, fígado, pâncreas, vesícula biliar, coração e brânquias, com a utilização de microscópio estereoscópio.

Para o estudo de monogêneas, as brânquias foram isoladas inteiras e mergulhadas em frasco com água a 56°C, com agitações vigorosas por um minuto. Em seguida, o sobrenadante é colocado em placa de Petri pequena e as monogêneas presentes são contadas, fixadas em formol 5% e montadas em meio de Hoyer ou Grey & Wess, para a identificação pelas partes esclerotizadas (KRITSKY *et al.*, 1995; POPAZOGLO, 1997; EIRAS *et al.*, 2000; VIANNA *et al.*, 2008). Os trematódeos encontrados foram comprimidos entre duas lâminas e conservados em líquido de Railliet-Henry, e em seguida corados por carmin clorídrico (LANGERON, 1949). Os nematódeos foram mortos em solução salina 0,15M à quente e conservados em solução de álcool 80% glicerinado a 10% (EIRAS *et al.*, 2000). Posteriormente os nematódeos coletados foram clarificados pelo lactofenol. Os exemplares de copépodos encontrados foram preservados em álcool 70% e posteriormente clarificados em ácido láctico 85% para identificação (TAVARES; LUQUE, 2001).

Os cálculos de prevalência (P) e de intensidade de infecção (II) foram realizados a partir das definições apresentadas por BUSH *et al.* (1997), e são dados por:

$$P = \frac{NP}{NE} \times 100$$

onde NP é o número de peixes infectados por uma determinada espécie de parasito e NE é o número total de peixes examinados, e por:

$$II = \frac{N_{sp1}}{N_{sp2}}$$

onde Nsp1 é o número de indivíduos de uma determinada espécie parasita e Nsp1 é o número de peixes infectados por essa espécie.

4.4- Avaliação molecular

Foram seccionadas amostras de tecido muscular dos peixes, armazenadas em microtubos contendo etanol absoluto, em seguida e acondicionadas em freezer a -20°C para processamento posterior. O DNA foi extraído conforme descrito por TORRES *et al.* (2004) & FORESTI *et al.* (2005). Cerca de 100mg de tecido foi digerido em tampão de digestão (Tris-base 50mM, EDTA 100mM + SDS 0,5%/ pH 8,0) contendo ainda, proteinase-K 20mg/mL (QIAGEN®) e mercaptoetanol. A mistura foi incubada em banho-maria a 65°C por 18 horas para digestão do tecido. Após, o material digerido foi submetido à centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo limpo e esterilizado. O DNA foi isolado dos demais componentes em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e, posteriormente, precipitado em isopropanol a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes em etanol 70% e uma vez em etanol absoluto (ambos a 4°C), ressuspensionado em tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA/ pH 8.0), mantido a 4°C por 24hs para completa ressuspensão e armazenado a -20°C.

O DNA extraído foi submetido à amplificação RAPD (TGCGGGTCCT, CCCGTAGCAC, GTCCATGCCA e GTGGTCCGCA) e ISSR (AGAGAGAGAGAGAGA; CACACACACACACAC; ACACACACACACACA) sob as seguintes condições: 2,8µM de primers aleatórios, 800µM de dNTPs (INVITROGEN®), 3,3mM de MgCl₂, tampão 1X, 2,5U de Taq DNA polimerase recombinante (INVITROGEN®), ~30ng de DNA molde a água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 25µL. Um controle negativo foi incluso em cada reação de amplificação. As reações foram processadas em termociclador (modelo MJ96G: BZ-001 Biocycler®) programado para 35 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 94°C por quatro minutos e um passo de extensão final a 72°C por cinco minutos. Cada ciclo consistiu de desnaturação a 94°C, anelamento a 42,1°C e extensão a 72°C, todas no tempo equivalente a um minuto. Para visualização dos padrões de RAPD gerados, 7,5µL dos produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com Blue Green Loading Dye

(LGC Biotecnologia[®]). O tamanho dos fragmentos obtidos com as ampliações foram estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb (Invitrogen[®], EUA). A presença ou a ausência de fragmentos de tamanhos moleculares medianos foi usada para a construção de uma matriz binária, com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando 1 como presença de fragmentos e 0 como sua ausência resultando em uma matriz de similaridade. A variabilidade genética para cada estoque foi determinada pelo índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos, A divergência genética entre os estoques foi analisada através da distância genética de Nei (1972). Essas análises estatísticas juntamente com a determinação da distância e identidade genética (Nei) foram determinadas através do programa computacional *Pop Gen32*[®] (GOMES, 2007). A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, foi construído um dendograma da distância genética, baseado em Nei (1972), pelo algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) utilizando o programa Statistica 7.0.

ARTIGO 1

FAUNA PARASITÁRIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Prochilodus argenteus* SPIX & AGASSIZ, 1829 CULTIVADOS NO RIO SÃO FRANCISCO, SERGIPE, BRASIL.†

Alessa C. P. Vasconcelos^{1†}; Danilo B. Maciel^{2*}; Danielle J. G. Maia^{2*}; Camila P. Almeida^{2*}; Ana Helena G. Silva³; Veronica L. S. Jeraldo⁴; Cláudia M. Melo⁴ & Rubens R. Madi^{4a}

RESUMO

A espécie *Prochilodus argenteus* é endêmica da bacia do rio São Francisco, e devido à sua importância econômica é intensamente explorada em pisciculturas da região. Este trabalho tem como objetivo avaliar a fauna parasitária e a variabilidade genética de *P. argenteus* coletados em estação de alevinagem e piscicultura situada no baixo rio São Francisco, no município de Neópolis, Estado de Sergipe. Foram coletados 46 espécimes entre abril e dezembro de 2011 com médias de 23,3±3,2 cm de comprimento total e 185,4±93,2 g. Os peixes foram eutanasiados por choque térmico, medidos, pesados e examinada a superfície externa. Em seguida foi realizada a necrópsia onde foram examinadas a cavidade geral, musculatura e órgãos internos, sendo calculadas as taxas de prevalência (P) e intensidade de infecção (I). Amostras de tecido muscular foram processadas e submetidas à extração de DNA. Posteriormente, o DNA foi submetido às condições de amplificação em termociclador Biocycler® e analisados por RAPD e ISSR. Foi determinada a distância e identidade genética de Nei construindo-se um dendrograma baseado na distância genética através do método UPGMA, utilizando-se o programa Pop Gen32®. Nos peixes coletados foram encontrados *Spinitectus asperus* no intestino (P=65,2%; I=8,5), *Tereancistrum toksonum* nas brânquias (P=50,0%; I=7,6) e *Dolops* sp. no tegumento (P=13,0%; I=1,7). Em relação à riqueza interespecífica nas infecções, 45,7% apresentaram infecção simples, 34,8% infecção concomitante por duas espécies, 4,3% por três e 15,2% não estavam parasitados. Entre as infecções simples, o parasita *S. asperus* foi o mais frequente (30,4%), seguido da associação *S. asperus*-*T. toksonum* (28,3%) e de *T. toksonum* (13,0%). A matriz de distância genética de Nei e o dendrograma revelaram que o percentual de loci polimórficos e o índice de diversidade genética de Shannon, obtidos na avaliação molecular, foram de 98,45% e 0,49 respectivamente. Apesar do alto potencial polimórfico obtido, o grau de divergência genética intra populacional foi baixo. Os resultados apresentados demonstram que espécimes de *P. argenteus* com maior proximidade genética são mais suscetíveis à infecção parasitária por *S. asperus*, *T. toksonum* e *Dolops* sp., no trecho da bacia do rio São Francisco estudado, tornando-se necessário o manejo dos estoques de produção piscícola com enfoque seletivo de linhagens visando a resistência à infecção parasitária.

Palavras-chave: Ictioparasitas; Diversidade Genética; Piscicultura; *Prochilodus argenteus*; Brasil

¹Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambientes - Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, SE, Brasil

²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Curso de Ciências Biológicas – Universidade Tiradentes, Aracaju, SE,

³Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Betume – CODEVASF, CEP 49980-000, Neópolis, SE,

⁴Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, SE, Brasil

^arrmadi@gmail.com

ABSTRACT

The species *Prochilodus argenteus* is endemic in the São Francisco river, and due to its economic importance is heavily exploited fish farms in the region. This study aims to evaluate the parasitic fauna and genetic variability of *P. argenteus* collected from nursery and fish breeding station located in the lower Rio São Francisco, the city of Neópolis, State of Sergipe. 46 specimens were collected between April and December 2011 with averages of 23.3 ± 3.2 cm in overall length and 185.4 ± 93.2 g. The fish were killed by heat shock, weighed, measured and examined the outer surface. We then carried out the autopsy were examined where the general cavity, muscles and internal organs were calculated prevalence rates (P) and infection intensity (I). Samples of muscle tissue were processed and subjected to DNA extraction. Subsequently, the DNA was subjected to conditions in amplificação Biocycler® thermocycler and analyzed by RAPD and ISSR. Was determined distance and genetic identity of Nei constructing a dendrogram based on genetic distance using the UPGMA method, using the program Pop Gen32®. Were found in fish collected *Spinitectus asperus* intestine (P = 65.2%, I = 8.5), *Tereancistrum toksonum* gills (P = 50.0%, I = 7.6) and *Dolops* sp. the integument (P = 13.0%, I = 1.7). Regarding wealth in interspecific infections, 45.7% had single infections, 34.8% concomitant infection by two species, 4.3% for three and 15.2% were not parasitized. Among the simple infections, the parasite *S. asperus* was the most frequent (30.4%), followed by the association *S. asperus-T. toksonum* (28.3%) and *T. toksonum* (13.0%). The matrix of Nei's genetic distance and dendrogram revealed that the percentage of polymorphic loci and genetic diversity index of Shannon, obtained in the molecular, were 98.45% and 0.49 respectively. Despite the high potential polymorphic obtained, the degree of genetic divergence intra population was low. The results show that specimens of *P. argenteus* with greater genetic similarity are more susceptible to parasitic infection by *S. asperus*, *T. toksonum* and *Dolops* sp., the stretch of the São Francisco studied, making it necessary to the management of fish stocks with production lines in order to focus selective resistance to parasitic infection.

Keywords: Ictioparasites; Genetic Diversity; Pisciculture; *Prochilodus argenteus*; Brazil.

INTRODUÇÃO

Prochilodus argenteus, pertencente à família Prochilodontidae é considerada um dos organismos mais importantes para a pesca comercial, de subsistência e desportiva, especialmente no Nordeste brasileiro, sendo endêmica da bacia do rio São Francisco. Devido à sua importância econômica, esta espécie é intensamente explorada em pisciculturas da região (CAMPOS, 2009).

De acordo com levantamentos da fauna parasitária em *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829 tem registrado-se diversos grupos de parasitas sendo entre as espécies mais comuns os *Diplostomum* sp., (GODINHO; GODINHO, 2003), *Saccocoelioides nani*, Digenea; *Valipora* sp. (larva), Cestoda; *Neoechinorhynchus prochilodorum*, Acantocephala; *Spinitectus asperus*, Nematoda (MONTEIRO *et al.*, 2009); *Myxobolus franciscoi*, Myxozoa (EIRAS *et al.*, 2010). No entanto, a maioria dos estudos com *Prochilodus argenteus* ainda se concentra na região do alto São Francisco e em peixes não cultivados.

O uso de técnicas moleculares para o estudo da variabilidade genética populacional e específica que é dada através do desenvolvimento de marcadores moleculares tem aumentado devido ao aprimoramento dessas técnicas e da conscientização do valor dos dados genéticos, permitindo avanços no conhecimento sobre análises de estrutura de estoque, aquicultura e taxonomia/sistemática (HENRIQUES *et al.*, 2007).

O manejo reprodutivo nestes sistemas de cultivo pode levar a grande redução da variabilidade genética e conseqüentemente promover prejuízo à aquicultura, devido ao número reduzido de espécimes. Se estes apresentarem alto grau de parentesco, pode ocorrer um aumento da consanguinidade na prole resultando em endogamia (ARTONI; MATIELLO, 2003), que tem como principal consequência à redução na heterozigosidade, permitindo que alelos deletérios recessivos entrem em homozigose e manifestem fenótipos indesejáveis, tais como deformidades grosseiras, diminuição da sobrevivência das larvas e da viabilidade de juvenis e o aumento da suscetibilidade a doenças (CAMPOS, 2009).

A construção de mapas genéticos é considerado um passo importante para uma variedade de aplicações genômicas, tais como reprodução seletiva em aquicultura, estudos comparativos de evolução cromossômica e identificação de *locus* que desempenham papéis importantes na evolução de uma espécie e em sua conservação (LOPES, 2010).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a fauna parasitária e sua relação com a variabilidade genética de *P. argenteus* coletados em estação de alevinagem e piscicultura situada no baixo rio São Francisco, no município de Neópolis, Estado de Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 46 espécimes de *Prochilodus argenteus* entre abril e dezembro de 2011. Os peixes foram eutanasiados por choque térmico, medidos, pesados e examinada a superfície externa. Realizou-se então a necrópsia visando a busca de parasitas na cavidade geral, musculatura e órgãos internos. A partir destes achados, calcularam-se as taxas de prevalência (P) e intensidade de infecção (I) (BUSH *et al.*, 1997).

Foram retiradas amostras de tecido muscular para extração de DNA. O material genômico foi submetido às condições de amplificação em termociclador Biocycler[®] e analisados por RAPD (CCCGTAGCAC; TGCGGGTCCT; GTGTCCGCA; GTCCATGCCA; CAGCACCCAC; AATCGGGCTG; AGTCAGCCAC) e ISSR (AGAGAGAGAGAGAGA; CACACACACACACAC; ACACACACACACACA). Após o PCR, os fragmentos gerados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,7%, corados com Blue Green Loading Dye (LGC/Biotecnologia[®]). Foi determinada a distância e identidade genética de Nei em seguida, construído um dendrograma baseado na distância genética através do método UPGMA, utilizando-se o programa Pop Gen32[®]. O tamanho dos fragmentos obtidos com as amplificações foram estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb (Invitrogen[®], EUA). A presença ou a ausência de fragmentos de tamanhos moleculares medianos foi usada para a construção de uma matriz binária, com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando 1 como presença de fragmentos e 0 como sua ausência resultando em uma matriz de

similaridade. A variabilidade genética para cada estoque foi determinada pelo índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos. A divergência genética entre os estoques foi analisada através da distância genética de Nei (1972). Essas análises estatísticas juntamente com a determinação da distância e identidade genética foram determinadas através do programa computacional *Pop Gen32*® (GOMES, 2007).

Para a análise de resistência/suscetibilidade os *Prochilodus argenteus* examinados foram agrupados de acordo com a espécie parasita de maior importância econômica encontrada.

RESULTADOS

Nos peixes coletados foram encontrados *Spinitectus asperus* no intestino (Nematoda) (P=65,2%; I=8,5), *Tereancistrum toksonum* nas brânquias (Monogenea) (P=50,0%; I=7,6) e *Dolops* sp. no tegumento (Branchiura) (P=13,0%; I=1,7).

Em relação à riqueza interespecífica nas infecções, 45,7% apresentaram infecção simples, 34,8% infecção concomitante por duas espécies, 4,3% por três e 15,2% não estavam parasitados. Entre as infecções simples, o parasita *S. asperus* foi o mais frequente (30,4%), seguido da associação *S. asperus*-*T. toksonum* (28,3%) e de *T. toksonum* (13,0%).

Através da análise dos géis dos fragmentos de DNA obtidos por RAPD (Figura 1) e por ISSR (Figura 2) foi calculada a matriz de distância genética de Nei e elaborados o dendrograma e o gráfico de estruturação genética. A análise revelou um percentual de loci polimórficos de 98,45% e um índice de diversidade genética de Shannon de 0,49. Apesar do alto potencial polimórfico obtido, o grau de divergência genética intra populacional foi baixo.

A análise de resistência/suscetibilidade foi realizada agrupando-se os *P. argenteus* em parasitados e não parasitados por *T. toksonum*, por ser um parasita de importância comercial e de alto potencial patogênico, obtendo-se dois grupos geneticamente distintos para esse caráter (Figura 3 e 4).

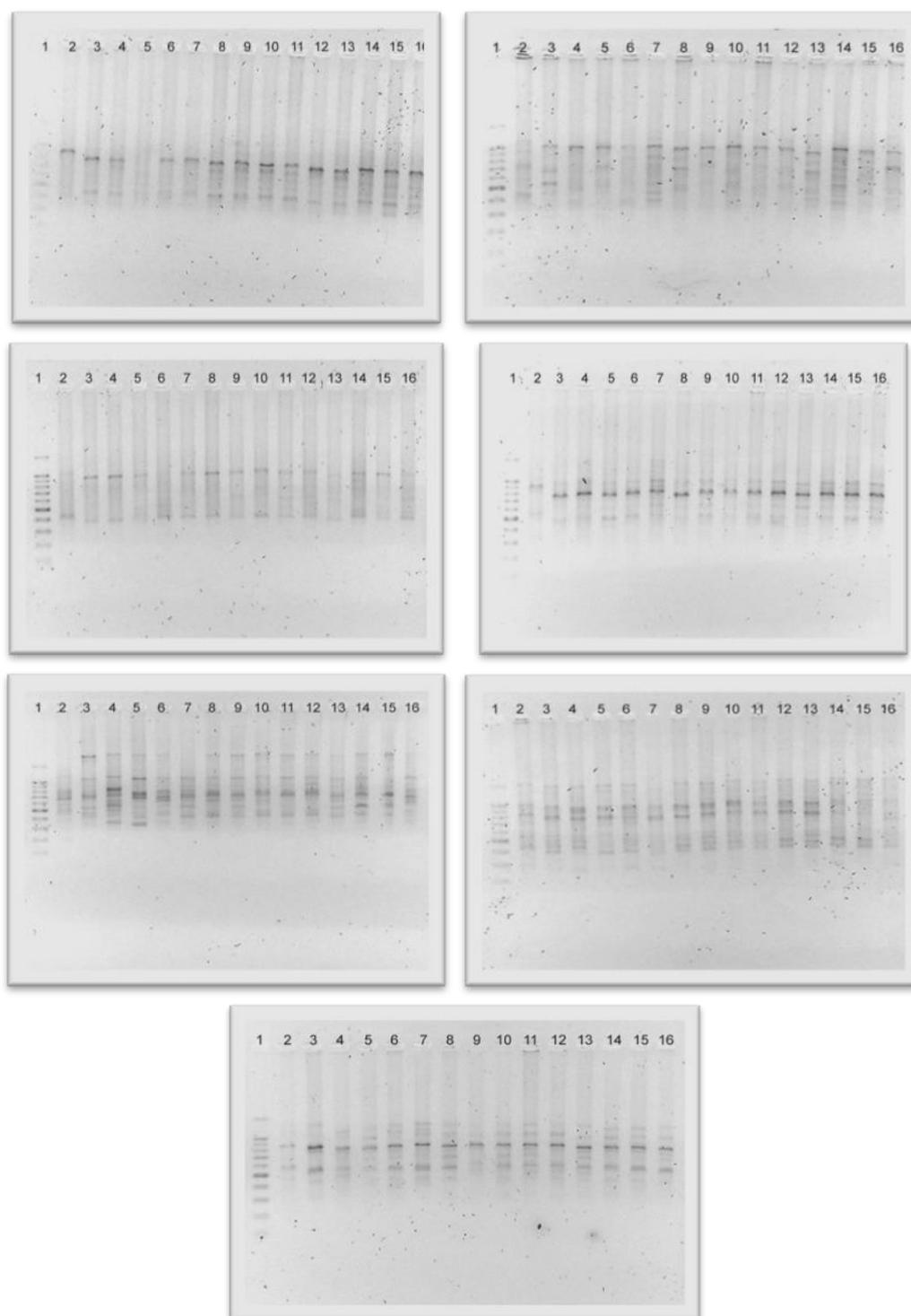


Figura 1. Perfil eletroforético dos fragmentos de DNA obtidos por RAPD de *Prochilodus argenteus* do Baixo São Francisco, Sergipe.

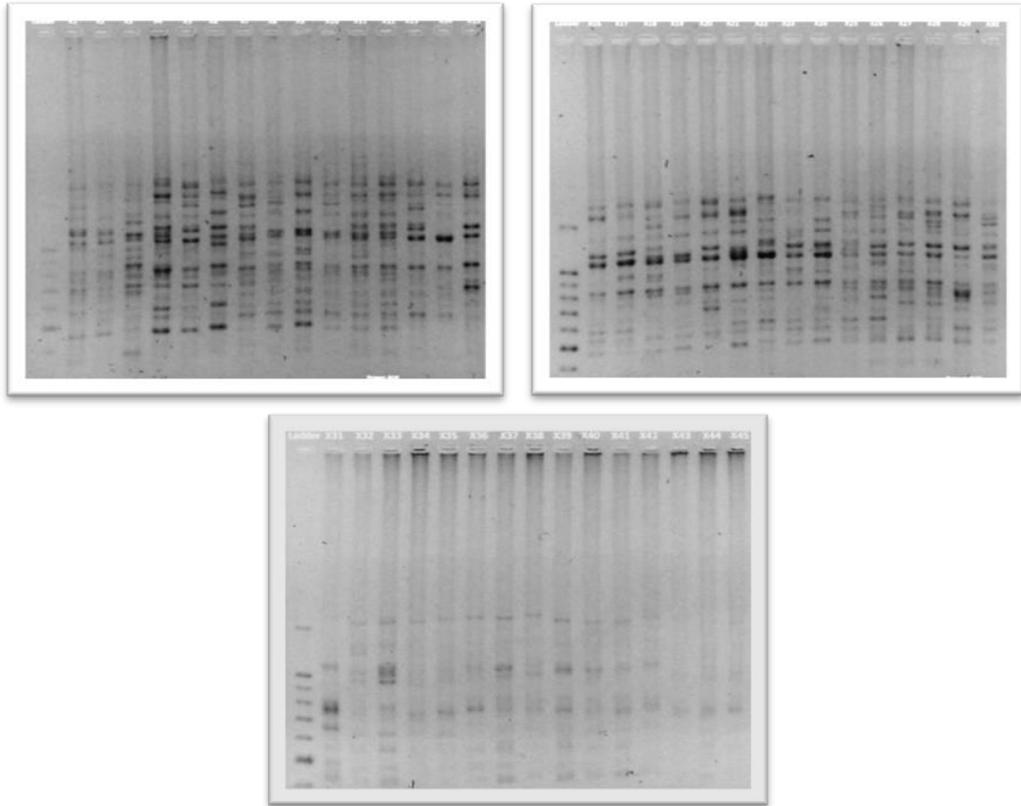


Figura 2. Perfil eletroforético dos fragmentos de DNA obtidos por ISSR de *Prochilodus argenteus* do Baixo São Francisco, Sergipe.

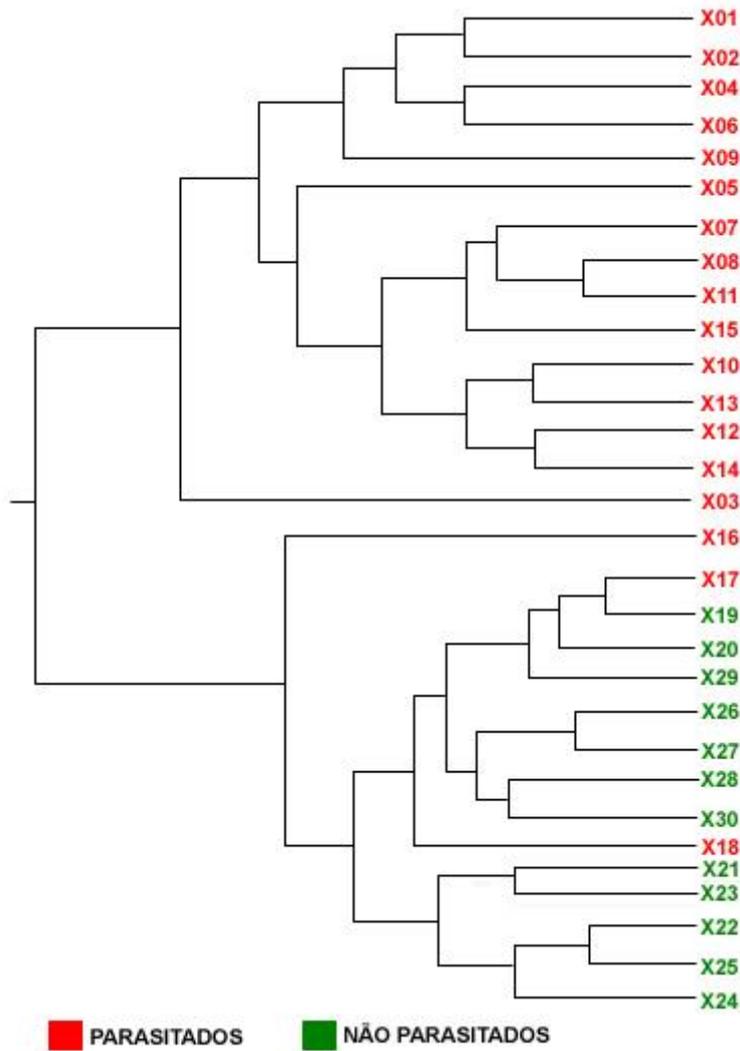


Figura 3. Dendrograma obtido a partir da distância genética de Nei para *Prochilodus argenteus* coletados no baixo São Francisco, Sergipe, parasitados por *Tereancistrum toksonum*.

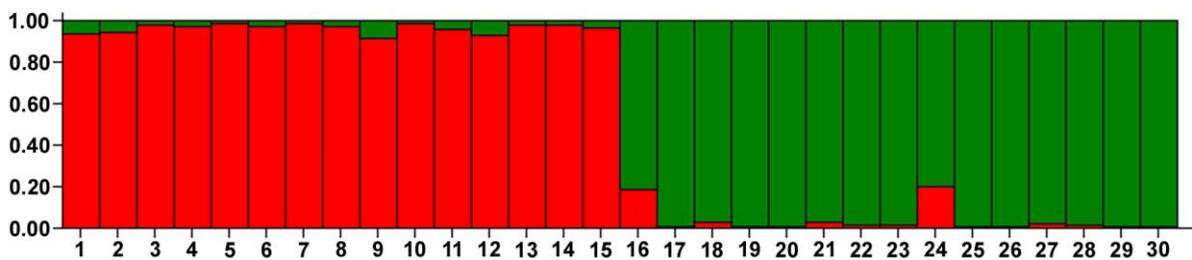


Figura 4. Gráfico de estruturação genética da população de *Prochilodus argenteus* coletados no baixo São Francisco, Sergipe, parasitados por *Tereancistrum toksonum*.

DISCUSSÃO

A porcentagem de fragmentos polimórficos e o índice de Shannon têm sido utilizados com sucesso na estimação de graus de diversidade genética em estoques e populações naturais de peixes neotropicais. O efeito fundador causado normalmente durante a formação de estoques de reprodutores pode gerar uma baixa diferenciação genética. Normalmente, no momento desta formação existe uma pressão sobre espécimes com características visuais favoráveis (de maior tamanho e com melhores potenciais reprodutivos), o que pode levar ao aparecimento do efeito “bottleneck” que promove o aparecimento de endogamia, gerando uma perda de variabilidade genética e um aumento da correlação negativa entre a similaridade genética e o número de gerações. Processos como esse incluem geralmente seleção de indivíduos com as melhores características fenotípicas ou reprodutivas podendo ocorrer o acasalamento entre indivíduos geneticamente aparentados gerando assim possíveis perdas de variabilidade (AHO *et al.*, 2006; LOPERA BARRERO *et al.* 2008; POVH *et al.* 2008) .

Apesar do alto percentual de loci polimórficos e o índice de diversidade genética de Shannon de 0,49 não foi evidenciado nenhuma grande perda de variabilidade genética mesmo sendo discutido por Lopera Barrero *et al.* (2010) e Jacometo *et al.* (2010), que estoques mantidos em cativeiro, como é o caso da piscicultura em estudo, existe uma diminuição da variabilidade genética, em consequência do efeito da seleção intencional e do acasalamento entre parentais.

Marcadores moleculares RAPD são eficientes em discriminação de espécies, quando as características morfológicas não são bem definidas. Além da clássica aplicação em estimativas de similaridade genética entre populações, marcadores RAPD têm sido usados com sucesso para determinar espécies específicas em traços de peixes e para a reconstrução filogenética da relação entre espécies e subespécies. Embora os genes heterozigotos não sendo separados dos homozigotos devido ao caráter dominante dos marcadores RAPD, a ausência de amplificação de uma banda em dois genótipos não representa necessariamente similaridade genética entre eles (RAMELLA *et al.* 2006).

A maioria dos espécimes não parasitados são da mesma população genética. A diversidade genética moderada pode ser interpretada de várias formas: 1) Alguns estudos correlacionam positivamente alelos neutros com diversidade de MHC (complexo de histocompatibilidade) então, a diversidade genética moderada, aliada a ausência de parasitas na maioria dos indivíduos de uma das populações genéticas pode indicar que essa população pode ter uma variabilidade maior de MHC que a outra população genética (que apresentou mais indivíduos acometidos por parasitas); ou 2) que a variabilidade genética que existe é mantida pela pressão do parasita (ele sempre se adapta aos hospedeiros, e hospedeiros com genótipo diferente tende a desenvolver respostas imunes diferentes, e assim são selecionados pelo ambiente (RADWAN *et al.* 2010).

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que espécimes de *P. argenteus* com maior proximidade genética são mais suscetíveis à infecção parasitária por *T. toksomun* no trecho da bacia do rio São Francisco estudado, tornando-se necessário o manejo dos estoques de produção piscícola com enfoque seletivo de linhagens visando a resistência à infecção parasitária.

REFERÊNCIAS

- ARTONI, R.F. & MARTIELLO, M.C.A. Genética de peixes neotropicais. i. Aspectos da conservação genética dos peixes no parque estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. **Ciência. Biologia.Saúde** . 9:7-15. 2003.
- AHO, T.; RÖNN, J.; PIIRONEN, J.; BJÖRKLUND, M. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture, Amsterdam**. 253:244-248. 2006.
- BUSH, AO, LAFFERTY, KD, LOTZ, JL, SHOSTAK, AW. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. **Journal of Parasitology**. 83:575-583. 1997.
- CAMPOS, W.N. **Análise comparativa da variação genética entre os estoques cultivados e natural de *Prochilodus argenteus*: implicações para**

o repovoamento de rios. Tese de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2009.

EIRAS, J.C., MONTEIRO, C.M., BRASIL-SATO, M.C. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Brasil, with a revision of *Myxobolus* spp. From South America. **Zoologia** 27 (1):131-137. 2010.

GODINHO, H.P. & GODINHO, A.L. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas. 2003.

HENRIQUES, J.M.; SIROL, R.N.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. **Validação de primers de microssatélite para uso em estudos populacionais de Curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes, Prochilodontae).** Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007.

JACOMETO, C.B.; LOPERA BARRERO, N.M.; RODRIGUES, M.D.P.R.; GOMES, P.C.; POVH, J.A.; STREIT JUNIOR, D.P.; VARGAS, L.; RESENDE, E.K.; RIBEIRO, R.P.; Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa. agropecuária. brasileira.** 45:481-487. 2010.

LOPERA BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH J.A.; GOMES, P.C.; MANGOLIN, C.A.; BOSO, K.M.O.; GUALDA, T. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: Importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. **Bioscience. Journal.** 24:86-93. 2008.

LOPERA BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A.; LOPES, T.S.; OLIVEIRA, S.N.; GOMES, P.C. Diversidad genética de *Piaractus mesopotamicus* utilizado em programas de repoblación. **Archivos de Zootecnia.** 59:51-62. 2010.

LOPES, A.C.M. **Diversidade genética das espécies de *Prochilodus* spp. Utilizadas em pisciculturas no baixo São Francisco no Estado de Sergipe.** Tese de Mestrado. Universidade Tiradentes, 2010.

- MONTEIRO, C.M., SANTOS, M.D., ZUCHI, N.A., BRASIL-SATO, M.C. Ecological parameters of the endohelminths in relation to size and sex of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. **Zoologia**. 26 (4):753-757. 2009.
- POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; STREIT JÚNIOR, D.P.; LOPERA BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; GOMES, P.C.; LOPES, T.S. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa. agropecuária. brasileira**. 43:201-206. 2008.
- RADWAN, J.;BIEDRZYCKA, A.; BABIK, W. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? **Biological Conservation**. 143:537–544. 2010.
- RAMELLA, M.S.; KROTH, M.A.; MEURER, S.; NUÑER, A.P.O.; ZANIBONI FILHO, E.; ARISI, A.C.M. Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*)from Uruguay River Basin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49:589-598. 2006.
- SOUZA, M.E. **Caracterização Genética de reprodutores de tilápia: estratégias para a manutenção da variabilidade**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.

ANÁLISE MOLECULAR E BIODIVERSIDADE DE METAZOÁRIOS PARASITAS DO LAMBARI-DE-RABO-AMARELO, *ASTYANAX* AFF. *BIMACULATUS* (TELEOSTEI; CHARACIDAE), NO BAIXO SÃO FRANCISCO, NORDESTE DO BRASIL

ANÁLISIS MOLECULAR Y BIODIVERSIDAD DE PARÁSITOS METAZOOS DE LAMBARI-DE-COLA-AMARILLO, *ASTYANAX* AFF. *BIMACULATUS* (TELEOSTEI, CHARACIDAE), EN BAJO SAN FRANCISCO, NORESTE DE BRASIL

MOLECULAR ANALYSIS AND BIODIVERSITY OF METAZOAN PARASITES OF THE YELLOW TAIL LAMBARI, *ASTYANAX* AFF. *BIMACULATUS* (TELEOSTEI, CHARACIDAE), IN LOWER SAN FRANCISCO, NORTHEASTERN BRAZIL

Alessa Caroline Pedroza de Vasconcelos¹; Anna Carolina Mota Lopes²; Joane Marília Santana dos Santos³; Verónica de Lourdes Sierpe Jeraldo⁴; Cláudia Moura de Melo²; Rubens Riscala Madi^{5*}

¹ Programa de Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil

² Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE, Brasil

³ Curso de Ciências Biológicas, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil

⁴ Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE, Brasil

⁵ Laboratório de Biologia Tropical, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE, Brasil

RESUMO

A dificuldade na identificação em algumas espécies de lambaris provém da grande semelhança fenotípica que apresentam muitas vezes aliada à hibridização. Os parasitas podem ser indicativos de vários aspectos da biologia de seus hospedeiros, incluindo a filogenia, pois alguns grupos parasitas podem apresentar especificidade de hospedeiro. Desta forma, objetivou-se avaliar a diversidade genética e parasitológica de peixes *Astyanax* aff. *bimaculatus*. em lagoas e riachos adjacentes à pisciculturas localizadas no baixo São Francisco, Sergipe, Brasil. Os espécimes foram coletados nos municípios de Propriá e Neópolis e submetidos à necropsia na busca por metazoários parasitas e secção dos tecidos musculares para extração de DNA. As amostras foram submetidas à PCR e eletroforese com os produtos das reações e posteriormente realizou-se análise de cluster. A avaliação parasitológica de 102 peixes revelou a presença de *Lernaea cyprinacea* e *Dolops* sp. (superfície do corpo), *Urocleidoides* sp. e metacercárias de Echinostomatidae nas brânquias, *Prosthenthystera obesa* na vesícula biliar, Diplostomidae tipo *Neascus* na bexiga natatória e os nematódeos *Procamallanus hilarii* e *Rabdochona* sp. no intestino. Avaliou-se material genômico de *Astyanax* aff. *bimaculatus* com a seguinte distribuição segundo a origem: 34,3% oriundos de Propriá e 65,7% de Neópolis. Aproximadamente 41% dos peixes coletados apresentaram perfil eletroforético homogêneo, ao utilizar-se o primer CCCGTAGCAC. Entre os espécimes oriundos de Propriá, o material genômico apresentou perfil eletroforético com bandas <800pb e >800pb, sendo o último padrão mais

*Autor para correspondência: Rubens Riscala Madi. Av. Murilo Dantas, 300 - Farolândia - Aracaju - Sergipe - CEP: 49032-490 - Brasil – Tel: +55 (79) 3218-2190. rrmadi@gmail.com

prevalente nos hospedeiros com Echinostomatidae nas brânquias. A análise de cluster originou uma árvore filogenética com dois ramos/grupos distintos, independentes do local de origem, entretanto homogênea com relação à expressão do caráter suscetibilidade/resistência à infecção parasitária. Estas estratégias moleculares podem auxiliar na identificação taxonômica de *Astyanax* aff. *bimaculatus*, que é difícil devido a grande semelhança na morfologia externa.

Palavras-chave: Ambiente natural, *Astyanax* aff. *bimaculatus*, Brasil, Diversidade genética, Ictioparasitologia

ABSTRACT

The difficulty in identifying some species of lambaris come from very similar phenotypic feature that often allied to hybridization. The parasites can be indicative of various aspects of the biology of their hosts, including phylogeny, because some groups of parasites may have host specificity. Thus, the objective was to evaluate the genetic diversity and parasitological fish *Astyanax* aff. *bimaculatus*. in ponds and streams adjacent to fish farms located in the Lower São Francisco, Sergipe, Brazil. The specimens were collected in the municipalities of Propriá and Neópolis and necropsied in the search for metazoan parasites and section of muscle tissue for DNA extraction. The samples were subjected to PCR and electrophoresis with the products of the reactions and subsequent cluster analysis was performed. The assessment parasitological of 102 fish showed the presence of *Lernaea cyprinacea* and *Dolops* sp. in body surface, *Urocleidoides* sp. and metacercariae of Echinostomatidae in gills, *Prosthenhystera obesa* in the gallbladder,

Diplostomidae type *Neascus* in the swim bladder and the nematodes *Procamallanus hilarii* and *Rabdochona* sp. in the gut. Was evaluated genomic material of *Astyanax* aff. *bimaculatus* with the following distribution by origin: 34.3% from Propriá and 65.7% from Neopolis. Approximately 41% of the fish collected showed an electrophoretic profile homogeneous by using the primer CCCGTAGCAC. Among the specimens from Propriá, the genomic material presented electrophoretic profile with bands <800pb and >800pb, being the last profile more prevalent in hosts with Echinostomatidae in gills. Cluster analysis yielded a phylogenetic tree with two branches / groups, independent of the place of origin, however homogeneous with respect to the expression of the character susceptibility / resistance to parasitic infection. These strategies can help in molecular taxonomic identification of *Astyanax* aff. *bimaculatus*, which is difficult because of the great similarity in external morphology.

KEY WORDS: *Astyanax* aff. *bimaculatus*, Brazil, Genetic diversity, Ichthyoparasitology, Natural environment,

RESUMEN

La dificultad en la identificación de algunas especies de lambaris provienen de las semejanzas fenotípicas muchas veces aliadas a la hibridación. Los parásitos pueden ser indicativos de varios aspectos de la biología de sus huéspedes, incluyendo filogenia, porque algunos grupos de parásitos pueden tener especificidad de hospedador. Así, el objetivo fue evaluar la diversidad genética y parasitológica del pez *Astyanax* aff. *bimaculatus* provenientes de estanques y arroyos adyacentes a las explotaciones piscícolas situadas en el

Bajo São Francisco, Sergipe, Brasil. Las muestras fueron recolectadas en los municipios de Propriá y Neopolis y sometidas a autopsia para la búsqueda de parásitos metazoos y en sección de tejido muscular para la extracción de DNA. Las muestras fueron sometidas a PCR y posterior electroforesis con los productos de las reacciones, para realizar análisis de cluster. La evaluación parasitológica de 102 peces mostró la presencia de *Lernaea cyprinacea* y *Dolops* sp. en la superficie del cuerpo, *Urocleidoides* sp. y metacercarias de Echinostomatidae en las branquias, *Prosthenthystera obesa* en la vesícula biliar, Diplostomidae tipo *Neascus* en la vejiga natatoria y nemátodos *Procamallanus hilarii* y *Rabdochona* sp. en el intestino. La evaluación del material genómico de *Astyanax* aff. *bimaculatus* mostró la siguiente distribución por origen: 34,3% de Propriá y 65,7% de Neopolis. Aproximadamente el 41% de los peces recolectados mostró perfil electroforético homogénea mediante el uso del primer CCCGTAGCAC. Entre las muestras de Propriá, el material genómico presentó perfil electroforético con bandas <800pb y >800pb, siendo esta última más frecuente en los hospedadores con Echinostomatidae en las branquias. El análisis de cluster produjo un árbol filogenético con dos ramas / grupos distintos, independientemente del lugar de origen, no obstante homogéneas con respecto a la expresión del carácter susceptibilidad / resistencia a la infección parasitaria. Estas estrategias moleculares pueden ayudar en la identificación taxonómica de *Astyanax* aff. *bimaculatus*, que es difícil debido a la gran similitud en la morfología externa.

Palabras clave: Ambiente natural, *Astyanax* aff. *bimaculatus*, Brasil, Diversidad genética, Ictioparasitología.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui a biota mais rica dentre os 17 países mais biodiversos do planeta e os peixes são os organismos vertebrados mais diversificados e os mais distintos geneticamente conhecidos (Brasil, 2013). No entanto mesmo sendo muito conhecidos, acredita-se que 30 a 40% de toda a ictiofauna Neotropical ainda não foi identificada até o momento (Gallio *et al.*, 2006).

Através da análise de estrutura populacional é permitida a interpretação de vários aspectos de vida das espécies, fornecendo subsídios ao dimensionamento dos estoques das comunidades e das eficientes medidas na administração e proteção dos recursos pesqueiros (Pinese *et al.*, 2007).

Os peixes do gênero *Astyanax* pertencentes ao grupo *bimaculatus*, conhecidos como lambari-de-rabo-amarelo são encontrados principalmente nas bacias Amazônicas e do São Francisco (Froese & Pauly, 2012). Caracterizam-se por apresentarem uma mancha preta horizontal e duas listras marrons na região umeral, além de uma mancha preta no pedúnculo caudal que se estende até aos raios medianos da nadadeira caudal de cor amarela (Garutti & Britski, 2000). Neste grupo estão incluídas cerca de vinte espécies todos apresentando o mesmo padrão de coloração e com pequenas variações de peso e comprimento (Peres *et al.*, 2012).

O gênero *Astyanax*, por apresentar hábito alimentar onívoro e por se localizar em posição intermediária na cadeia alimentar, pode servir como hospedeiro intermediário e definitivo de várias espécies de parasitas distribuídos em diversos grupos (Lizama *et al.*, 2008).

No baixo rio São Francisco inexitem publicações de levantamento dos parasitas dos peixes da região, sendo premente a identificação e o

conhecimento da fauna parasitária piscícola, uma vez que muitas espécies nativas são utilizadas em pisciculturas locais. Atualmente os programas de aquicultura vêm se atentando às avaliações genéticas de peixes, pois possibilita o conhecimento da estrutura populacional da cada espécie, e pode ser utilizado como estratégia para fins de repovoamento de estoques naturais e melhoramento de espécies de cultivo. Em função do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética e parasitária em peixes *Astyanax aff. bimaculatus* coletados em corpos d'água adjacentes às pisciculturas de Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *Astyanax aff. bimaculatus* foram coletados em lagoas e canais próximos e adjacentes às pisciculturas localizadas nos municípios de Propriá (10° 10' 17" S e 36° 52' 90" O) e Neópolis (10° 24' 26" S e 36° 34' 28" O), estado de Sergipe, Brasil, no período de agosto de 2011 à abril de 2012. Foram registrados os comprimentos total e padrão, assim como o peso dos peixes coletados e posteriormente submetidos à necropsia na busca por metazoários parasitas.

Amostras de tecidos musculares foram retiradas para extração de DNA com tampão de digestão (Tris-base 50mM, EDTA 100mM + SDS 0,5%/ pH 8,0), proteinase-K 20mg/mL (QIAGEN®) e mercaptoetanol. O DNA foi isolado em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). As condições para PCR foram as seguintes: 35 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 42,1°C e extensão a 72°C, com primers de 10 mers. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Foram realizados cálculos de prevalência e de intensidade de infecção a partir das definições apresentadas por Bush *et al.* (1997). Procedeu-se a análise de cluster para a obtenção de agrupamentos filogenéticos e em seguida aplicado o teste de Tukey entre os grupos obtidos, em relação às intensidades de infecção dos parasitas de mais alta prevalência e grande risco à saúde do animal. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 7.0[®], com intervalo de confiança igual a 5%.

RESULTADOS

Foram analisados 35 peixes do município de Propriá, sendo vinte três machos e doze fêmeas, com peso médio de 5,23g ($\pm 3,38$), comprimento total médio de 6,84cm ($\pm 0,99$) e comprimento padrão médio de 5,52cm ($\pm 0,79$). Para as coletas do município de Neópolis foram analisados 67 peixes, sendo trinta machos, trinta e cinco fêmeas e dois não identificados, com peso médio de 1,49g ($\pm 0,99$), comprimento total médio de 4,88cm ($\pm 0,80$) e comprimento padrão médio de 3,87cm ($\pm 0,69$).

A avaliação parasitária dos peixes foi positiva para *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) e *Dolops* sp. (Branchiura) na superfície do corpo, *Urocleidoides* sp. (Monogenea) nas brânquias, *Prosthenhystera obesa* (Trematoda) na vesícula biliar, metacercárias de Echinostomatidae (Trematoda) nas brânquias e Diplostomidae tipo *Neascus* (Trematoda) na bexiga natatória e os Nematoda *Procamallanus hilarii* e *Rabdochona* sp. no intestino. A distribuição da prevalência e da intensidade de infecção está exposta na tabela 1.

Tabela 1. Média da prevalência (P) e da intensidade de infecção (II) dos metazoários parasitas encontrados no *Astyanax aff. bimaculatus* da região do baixo São Francisco, municípios de Propriá e Neópolis, Sergipe, Brasil.

| | Órgão Parasitado | Propriá (n=35) | | Neópolis (n=67) | |
|---|------------------|----------------|-------|-----------------|-------|
| | | P (%) | II | P (%) | II |
| <i>Lerneae cyprinacea.</i> (Copepoda) | Tegumento | 14,29 | 1,20 | 2,99 | 4,00 |
| <i>Urocleidoides sp.</i> (Monogenea) | Brânquias | 28,57 | 2,00 | 34,33 | 3,22 |
| <i>Rabdochona sp.</i> (Nematoda) | Intestino | 8,57 | 3,00 | 5,97 | 2,50 |
| <i>Procamallanus hilarii</i> (Nematoda) | Intestino | 20,00 | 7,00 | 11,94 | 1,13 |
| Echinostomatidae (Trematoda) | Brânquias | 57,14 | 47,65 | 74,63 | 19,98 |
| Diplostomidae (Trematoda) | Bexiga natatória | - | - | 2,99 | 9,00 |
| <i>Prosthenthystera obesa</i> (Trematoda) | Vesícula biliar | - | - | 1,49 | 1,00 |
| <i>Dolops sp.</i> (Branchiura) | Tegumento | - | - | 1,49 | 1,00 |

Avaliou-se material genômico dos peixes coletados com a seguinte distribuição segundo a origem: 34,3% oriundos de Propriá e 65,7% de Neópolis. Foram submetidos à extração de DNA genômico 91 amostras de tecido muscular dos peixes, sendo que destes, apenas 40% apresentaram integridade adequada.

Aproximadamente 41% dos *Astyanax aff. bimaculatus* coletados apresentaram perfil eletroforético homogêneo ao utilizar-se o primer CCCGTAGCAC (Fig. 1). Entre os espécimes oriundos de Propriá, o material genômico apresentou perfil eletroforético com bandas <800pb (n=11) e >800pb (n=4), sendo este último o padrão mais prevalente nos hospedeiros de Echinostomatidae nas brânquias. A análise de cluster originou uma árvore

filogenética com dois grupos distintos (Fig. 2), independentes do local de origem, entretanto homogênea com relação à expressão do caráter suscetibilidade/resistência à infecção parasitária.

De acordo com as análises estatísticas, os grupos filogenéticos não apresentaram diferenças significativas entre as intensidade de infecção por *Urocleidoides* sp. ($p=0,26$), e por Echinostomatidae ($p=0,84$).

DISCUSSÃO

Os copépodos são os crustáceos mais comuns parasitando peixes, tendo *Lernaea* o gênero mais patogênico deste grupo. Os copépodes lemeídeos são encontrados parasitando tegumento, brânquias, olhos, nadadeiras e até mesmo dentro do aparelho bucal, junto ao palato e narinas dos peixes. Permanecem aderidos a estas regiões por órgãos de fixação, resultantes das adaptações morfológicas da região cefálica destes parasitos (Eiras, 1994). As lesões causadas pelo parasita provocam desde hemorragias nos peixes evoluindo a anêmicos (Noga, 1995) e alterações na contagem geral de leucócitos (Silva-Souza *et al.*, 2000). Nos casos das infecções por *L. cyprinacea* e por *Dolops* sp., ambos ectoparasitas que não apresentam especificidade de hospedeiros, os *Astyanax* aff. *bimaculatus* coletados podem estar atuando como disseminadores de parasitoses devido ao fácil acesso desses peixes aos tanques de criação que se encontram nas proximidades do seu habitat.

Os nematódeos são parasitas encontrados comumente em peixes de água doce. Infecções geradas por esses parasitas podem afetar o crescimento, comprometer a saúde e provocar a morte dos peixes parasitados, causando impacto na pesca esportiva, comercial e na aquicultura (Choudhury & Cole,

2008). *Procamallanus* é um dos nematódeos mais comuns encontrados em peixes de água doce no Brasil, não apresenta especificidade de hospedeiro e já foi descrita em várias espécies de peixes na maioria das bacias hidrográficas brasileiras (Eiras *et al.*, 2010).

As metacercárias, como são chamadas as formas larvais de trematódeos, são mais prejudiciais ao hospedeiro do que as formas adultas. Ao migrarem pelos tecidos com o propósito de alcançar o sítio de infecção, podem causar lesões e, ao se encistar, causam também alterações teciduais. As larvas provocam patologias e debilitam os hospedeiros, tais características são ecologicamente importantes, pois um peixe debilitado é mais facilmente predado podendo o ciclo se completar no predador, hospedeiro definitivo (Pavanelli *et al.*, 2002).

Monogêneas apresentam ciclo de vida direto, podendo completar os estágios de desenvolvimento em um único hospedeiro. São encontrados principalmente nas brânquias podendo ser observados também na superfície do corpo, narinas e cavidades. Este grupo de parasitas possuem limitações na capacidade de dispersão migrando diretamente de um hospedeiro a outro, através da larva natante denominada oncomiracídio, sem a necessidade de um hospedeiro intermediário (Buchmann & Bresciani, 2006). Apresentam, geralmente, uma grande especificidade ao hospedeiro, desenvolvendo-se em uma única espécie ou em espécies próximas filogeneticamente (Poulin, 2002; Almeida & Cohen, 2011).

Entre as monogêneas, Llewellyn (1982) descreve dois tipos de especificidade: a filogenética, que ocorre em espécies relacionadas evolutivamente e parasitam hospedeiros também relacionados evolutivamente, e a ecológica, em que os parasitos relacionados ocorrem em hospedeiros não relacionados

filogeneticamente, mas que cohabitam no mesmo local. Poulin (1992) afirma que espécies distintas de hospedeiros podem compartilhar parasitas, através de eventos de colonização, troca de hospedeiro, ou por herança de um ancestral comum. A dispersão de parasitas entre várias espécies de hospedeiros pode levar a um aumento da abundância das espécies parasitas entre os hospedeiros, suportando a hipótese da especificidade ecológica (Simková *et al.*, 2006).

Os grupos filogenéticos obtidos na análise de cluster não exibiram diferenças entre as intensidades de infecção por *Urocleidoides* sp., demonstrando que esse parasita permeia entre os *Astyanax* estudados no baixo São Francisco, apresentando dessa maneira uma especificidade filogenética aos indivíduos pertencentes ao grupo *bimaculatus*.

Segundo Torres *et al.* (2004), para analisar as populações de *Astyanax* sp. provenientes das Furnas do Parque Estadual de Vila Velha, PR, foram empregados marcadores RAPD com a intenção de verificar níveis de variação e diferenciação genética entre as mesmas espécies inferindo assim possível isolamento geográfico e endemismo para a população. Kantek *et al.* (2008) utilizaram a técnica do bandeamento-C para análise populacional e variantes cromossômicas de várias espécies endêmicas de *Astyanax* coletadas no rio Iguaçu.

Pamponet *et al.* (2008) realizaram análises morfológicas, citogenéticas (cariótipo e Ag-RONs) e moleculares (RAPD e SPAR) em espécimes de *Astyanax* aff. *bimaculatus* coletados em três localidades diferentes nas bacias do rio das Contas e na bacia adjacente no Recôncavo Sul, localizadas na Bahia. Apesar de não apresentarem grandes variações morfológicas os autores

diferenciaram três populações geneticamente distintas revelando frequências alélicas significativamente diferentes entre as localidades amostradas e índices significativos de estruturação populacional.

Estratégias moleculares podem auxiliar na identificação taxonômica de *Astyanax* do grupo *bimaculatus*, que é difícil devido a grande semelhança na morfologia externa entre as espécies deste gênero. O aprofundamento/ampliação de estudos sobre a variabilidade genética em populações de *Astyanax*, associado às características das infecções parasitárias presentes, auxiliará para um melhor conhecimento sobre a dinâmica da relação parasita-hospedeiro nestes animais.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil, CNPq, pelas bolsas de estudo concedidas (ACPV, JMSS) e à Camila Pereira de Almeida pelo auxílio em laboratório.

REFERÊNCIAS

Almeida, CSS & Cohen, SC. 2011. *Diversidade de Monogenea (Platyelminthes) parasitos de Astyanax altiparanae do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu*. Revista Saúde & Ambiente, vol. 6, pp. 31-41.

Brasil, Ministério do Meio Ambiente. 2013. *Biodiversidade Brasileira*. Consultado em janeiro de 2013, <www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>.

Buchmann, K & Bresciani, J. 2006. Monogenea (Phylum Plathyheminthes). In. Woo, PTK *Fish diseases and disorders. Vol.1 Protozoan and Metazoan Infections*. 2nd Ed. CAB International. London.

- Bush, AO, Lafferty, KD, Lotz, JL, Shostak, AW. 1997. *Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited*. Journal of Parasitology, vol. 83, pp. 575-583.
- Choudhury, A & Cole, RA. 2008. *Nematoda*, In: Eiras, JC, Segner, H, Wahli T & Kapoor, BG. (eds.) *Fish Diseases, Vol. 2*. Science Publishers, Enfield.
- Eiras, JC, Takemoto, RM & Pavanelli, GC. 2010. *Diversidade dos parasitos de peixes de água doce do Brasil*. Eduem, Maringá.
- Eiras, JC. 1994. *Elementos de ictioparasitologia*. Fundação Eng. António de Almeida, Porto.
- Froese, R & Pauly, D. 2012. *FishBase. World Wide Web electronic publication*. Consultado em dezembro de 2012, <www.fishbase.org>.
- Gallio, M, Silval, AS, Monteiro, SG. 2007. *Parasitismo por Lernaea cyprinacea em Astyanax bimaculatus provenientes de um açude no município de Antonio Prado, Rio Grande do Sul*. Acta Scientiae Veterinariae, vol. 35, pp. 209-212.
- Garutti, V & Britski, HA. 2000. *Descrição de uma espécie nova de Astyanax (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as de espécies do gênero da bacia*. Comunicação do Museu de Ciência e Tecnologia, vol. 13, pp. 65-88.
- Kantek, DLZ, Cipriano, RR, Noletto, RB, Fenocchio, AS, Artoni, RF & Cestari, MM. 2008. *Population analysis of a chromosome polymorphism in Astyanax (Teleostei, Characiformes) species endemic to the Iguazu River*. Genetics and Molecular Biology, vol. 31, pp. 239-242.
- Lizama, MAP, Takemoto, RM & Pavanelli, GC. 2008. *Ecological aspects of metazoan parasites of Astyanax altiparanae Garutti & Britski, 2000*

(*Characidae*) of the upper Paraná river floodplain, Brazil. Boletim do Instituto de Pesca, vol. 34, pp. 527–533.

Llewellyn, J. 1982. *Host-specificity and corresponding evolution in Monogenean flatworms and vertebrates*. Mémoires de Musée National d'Histoire Naturelle, Serie A Zoologie, vol. 123, pp. 289-293.

Noga, EJ. 1995. *Fish disease*. Missouri: Mosby.

Pamponet, VCC, Carneiro, PLS, Affonso, PRAM, Miranda, VS, Silva Júnior, JC, Oliveira, CG & Gaiotto, FA. 2008. *A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of Astyanax aff. bimaculatus Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil*. Neotropical Ichthyology, vol. 6, pp. 621-630

Pavanelli, GC, Eiras, JC & Takemoto, RM. 2002. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Eduem, Maringá.

Peres, W, Bertollo, L, Buckup, P, Blanco, D, Kantek, D & Moreira- Filho, O. 2012. *Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in Astyanax “bimaculatus group” (Characiformes: Characidae)*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, vol. 22, pp.519-526.

Pinese, OP, Rêgo, ACL, Pinese, JF. 2007. *Ictiofauna da região do Domo do Salitre I (Patrocínio, MG)*. VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, pp. 543.

Poulin, R. 1992. *Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes*. International Journal for Parasitology, vol. 22, pp. 753–758.

Poulin, R. 2002. *The evolution of monogenean diversity*. International Journal for Parasitology, vol. 32, pp. 245-254.

- Silva-Souza, AT, Almeida, SC & Machado, PM. 2000. *Effects of infestation by Lernaea cyprinacea Linnaeus, 1758 (Copepoda, Lernaecidae) on the leukocytes of Schizodon intermedia Garavello & Britski, 1990 (Osteichthyes, Anostomidae)*. Revista Brasileira de Biologia, vol. 60, pp. 217-220.
- Simková, A, Verneau, O, Gelnar, M & Morand, S. 2006. *Specificity and specialization of congeneric monogeneans parasitizing cyprinid fish*. Evolution, vol. 60, pp. 1023-1037.
- Torres, RA, Matoso, DA & Artoni, RF. 2004. *Genética de Peixes Neotropicais. II. Biologia Molecular de peixes Neotropicais*. Publicação UEPG Ciência Biologia Saúde, vol. 10, pp. 27-37.

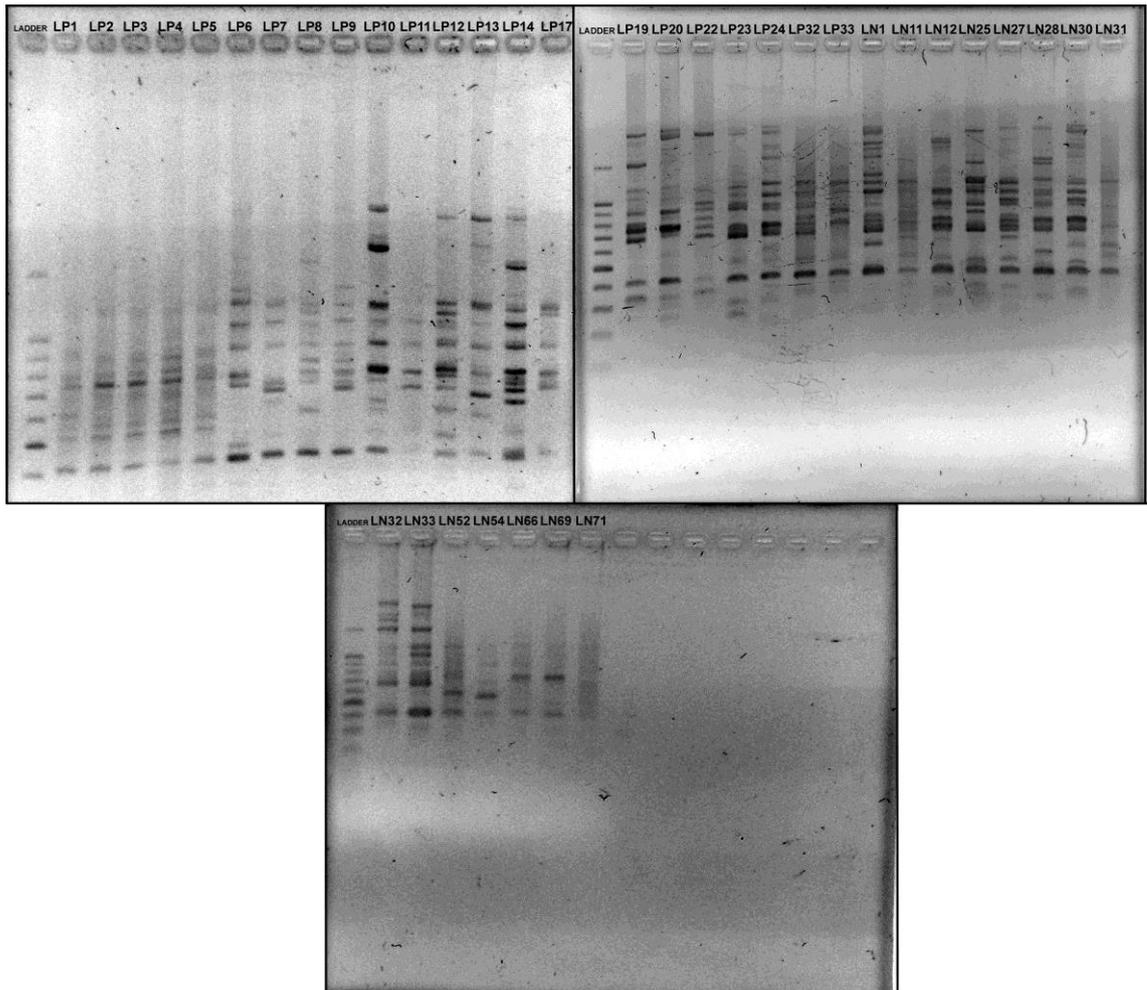


Figura 1. Perfil eletroforético das amostras de DNA de *Astyanax aff bimaculatus* coletados nos municípios de Propriá e Neópolis, SE, submetidos à amplificação via PCR-RAPD, utilizando o iniciador OPR-4 (CCCGTAGCAC).

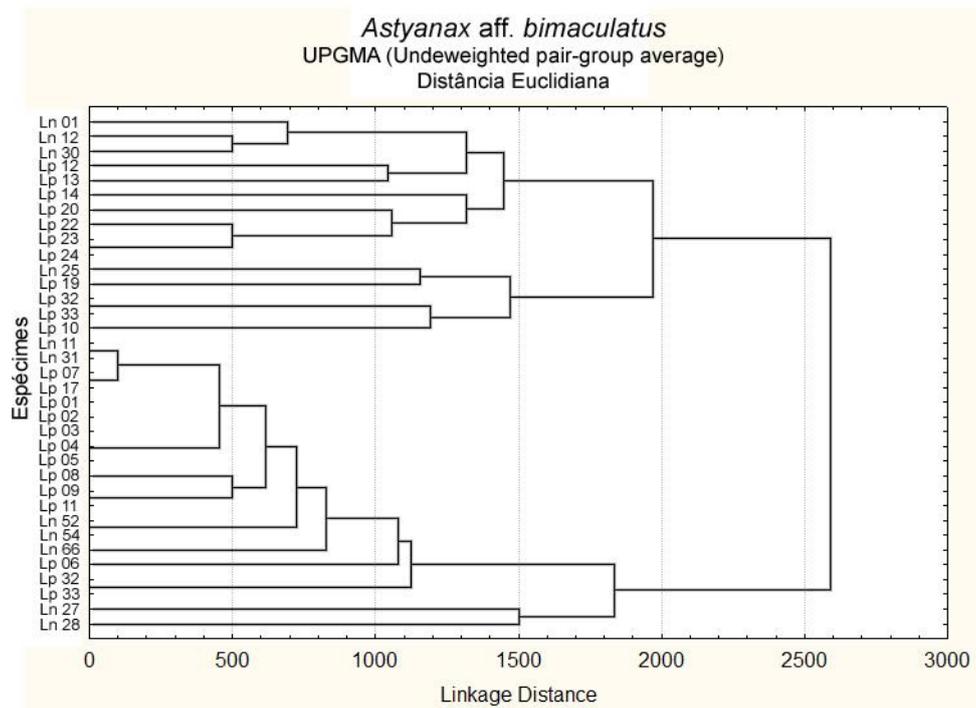


Figura 2. Árvore filogenética de *Astyanax aff. bimaculatus* coletados nos municípios de Propriá e Neópolis, SE, com dois ramos/grupos distintos, independentes do local de origem.

7 - CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados demonstram que espécimes de *P. argenteus* com maior proximidade genética são mais suscetíveis à infecção parasitária por *S. asperus*, *T. toksomun* e *Dolops* sp., no trecho da bacia do rio São Francisco estudado.

Apesar de não apresentarem grandes variações morfológicas foram diferenciadas três populações geneticamente distintas revelando frequências alélicas significativamente desiguais entre as localidades amostradas e índices significativos de estruturação populacional, apesar de não apresentarem diferenças na caracterização das infecções parasitárias.

O aprofundamento/ampliação de estudos sobre a variabilidade genética em populações de peixes, associado às características das infecções parasitárias presentes, auxiliará para um melhor conhecimento sobre a dinâmica da relação parasita-hospedeiro nestes animais, tornando-se necessário o manejo dos estoques de produção piscícola com enfoque seletivo de linhagens visando a resistência à infecção parasitária.

8- REFERÊNCIAS

BOEGER W.A. *Lernea: Biologia e Prevenção*. **Panorama da Aqüicultura**. 9:32-36. 1999.

BONI, T.A.;GOUVEIA, F.O.;RESENDE, L.V. SILVA JÚNIOR, N.J.; TELLES, M.P.C. **Transferibilidade de locos microssatélites de espécies da Ictiofauna para *Astyanax altiparanae***. 55º Congresso de Genética, 2009.

BUSH, AO, LAFFERTY, KD, LOTZ, JL, SHOSTAK, AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology*. 83:575-583. 1997.

CAMPOS, C.F.M. **Fauna parasitária e alterações teciduais em três espécies de peixes dos rios Aquidauana e Miranda, Pantanal Sul Mato-Grossense**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de São Paulo, 2006.

CAMPOS, W.N. **Análise comparativa da variação genética entre os estoques cultivados e natural de *Prochilodus argenteus*: implicações para o repovoamento de rios**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2009.

CAMPOS, C.M.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Histopathology of gills of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) infested by Monogenea and Myxosporea, caught in Aquidauana River, State of Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 20(1): 67-70. 2011.

CARVALHO, A.R.; TAVARES, L.E.R.; LUQUE, J.L. Metacercárias tipo *Neascus* em *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae) do rio do Peixe, Juiz de Fora, Brasil. *Actae Scientiae Biological Science*. 30:315-320. 2008.

CODEVASF. 2007. Disponível em: <http://www.codevasf.gov.br/programas_acoes/desenvolvimento-territorial/estacao-de-piscicultura-de-betume-2013-4a-epe> acessado em 12 de novembro de 2011.

COSTA, C.H.A.; CAMARGO, M. *Procamallanus (Spirocamallanus)* sp. (Camallanidae), um endoparasitado trato digestivo de *Bivibranchia velox*

(Eigenmann & Myers, 1927) e *B. fowleri* (Steindachner, 1908), no setor do médio rio Xingu, Pará, Brasil. **UAKARI**. 5:97-103. 2009.

DIAS, M.T. **Doenças causadas por parasitas em tambaqui cultivado na Amazônia**. Embrapa. Amapá, 2010.

EIRAS, J.C., R.M. TAKEMOTO & G.C. PAVANELLI . **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. Maringá, EDUEM. 121. 2000.

EIRAS, J.C., MONTEIRO, C.M., BRASIL-SATO, M.C. 2010. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Brasil, with a revision of *Myxobolus* spp. From South America. **Zoologia** 27 (1): 131-137. 2010.

FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN) **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Roma, 2010.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; REVALDAVES, E.; FORESTI, F.P.; SANTOS, S.A. **Análise genética de estoques de reprodutores de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da estação de piscicultura de promessa, utilizando marcadores de RAPD**. Instituto de Biociências UNESP, 2005.

GALLIO, M, SILVA, AS, Monteiro, SG. Parasitismo por *Lernaea cyprinacea* em *Astyanax bimaculatus* provenientes de um açude no município de Antonio Prado, Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35(2):209-212. 2007.

GARUTTI, V & BRITSKI, HA. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as de espécies do gênero da bacia. **Comunicação do Museu de Ciência e Tecnologia**. 13:65-88. 2000.

GODINHO, H.P. & GODINHO, A.L. **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas. 2003.

HENRIQUES, J.M.; SIROL, R.N.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. **Validação de primers de microssatélite para uso em estudos populacionais de**

Curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes, Prochilodontae). Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007.

HOLMES, J.C.; BETHEL, W.M. **Modification of intermediate hosts behaviour by parasites. In Behavioural aspects of parasite transmission.** ed. Canning, E. U. and Wright, C.A. London: Academic Press, 1972.

IBAMA (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS) **Estatísticas da pesca – Brasil. Grandes regiões e unidades da federação.** IBAMA-MMA, 2007. p 151.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixes, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science.** 13:54-63. 2008.

KRISTSKY, D.C.; BOEGER, W.A.; POPAZOLO, F. Neotropical Monogenoidea 22. Variation in *Scleroductus* species (Gyrodactylidae, Gyrodactylidea) from siluriform fishes of Southeastern Brazil. **Journal helminthology Society Wash.** 53-56. 1995.

LANGERON, M. **Précis de Microscopie. Masson et Ciencie.** Paris, 1949.

LIZAMA, MAP, TAKEMOTO, RM, PAVANELLI, GC. *Ecological aspects of metazoan parasites of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characidae) of the upper Paraná river floodplain, Brazil.* **Boletim do Instituto de Pesca.** 34:527–533. 2008.

LOPES, F.F. **Monitoramento ambiental da bacia hidrográfica do Lago Guaíba- RS- Brasil, através da utilização de diferentes metodologias aplicadas a toxocenoses de peixes.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

MELO, C.M. **Apoio ao fortalecimento da APL de aquicultura e combate ao índice de esquistossomose na Sub-região Sergipana do sertão do São Francisco/SE.** Relatório Técnico. Codevasf/ITP, 2008.p.98.

MONTEIRO, C.M., SANTOS, M.D., ZUCHI, N.A., BRASIL-SATO, M.C. Ecological parameters of the endohelminths in relation to size and sex of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. **Zoologia** 26 (4): 753-757. 2009.

- NELSON, J.S. 1994. **Fishes of the World**. John & Sons, New York, 600pp.
- OLIVEIRA, S.A.L. **Pesquisa de helmintos em musculatura e serosa abdominal de peixes de importância comercial capturados no litoral Norte do Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, 2005.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2. edição. Ed. Universidade Estadual de Maringá, 2002. p.305p.
- PERES, W, BERTOLLO, L, BUCKUP, P, BLANCO, D, KANTEK, D, MOREIRA-FILHO, O. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax "bimaculatus group"* (Characiformes: Characidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 22:519-526. 2012
- PINTO, R.M.; VICENTE, J.J. Nematóides de Brasil. Nematóides de peixes. Atualização: 1985-1998. **Revista Brasileira. Zoologia**. 16:561-610. 1999.
- PIZAIA, M.G.; CAMARA, M.R.G.; SANTANA, M.A.; ALVES, R. **A piscicultura no Brasil: um estudo sobre a produção e comercialização de "Oreochromis niloticus"**. Sociedade Brasileira de Economia , Administração e Sociologia Rural. Rio Branco - Acre, 2008.
- POPAZOGLO, F. **Monogenoidea (Platyhelminthes) de Corydoras ssp. (Siluriformes, Callichthyidae) e avaliação da sua utilidade na discriminação de espécies simpátricas de seus hospedeiros**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 1997.
- SALEM, H.H.; ALI, B.A.; HUANG, T.H.; QIN, D.N.; WANG, X.M.; XIE, Q.D. Use of random amplified polymorphic DNA analysis for economically important food crops. **Journal of Integrative Plant Biology**. 49 (12):1670-1680. 2007.
- SANCHES, E.G. Controle de *Neobenedenia melleni* (Maccallum, 1927) (Monogenea: Capsalidae) em Garoupa – Verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), cultivada em tanques rede. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 17 (3):145-149. 2008.
- SANTOS, C.A.M.L. **A qualidade do pescado e a segurança dos alimentos**. II Simpósio de controle do pescado. Instituto de Pesca. São Vicente. SP. 2006 Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/qualidade_pescado.pdf

SANTOS, V.B.; FIRETTI, R.; SALES, D.S. **Peixe quer água boa. O olho nem sempre percebe, mas a produtividade da piscicultura pode estar sendo comprometida por falta de qualidade de água.** Anualpec, 2008.

SATO, Y., BAZZOLI, N., RIZO, E., BOSCHI, M.B., MIRANDA, M.O.T. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the Neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias dam, southeastern Brazil. **River Research and Applications.** 21 (8): 939-950. 2005.

SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. Efeitos do parasitismo sobre a estrutura branquial de *Leoporinus macrocephalus* Garavello e Britsk, 1988 (Anastomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** 15 (3):110-115. 2006.

SEBRAE NACIONAL. **História da aquicultura no Brasil. Aspectos evolutivos e modelo de desenvolvimento da aquicultura brasileira.** <http://www.sebrae.com.br> - acesso em 20/04/2011.

SILVA, N.J.R. **Dinâmicas de desenvolvimento da piscicultura e políticas públicas no Vale do Ribeira/SP e alto do vale do Itajaí/ SC – Brasil.** Tese de mestrado. Universidade Estadual de São Paulo, 2005.

SOUSA, I.F.; COSTA, O.A.; AGUIAR NETTO, A.O.; NETO, A.L.S. **Balanco hídrico nas principais bacias hidrográficas do estado de Sergipe em 1999.** <http://www.cbmet.com> – acessado em 20/04/2011.

SOUZA, G.A.; CARVALHO, M.R.O.; MARTINS, E.R.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, L.O. Diversidade genética estimada em marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** 43(7): 843-849. 2008.

TAVARES, L. E. R. & LUQUE, J. L. Aspectos quantitativos das infrapopulações de *Caligus praetextus* Bere, 1936 (Copepoda, Caligidae) parasitos do robalo *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) (Osteichthyes, Centropomidae) no litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira Zootecias.** 253-258. 2001.

TORRES, RA, MATOSO, DA, ARTONI, RF. Genética de Peixes Neotropicais. II. Biologia Molecular de peixes Neotropicais. **Ciência Biologia Saúde**. 10 (2):27-37. 2004.

VERMULM JUNIOR, H.; GIAMAS, M.T.D. Levantamento da pesca profissional continental, no Estado de São Paulo em 2007. Dados preliminares das Bacias dos Rios Paranapanema, Paraná e Grande. **Série Relatórios Técnicos**. 36:1-9. 2009.

VIANNA, R. T.; BOERGER, W.A.; SILVA-SOUZA, A.T. Neotropical Monogenoidea. 52. *Diechodactylus joaberi* n. g. n. sp. from the banded knifefish *Gymnotus carapo* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in southeastern Brazil. **Systematic Parasitology**. 69:45-50. 2008.

WHITTINGTON, I.D. The Capsalidae (Monogenea: Monopisthocotylea): a review of diversity, classification and phylogeny with a note about species complexes. **Folia Parasitologica**. 51:109-122. 2004.