

5.06.03- Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca/Aquicultura

IMPLANTAÇÃO DE *Macrobrachium rosenbergii* NO VALE DE ITAJAÍ: ASPECTOS BIOLÓGICOS E DE SANIDADE.

Mayra L. Schelter¹, Caroline L. Machado², Ilson Jr. P. Moratelli³, Maria Risoleta Freire Marques⁴, Juliana Righetto Moser⁵, Isabel Cristina Müller⁶

1. Estudante de Engenharia Agrônômica do IFC- Campus Rio do Sul.
2. Estudante de Engenharia Agrônômica do IFC- Campus Rio do Sul.
3. Estudante de Engenharia Agrônômica do IFC- Campus Rio do Sul.
4. Doutora. Professora da UFSC - Campus Florianópolis.
5. Doutora. UFSC - Campus Florianópolis.
6. Doutora. Professora do IFC- Campus Rio do Sul.

Resumo

O cultivo de camarão representa significativa importância socioeconômica para muitos países, sendo que a principal espécie cultivada no país é o camarão *Litopenaeus vannamei*. Entretanto, a partir de 2004, este setor vem enfrentando diversos problemas: doenças como o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Como alternativa, surge a criação de camarões em regiões continentais, utilizando espécies como *Macrobrachium rosenbergii*. Como o cultivo de *M. rosenbergii* é uma atividade muito recente no Vale do Itajaí, não existem informações a respeito da adaptabilidade desta espécie. Utilizando metodologias moleculares como extração de DNA, PCR e ainda testes de coagulação da hemolinfa este trabalho objetivou acompanhar e avaliar o crescimento e sobrevivência destes animais e determinar indicadores do seu estado de saúde. Através dos dados obtidos um minicurso foi ministrado, buscando qualificar estudantes, produtores e profissionais da área.

Palavras-chave: Carcinicultura; diagnóstico molecular; vírus.

Apoio financeiro: CNPq (Bolsa PIBITI I.J.P.M.), IFC - Reitoria (edital 267/2017, fomento e bolsas de pesquisa de M.L.S. e de extensão de C.L.M.).

Introdução

No agronegócio, o cultivo de camarão é um dos segmentos que apresenta importância socioeconômica para muitos países. Este segmento vem expandindo-se de forma bastante acelerada em diversos países litorâneos. O cultivo de camarões no Brasil, a partir da década de 90, apresentou uma extraordinária expansão, especialmente no Nordeste. A principal espécie cultivada no país é o camarão de água salgada *Litopenaeus vannamei*.

Entretanto, a partir de 2004, o setor vem enfrentando diversos problemas: doenças como o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), redução de preços e a competição com países asiáticos. Como alternativa, surge a criação de camarões de água doce em regiões continentais, utilizando espécies como *Macrobrachium rosenbergii*.

M. rosenbergii é caracterizada por um longo rostro estendendo-se além da escala antenal, com 11-14 dentes dorsais e 8-10 ventrais e flagelos de coloração azul a cinza claro. Segundo pereiópodo grande, robusto e densamente coberto por espinhos e tubérculos agudos (CHAN, 1998).

No Brasil, o cultivo de *M. rosenbergii* teve início em 1977 pelo Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco e se difundiu, por meio de órgãos públicos e de iniciativa privada, nos Estados de Maranhão, Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (VALENTI & NEW, 2000). Como o cultivo de *M. rosenbergii* é uma atividade muito recente no Alto Vale do Itajaí, não existem informações a respeito da adaptabilidade desta espécie à região.

Além disso, existem poucas informações a respeito da ocorrência de enfermidades virais e bacterianas em *M. rosenbergii* cultivados no Brasil. Assim, existe a necessidade de acompanhar e avaliar aspectos como crescimento e sobrevivência destes animais nas condições da região, determinando parâmetros indicadores do estado de saúde dos animais, evitando a ocorrência de doenças ou/e mortalidades nos cultivos da região. Os objetivos do presente trabalho foram padronizar técnicas moleculares para o diagnóstico de WSSV e IHNV em amostras de *M. rosenbergii*, assim como, por meio de um curso de capacitação, instruir acadêmicos, produtores e profissionais da área, aplicando o conhecimento teórico e prático das técnicas usadas para diagnóstico.

Metodologia

O primeiro procedimento a ser realizado inclui a obtenção de amostras provenientes do setor de aquicultura do IFC bem como de três propriedades localizadas em: Agrolândia-SC, Gaspar-SC e Ascurra-SC. As extrações de DNA, seguiram o protocolo de Maciel (2002), modificado por Moser (2005). Foram utilizados

distintos tecidos de *M. rosenbergii*, armazenados congelados a -10° C. A integridade da extração e o tamanho das bandas formadas foram observados através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1x. O DNA genômico extraído é utilizado em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR's). Para diagnosticar a presença de WSSV os iniciadores WS146F1 e WS146R1 (Lo et al.,1996) são utilizados na primeira etapa (*first*), gerando um fragmento de 1447 pb. Na segunda etapa (*nested*) foram utilizados os iniciadores WS146F2 e WS146R2 (Lo et al.,1996), os quais geram um fragmento de 941 pb. Já para o diagnóstico de IHHNV, os iniciadores IHHNV-F HHHNV-R (MOSER, 2005) são utilizados, amplificam um produto de 512 pb se constatada infecção.

As reações são realizadas nas seguintes condições: 10 mM de tampão para PCR; 200 µM de cada base nitrogenada (adenina, timina, citosina e guanina); 3 mM de MgCl₂; 100 mM de cada iniciador (forward e reverse); 1 unidade de taq DNA polimerase e água para biologia molecular suficiente para ajustar o volume da reação em 24 µl; no final 1 µl de DNA genômico é adicionado à solução. A PCR para WSSV caracteriza-se como *nested* PCR, ocorrendo em dois passos, o primeiro (*first*) segue a dinâmica relatada acima, no segundo (*nested*) no lugar da amostra de DNA são pipetados 1 µl do produto do primeiro passo. Os microtubos são levados ao termociclador, cuja programação está descrita abaixo:

Iniciador	Programação
WSSV (ambos os passos)	94°C por 3 minutos, 55°C durante 1 minuto, 72°C por 2 minutos. Seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C 1 minuto.
IHHNV	94°C por 2 minutos. Seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72°C por 45 segundos e por fim 72° C por 10 minutos.

Quadro 01: Programação do termociclador para PCR dos iniciadores de WSSV e IHHNV.

Os resultados são observados através de eletroforese em gel de agarose 2%. Além disso, também foram realizados testes de coagulação da hemolinfa, caracterizado por ser simples e rápido. Pode ser realizado a campo como uma forma de detectar com rapidez se há algum desequilíbrio biológico na produção de camarão. A hemolinfa de cada camarão foi coletada com auxílio de uma seringa. A agulha foi inserida na parte dorsal do camarão entre o cefalotórax e o abdômen, a hemolinfa extraída é depositada em uma lâmina onde de imediato foi realizado o esfregaço, utilizando a própria agulha. O tempo de coagulação, em segundos, foi anotado.

O curso foi desenvolvido nas dependências do IFC- Campus Rio do Sul e contou com 11 participantes. O curso foi ministrado do dia 02 a 04 de outubro, voltado para os acadêmicos do curso de Agronomia e profissionais das áreas de ciências biológicas e agrárias atuando nas áreas de sanidade animal e aqüicultura, dividindo-se em etapas teóricas e práticas. Os alunos foram organizados em grupos e realizaram todos os procedimentos, sendo estes eletroforese, reação da cadeia polimerase (PCR) e teste da coagulação da hemolinfa, com amostras de *M. rosenbergii* e de *L. vannamei*. E ao final do curso foi aplicado um questionário avaliativo onde os participantes avaliaram alguns quesitos sobre o conteúdo prático e teórico do curso.

Resultados e Discussão

Para garantir a sustentabilidade da carcinicultura, a prevenção e controle de doenças devem ser combinados a boas práticas de manejo. Uma das medidas de prevenção é o monitoramento contínuo das enfermidades, desde a identificação de sinais macroscópicos, até a identificação molecular destes microrganismos. Os métodos moleculares aumentam a sensibilidade e a especificidade da detecção dos patógenos, além de reduzir a subjetividade inerente à interpretação de dados morfológicos e biológicos (FRAGA, 2011).

Com relação às extrações de DNA podemos observar na figura amostras extraídas de distintos tecidos utilizando a metodologia de Maciel (2002) modificado por Moser (2005). Os tecidos são, respectivamente pleópodo, músculo, olho, exoesqueleto, brânquia, quela. Todos foram extraídos de material congelado, é possível também visualizar o marcador de 100pb. As amostras obtidas dos pleópodos, músculo e olho formaram bandas de alto peso molecular as tornando aptas para PCR, enquanto as demais apresentaram intenso grau de degradação inviabilizando sua utilização. Entretanto como a presença de inibidores da PCR não é conhecida, testes devem ser realizados. Optou-se, então, por iniciar a padronização das PCRs pelos tecidos pleópodos e músculos, como pode ser observado na Figura 1, já que são rotineiramente utilizados em diagnóstico molecular.

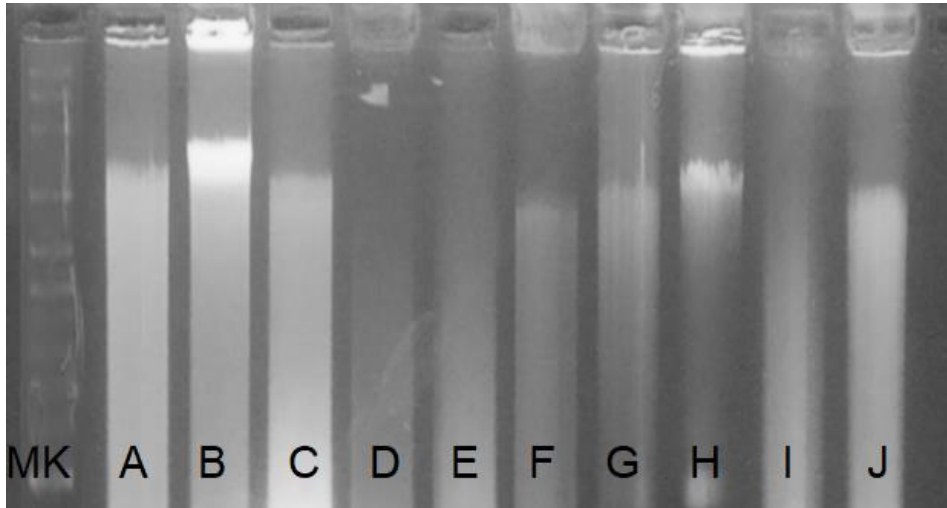


Figura 01. Gel de agarose 1% contendo amostras de DNA genômico de *M. rosenbergii*, extraído através do método de Maciel (2002) modificado por Moser (2004). Onde MK marcador 100pb; A, G, H, I e J: Pleópode, B: Músculo, C: Olho, D: Exoesqueleto; E: Brânquia e F: quela.

Nas PCR com iniciadores para a amplificação do fragmento genômico de WSSV e IHNV amostras de *Litopenaeus vannamei* positivas para a enfermidade foram utilizadas como controle positivo, na figura 2 é possível observar dois géis de agarose 2%, onde: a) PCR com iniciadores de WSSV e b) PCR com iniciadores de IHNV. Em ambas é possível observar a presença de ampliações somente nas amostras de *L. vannamei*, demonstrando ausência de contaminações em *M. rosenbergii* (HOSSAIN et al., 2001)

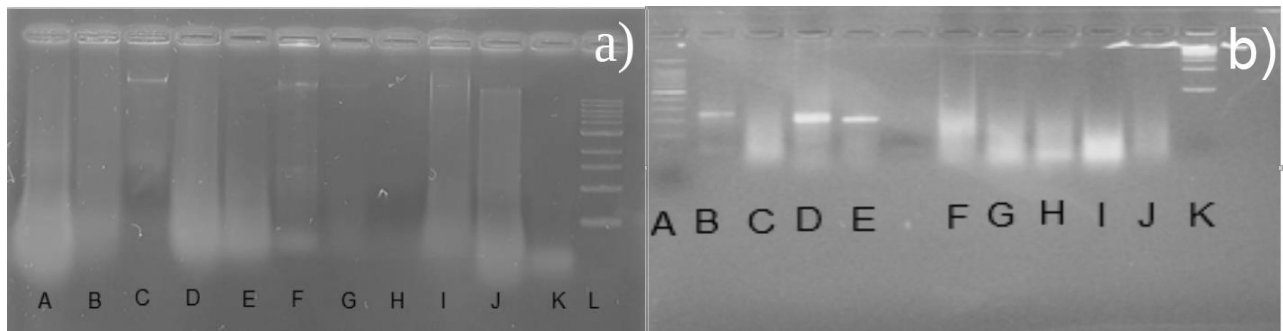


Figura 2. Géis de agarose 2%. a) PCR WSSV, onde C, F, G e J são amostras de *L. vannamei* positivas para a enfermidade, as demais de *M. rosenbergii*. b) PCR IHNV, onde A, D, E são controles positivos e as demais amostras de *M. rosenbergii*.

Durante uma infecção o número de hemócitos pode baixar consideravelmente quando se constata a sua instalação, novos hemócitos precisam ser produzidos pelo tecido hematopoiético, e isso prejudica, dentre outros fatores, a coagulação da hemolinfa (SANTOS et al., 2005). Com relação ao teste de coagulação da hemolinfa, todas as amostras coagularam em até 25 segundos, sendo que na literatura alguns autores relatam que o tempo de coagulação da hemolinfa em camarões de cultivo é tido como aceitável quando for menor ou igual a 40 segundos (PEREIRA; SANTOS, 2003). Assim, podemos considerar que os animais avaliados se encontram saudáveis.

A realização de um curso sobre camarões de água doce e as técnicas utilizadas para identificar e garantir a sanidade dos mesmos se mostrou satisfatória para os participantes, sabendo-se as vantagens de criar camarões saudáveis. Por fim, foi, ao final do curso os integrantes foram instruídos a responder um questionário que abordava questões de nível de satisfação dos participantes sobre os conteúdos e abordagem dos assuntos tratados no curso e sugestões para aprimorar o curso.

Conclusões

No presente trabalho, metodologias para a identificação de enfermidades em camarões *M. rosenbergii* foram padronizadas. Após a padronização das mesmas, um curso de capacitação para estudantes e profissionais da área foi realizado. Os camarões de água doce apresentaram resultados negativos para as doenças analisadas, sendo elas WSSV e IHNV.

O estudo sobre a sanidade de camarões de água doce (*M. rosenbergii*) é de suma importância tendo em vista que a carcinicultura cresce exponencialmente no país e o cultivo de camarões de água doce têm potencial de expansão no Alto Vale do Itajaí.

Referências bibliográficas

- CHAN, T.Y. 1998. Shrimps and prawns. In: Carpenter K.E., Niem V.H. (eds), FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 2. Cephalopods, crustaceans, holothurians and sharks: 687-1396 (shrimps and prawns pp. 851-972).
- FRAGA, A.P.M..Padronização e avaliação de métodos moleculares para a detecção do Vírus da Mancha Branca em amostras de plâncton e sedimentos coletadas em viveiros de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*. Universidade Federal de Santa Catarina. 2011. 96p. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.
- HOSSAIN SM.; CHAKARABORTY A.; JOSEPH B.; OTTA SK.; KARAUNASAGAR I. Detection of new host for white spot syndrome Shrimp virus using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*; 198: 1-11, 2001.
- LO, C. F.; LEU, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H.; OU, G. H. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 25, p. 133-141, 1996.
- MACIEL, M. L. T. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina. 2002. 38p. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- MOSER, J.R. Respostas bioquímicas do camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do Vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética – IHNV. 2005. 76 p. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PEREIRA, A. M. L.; SANTOS, M. L. Relatório do treinamento em patologia de camarões marinhos, realizado no Instituto Tecnológico de Sonora, Obregón – México, Parnaíba,2003.
- SANTOS, M. L.; CARVALHO R.; ALENCAR R.; NETO, A. P.; FONSECA, C. S.; PEREGRINO, L. P.; ROCHA, I.; RODRIGUES, J. ABCC - Associação Brasileira dos Criadores de Camarão Marinho. Programa de biossegurança na fazenda de camarão marinho. 1ª edição, p. 1-63, jan., 2005.
- VALENTI, W. C. & M. B. NEW. 2000. Grow-out systems Monoculture. In: New, M. B. & Valenti, W. C. (Ed.) *Freshwater Prawn Culture: The farming of Macrobrachium rosenbergii*. Oxford, Blackwell Science. p. 157-176.