



Percepção química de patógenos na escolha de parceiros em tilápia-do-Nilo.

Discente: Isabela Maria de Mello

Orientação: Prof^a. Dr^a. Percília Cardoso Giaquinto

Co-orientação: Vanessa Stramantinoli Rossi

Iniciação científica

Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Departamento de
Fisiologia.

Percepção química de patógenos na escolha de parceiros em tilápia-do-Nilo.

Isabela Maria de Mello¹, Vanessa Stramantinoli Rossi¹ e
Percília Cardoso Giaquinto¹.

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia – Comportamento e Bem-estar Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Na seleção sexual, machos e fêmeas escolhem seus parceiros baseados em características associadas ao aumento do “fitness” individual e tais características sexuais apresentadas pelos machos influenciam a escolha das fêmeas. A escolha em peixes pode ser realizada por vários canais sensoriais, entre eles o químico. Os sinais químicos emitidos por machos podem conter indicadores sobre a saúde ou a qualidade genética dos possíveis parceiros. Assim, testamos se a fêmea de tilápia-do-Nilo percebe, através de sinais químicos, a presença de patógenos em machos. Para tanto, fêmeas foram testadas individualmente em testes de escolha em relação a estímulos químicos provenientes de dois machos, sendo um macho infectado e um sadio. A maioria fêmeas (81,25%) visitou inicialmente e com menor latência ($p=0,007$) o compartimento contendo os sinais químicos de machos saudáveis. Porém, não houve diferença no tempo total gasto nos compartimentos ($p=0,085$). Concluimos que há indícios que fêmeas percebem sinais químicos condizentes com o estado de saúde dos machos, mas que tal escolha não se manteve consistente.

Palavras-chave: Escolha, pistas químicas, infecção e *Aeromonas hydrophila*.

ABSTRACT:

In sexual selection, males and females choose their partners based on characteristics associated with increased individual "fitness" and such sexual characteristics presented by males influence females' choice. The choice in fish can be performed by various sensory canals, including the chemical. Chemical signals emitted by males may contain indicators of health or genetic quality of potential partners. Thus, we tested if the female Nile tilapia realizes through chemical signals the presence of pathogens in males. To this end, females were individually tested in choice tests regarding two males, with one infected male and one healthy male. Most females (81.25%) visited faster and firstly ($p=0.007$) the compartment with chemical signs of healthy males. However, there was no difference regarding total time between the compartments ($p=0.085$). We conclude that there is evidence of females' perception of chemical signal of males, but it did not remain consistent over the choice.

Keywords: Choice, chemical cues, infection and *Aeromonas hydrophila*.

Introdução

As diferenças na habilidade reprodutiva dos animais são explicadas pela teoria da seleção sexual de Darwin (1875). Ele explica que, diferentemente da seleção natural, a seleção sexual está associada à vantagem que certos indivíduos apresentam sobre os outros do mesmo sexo e da mesma espécie, somente no que diz respeito à reprodução. Ainda de acordo com essa teoria, machos e fêmeas escolhem seus parceiros baseados em características associadas ao aumento do "fitness" individual. Por exemplo, características associadas ao aumento do número de prole ou ao aumento da probabilidade de sobrevivência da prole, o que eleva o sucesso reprodutivo da espécie (Barbosa e Magurran, 2006; Martín et al., 2007).

A contribuição genica para a prole é igual entre machos e fêmeas, porém, o gasto energético no investimento parental pela fêmea é superior ao

do macho (Trivers, 1974). Dessa maneira, a fêmea escolherá de acordo com as características sexuais apresentadas pelos machos (Noonan, 1983). Dentre elas podemos citar a coloração, o tamanho, exibições de corte, ornamentos nupciais, qualidade do território e feromônios (Ahnsesiö et al, 2008). Essas são informações que atraem as fêmeas e, se forem geneticamente herdáveis, podem aumentar a eficiência reprodutiva da espécie (Hamilton e Zuk, 1989; Johansson e Jones, 2007).

A escolha da fêmea em peixes pode ser realizada por vários canais sensoriais, como comunicação visual, química, elétrica e sonora (Gonçalves-de-Freitas et al., 2009). A comunicação química é uma via importante para a reprodução das espécies (Agosta, 1992; Penn, 1998) e os ciclídeos dependem desses sinais para atrair seus parceiros (Stacey, 2003; Castro, 2009). Os feromônios são definidos como substâncias emitidas por um indivíduo e recebidas por outro da mesma espécie, que tem como resultado uma reação específica, como por exemplo, um comportamento (Karlson e Luscher, 1959). Eles estão relacionados a vários aspectos do comportamento de peixes, como formação de território, de cardumes, reprodução (Solomon, 1977; Rantala et al, 2002) e estado nutricional (Fisher e Rosenthal, 2006; Giaquinto et al., 2010).

Os sinais químicos emitidos por machos podem também advertir sobre a qualidade da genética ou saúde dos possíveis parceiros (Coblentz, 1976). Hamilton e Zuk (1982) propõem que fêmeas preferem acasalar com machos que apresentam um “display” sexual chamativo, o que sugere que são mais saudáveis e mais resistentes a parasitas. Kavaliers et al. (2003) demonstrou que fêmeas de camundongos são capazes de reconhecer, pelo odor da urina, a presença de parasitas em machos da mesma espécie, selecionando preferencialmente machos sem parasitas.

A presença de doenças tem efeito direto na fecundidade, fertilidade, no crescimento e na mortalidade dos peixes (Charnov, 2001). E isso poderia de alguma maneira, influenciar na escolha de parceiros através de pistas químicas. Assim, nesse estudo testamos se fêmeas de tilápia-do-Nilo conseguem perceber, através de pistas químicas, a presença de patógenos em machos. Segundo Penn (1998) as fêmeas que evitariam machos infectados,

reduziriam as chances de adquirir as doenças, o que alcançaria maior investimento parental e ainda elevaria a resistência da prole a parasitas.

A tilápia-do-Nilo é um bom modelo experimental para testar tal objetivo, pois possui hierarquia de dominância, na qual machos dominantes defendem território, constroem ninho, cortejam as fêmeas e apresentam maiores chances de acesso ao acasalamento pela fêmea (Gonçalves-de-Freitas e Nishida, 1998). A poliginia é o sistema de acasalamento predominante, por isso é esperado que a fêmea escolha características fenotípicas que indiquem a aptidão reprodutiva do macho.

Para testar tal paradigma de escolha de fêmeas em relação a machos saudáveis ou infectados, o patógeno utilizado foi a bactéria *Aeromonas hydrophila*, que é considerada um dos principais patógenos em peixes de água doce (Noga, 2000), causando perdas consideráveis em pisciculturas. Estão presentes naturalmente em ecossistemas aquáticos, tropicais e temperados, fazem parte da microbiota da água de rios e tanques, o que pode aumentar seu potencial patogênico quando as condições físicas e químicas do ambiente estiverem alteradas (Walters e Plumb, 1980; Camus et al., 1998).

Material e Métodos:

1. Condições Gerais:

Juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura, foram aclimatados em tanques de 500 L; 6 peixes/L antes dos procedimentos experimentais. A temperatura (28-30°C) e o fotoperíodo (12C:12E) se mantiveram constantes. Os tanques estavam providos com aeração contínua, com biofiltros e com tubos de PVC usados como tocas pelos animais. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia (ração comercial para peixes) com ração à vontade e o tanque foi sifonado diariamente para remoção de restos de alimento e fezes. Os níveis de nitrito e amônia eram mantidos abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente, para manutenção da qualidade da água.

2. Delineamento:

As fêmeas foram testadas individualmente em testes de escolha em relação a dois machos, sendo um macho infectado e um macho sadio. Para isso, cada uma das fêmeas recebeu água de dois aquários doadores, nos quais um macho sadio e um infectado por patógeno *Aeromonas hydrophila* para induzir uma infecção no peixe.

3. Procedimentos Específicos:

Isolamos 32 machos ($26,1 \pm 5,5$ g; $10,1 \pm 2,3$ cm) e 16 fêmeas ($26,5 \pm 4,7$ g; $9,7 \pm 1,6$ cm) em aquários individuais (40 x 20 x 25 cm). Após 24 h de aclimação foi injetado, intraperitonealmente, em metade dos machos, concentrações bacterianas vivas e, na outra metade, a solução salina, retornando-os, em seguida, em seus respectivos aquários. Passados 3 dias para a manifestação da infecção (Barbuio, 2013), as fêmeas foram submetidas ao teste de escolha. Os mesmos procedimentos foram feitos com 45 machos ($29,5 \pm 9,4$ g; $10,2 \pm 0,9$ cm), como forma de controle.

3.1. Teste de Escolha:

O teste de escolha foi realizado por meio de dois aquários doadores e um aquário receptor (delineado para a escolha da fêmea em relação aos estímulos químicos dos machos) (Figura 1), dos quais, os aquários doadores levam água para o aquário receptor. Os aquários doadores estavam dispostos acima do aquário teste e neles permaneceram os machos, sendo um sadio e o outro infectado. O sistema de transferência de água consistia em capilares de silicone de 2.5 mm de diâmetro, que partiam da lateral dos aquários doadores até a parte de baixo do aquário teste. Uma válvula foi acoplada em cada tubo, o que permitia o controle do fluxo em 6 ml/min. Um teste realizado com corante mostrou que a água demorava 10 min para chegar ao compartimento central do aquário receptor. Os testes de escolha ocorreram em 7 aquários de 60 x 60

x 30 cm, divididos verticalmente em três partes iguais por duas placas acrílicas opacas.

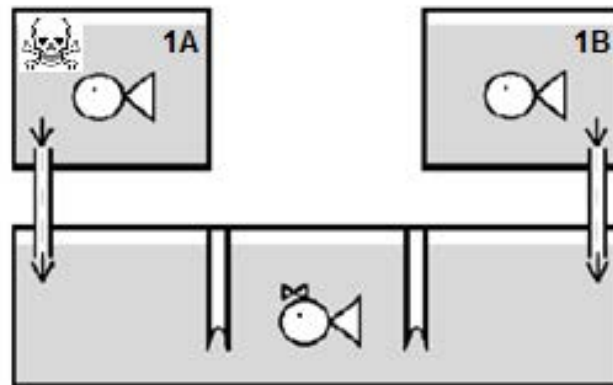


Figura 1: Teste de escolha (sistema de transferência de água). Caveira – macho infectado pelo patógeno *Aeromonas hydrophila*.

Em um primeiro momento, a fêmea se encontrava no compartimento central, o qual permaneceu fechado por 30 minutos. Após os primeiros 15 minutos, o sistema de transferência de água nos aquários doadores foi aberto e a água desses aquários era enviada para o aquário receptor pela gravidade. Passados os 10 minutos restantes, que são suficientes para que a água dos aquários doadores se espalhe pelos compartimentos laterais do aquário receptor, as placas de acrílico foram retiradas e o comportamento da fêmea foi filmado por 10 minutos, sendo que os primeiros 5 minutos foram descartados para evitar possíveis registros de alterações comportamentais referentes a presença dos experimentadores na sala.

Os testes foram filmados e a partir das filmagens foram analisadas três variáveis: (1) latência, tempo para o primeiro movimento após o início do fluxo de água, (2) número de compartimentos visitados primeiramente (3) tempo total gasto em cada compartimento. Aqueles que não responderem em até 300 segundos foram descartados das análises.

3.3. Preparo do Inóculo:

Utilizamos a bactéria *Aeromonas hydrophila*, cepa A114, isolada de Pintado (*Pseudoplatystoma* sp.). A cepa foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura TSA. Depois uma colônia da bactéria foi semeada no meio de cultura caldo BHI (BrainHeart Infusion) e incubada a 28° C por 18 horas. Após seu crescimento, a cultura foi diluída em série até a diluição 10^8 UFC/mL de acordo com a escala de Macfarland, e por fim foi semeada em TSA para contagem total de unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo para confirmação da concentração.

3.3. Inoculação do Patógeno:

Para a infecção com a bactéria, foi inoculada intraperitonealmente nos machos, 0,5 µL de uma concentração bacteriana de 10^8 UFC (unidades formadoras de colônias) diluída em solução salina estéril. Essa concentração é suficiente para que ocorra a infecção e aparecimento dos sinais clínicos (Oliveira et al., 2013). Como controle, na outra metade dos machos foi injetada solução salina pura (0.65%). Os animais submetidos a inoculação eram previamente anestesiados com uma solução de benzocaína a uma concentração de 80 mg/L.

4. Análise dos dados:

Para determinarmos o melhor teste estatístico para usarmos, realizamos o teste Shapiro–Wilk para testar a normalidade e Fmax para homocedasticidade. Os valores de latência apresentaram dados não normais, portanto o teste escolhido foi o teste de Mann-Whitney. Dados não normais foram encontrados no tempo de associação, dessa forma, aplicamos o teste de Mann-Whitney. Para o posicionamento das fêmeas nos primeiros 5 segundos, utilizamos o teste de proporção de Goodman. Sempre consideramos $\alpha=0,05$.

Resultados:

Os peixes infectados com *Aeromonas hydrophila* apresentaram perda de apetite e apatia como sinais clínicos, após 48 horas da inoculação. Já os peixes inoculados com solução salina não apresentaram sinais clínicos.

Dentre as 16 fêmeas, 81,25% (n=13) das fêmeas visitaram primeiramente o compartimento com odor de machos não infectados e, 18,75% (n=3) de infectados (figura 2). Além disso, houve diferença estatística na latência das fêmeas para visitar os compartimentos de odor de machos não infectados e infectados ($p=0,007$) (figura 3). Em média as fêmeas passaram 376,25 segundos no compartimento de machos infectados, ao passo que em média 279,25 segundos foram passados no compartimento com machos saudáveis ($p=0,085$) (figura 4).

Machos foram testados como controle. Dos 15 machos, 47%(n=7) visitaram primeiramente o compartimento com odor de machos saudáveis, enquanto 53% (n=8) estiveram primeiramente no compartimento de machos infectados (figura 5). Também não encontramos diferença significativa entre as latências (figura 6). A respeito do tempo de associação, em média os machos passaram 242,06 segundos no compartimento de machos saudáveis, ao passo que os outros permaneceram 196,81 segundos no compartimento com odor de machos infectados ($p=0,44$) (figura 7).

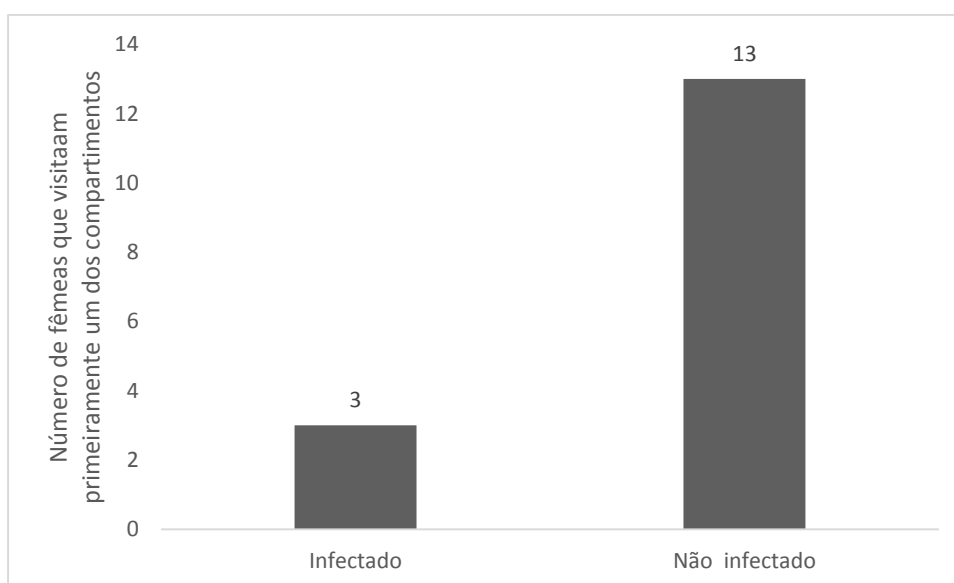


Figura 2: Primeiros compartimentos visitados: número de fêmeas que visitaram primeiro um dos compartimentos com odores de machos infectados e de não infectados.

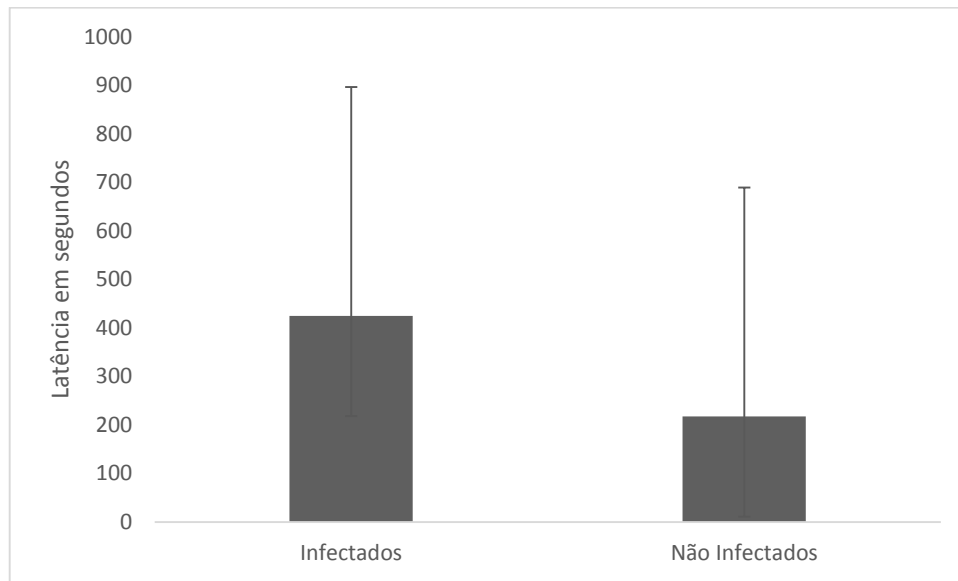


Figura 3: Latência: tempo (s) que a fêmea levou para visitar o primeiro compartimento.

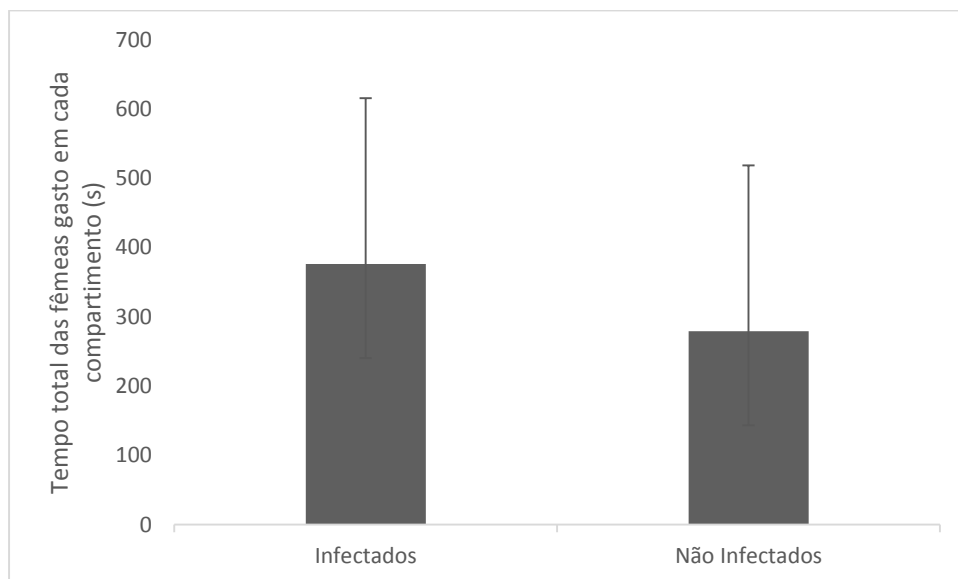


Figura 4: Média do tempo total das fêmeas. Não houve diferença significativa entre os tempos totais das fêmeas nos compartimentos com odor de machos infectados e não infectados.

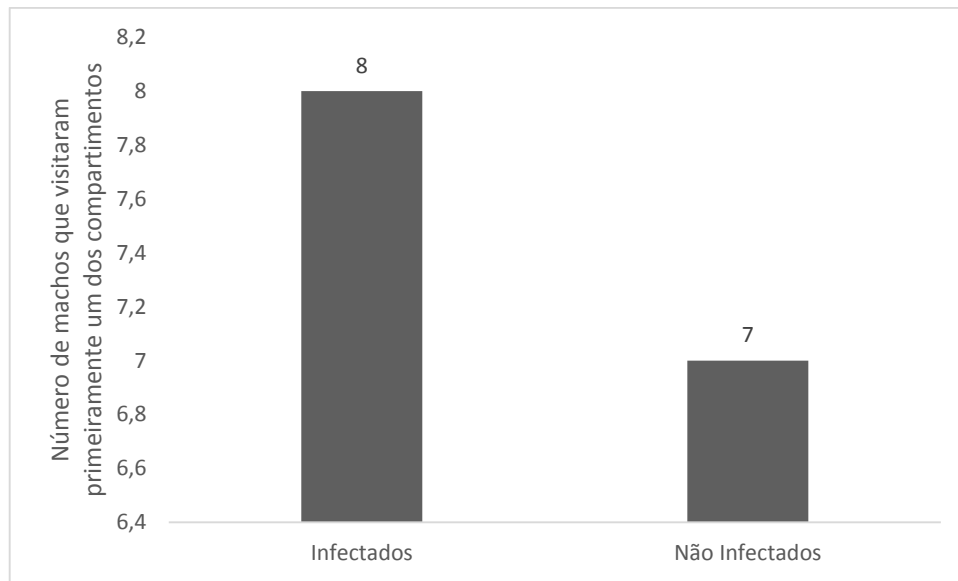


Figura 5: Primeiros compartimentos visitados: número de machos que visitaram primeiro um dos compartimentos com odores de machos infectados e de não infectados.

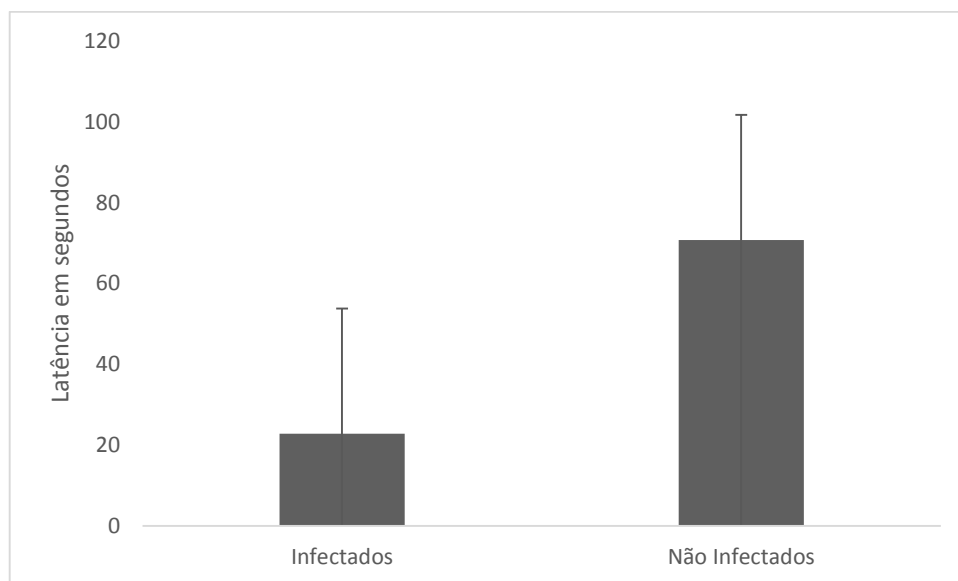


Figura 6: Latência: tempo (s) que o macho levou para visitar o primeiro compartimento.

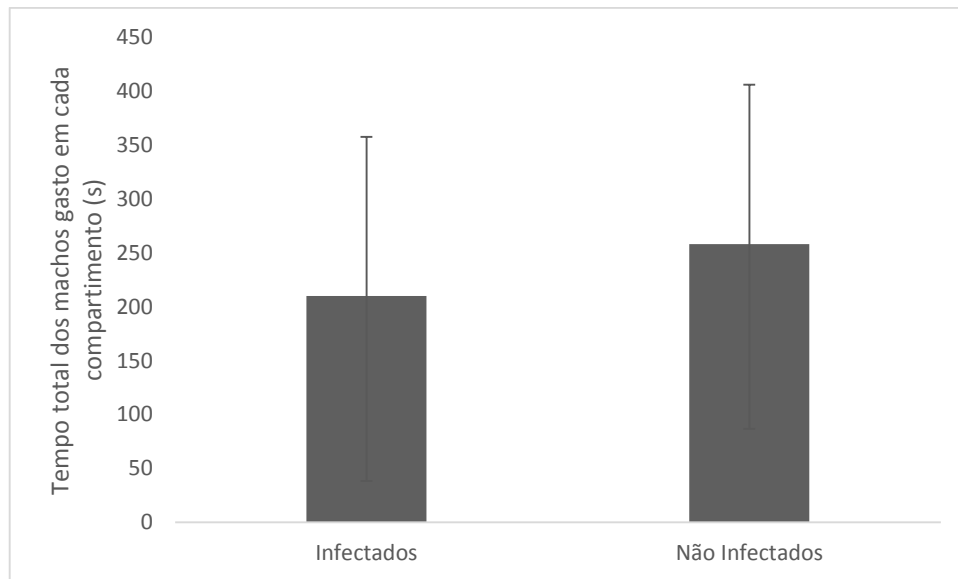


Figura 7: Média do tempo total dos machos. Não houve diferença significativa entre os tempos totais dos machos nos compartimentos com odor de machos infectados e não infectados.

Discussão:

Nossos resultados mostram que as fêmeas são inicialmente mais atraídas por machos saudáveis, porém esta escolha não se mantém constante, sugerindo que a pista química não foi suficiente para que a fêmea perceba evite o macho infectado. Um aspecto falho, que deixamos de levar em consideração é a maturidade sexual e receptibilidade das fêmeas. Em geral, as fêmeas atingem a maturidade sexual com aproximadamente 40g (Turra et al, 2010), enquanto que nesse experimento foram utilizadas fêmeas com uma média de 26g de massa. Um estudo com tartarugas de água doce mostrou que, fora da época de acasalamento, os machos e as fêmeas evitam a água que contém sinais químicos de membros da mesma espécie do sexo oposto (Munoz, 2004), o que poderia justificar a não diferença significativa dos nossos dados.

Em relação à escolha dos machos, testados aqui como controles, estes não demonstraram nenhum sinal de reconhecimento do coespecífico infectado. Como machos e fêmeas apresentaram diferenças na atratividade inicial, na qual fêmeas conseguiram evitar machos infectados e os machos não foram

capazes de evitar seus coespecíficos doentes, podemos inferir que essa é uma característica ligada ao sexo. Isso porque, as fêmeas quem escolhem, devido ao seu investimento parental maior (Trivers, 1974). Além disso, a sensibilidade das fêmeas na detecção olfatória tem sido estudada e se mostra superior à dos machos no caso de mamíferos (Brand e Millot, 2001).

As fêmeas analisadas visitaram os dois compartimentos, o que nos leva a acreditar que elas são capazes de perceber os odores de ambos os machos. Além disso, grande parte das fêmeas visitou primeiramente e com menor latência o compartimento com odor de machos saudáveis. Isso nos mostra que, de alguma forma, o odor pode ser alterado pela infecção, tornando os machos saudáveis mais atrativos inicialmente. O estudo de Kavaliers e Colwell (1995) com roedores, demonstrou que fêmeas passaram menos tempo analisando odores de camundongos machos infectados por patógeno do que não infectados. As aves escolhem preferencialmente aqueles parceiros livres de patógenos ou que sejam resistentes a eles (Hamilton e Zuk, 1982). E em um estudo com lagartos, mostrou que machos saudáveis provocaram mais movimentos da língua (um comportamento quimiossensorial) por fêmeas, sugerindo que estes odores eram mais atraentes, uma vez que, as secreções femorais poderiam fornecer informações fiáveis sobre a carga parasitária e o estado de saúde do macho (Martin et al., 2007).

A escolha em peixes, pode envolver múltiplas pistas, como a visual e a química (Candolin, 2003). Em grande parte dos peixes a comunicação visual possui grande importância na decisão de escolha (Castro, 2009) uma vez que, ao perceberem sinais visuais de infecção são capazes de evitar coespecíficos (Hamilton e Zuk, 1982). Como a tilápia-do-Nilo é uma espécie diurna, os sinais visuais devem predominar, possuindo maior importância na identificação de sinais clínicos. Além disso, um estudo com lagostas mostrou que os sinais químicos provenientes de coespecíficos mortos ou com sinais clínicos evidentes, afastavam os membros da mesma espécie, no entanto, não foi evidenciado o mesmo comportamento de maneira significativa quando os coespecíficos apresentavam infecção subclínica (Candia-Zulbaran et al, 2015). Isso sugere que os sintomas clínicos apresentados podem não ter sido

suficientes para a emissão de substâncias químicas a partir do patógeno para a evitação das fêmeas.

Conclusão:

Concluimos que as pistas químicas não são suficientes para que fêmeas evitem parceiros infectados por patógeno em tilápia-do-Nilo, apesar de inicialmente optar por machos saudáveis. No entanto, deixamos de levar em consideração a maturidade sexual e receptibilidade das fêmeas. Além disso, a comunicação visual pode ter papel complementar no processo de escolha, em relação aos sinais clínicos relacionados às doenças.

Referências

Agosta, W.C. (1992). Chemical Communication: The Language of Pheromones. **Scientific American Library**.

Asensio, N., Korstjens, A. H., Schaffner, C. M. e Aureli, F. (2008). Intragroup aggression, fission-fusion dynamics and feeding competition in spider monkeys. **Behaviour** 145, p.983–1001.

Barbosa, M. e Magurran A. E. (2006). Female mating decisions: maximizing fitness? **Journal of Fish Biology**, 68 p. 1636-1661.

Barbuio, R. Hematologia e Histopatologia de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) Vacinadas e Desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*. 2013. 46f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

Brand, G e Millot, J. L. (2001). Sex differences in human olfaction: Between evidence and enigma. **The Quarterly Journal of Experimental Psychology**, 54B (3), p. 259–270.

Camus, A.C., Durborow, R.M., Hemstreet, W.G., Thune, R.L., Hawke, J.P. (1998). Aeromonas bacterial infections – Motile aeromonas septicemia. **Southern Regional Aquaculture Center**, n.478, p.1-4.

Candia-Zulbaran, R. I., Briones-Fourzan, P., Lozano-Alvarez, E., Barradas-Ortiz, C., e Negrete-Soto, F. (2015). Caribbean spiny lobsters equally avoid dead and clinically PaV1-infected conspecifics. – **ICES Journal of Marine Science**, 72, p.164–i169.

Candolin, U. (2003). The use of multiple cues in mate choice. **Biological Reviews**, 78, p.575–595.

Castro, A. L. S., Gonçalves-de-Freitas, E., Volpato, G. L. e Oliveira, C. (2009). Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 42, p.368-374.

Charnov, E. L. (2001). Reproductive efficiencies in the evolution of life histories. **Evolutionary Ecology Research** 3, p.873–876.

Coblentz, B. E. (1976). Functions of scent-urination in ungulates with special reference to feral goats (*Capra hircus* L.). **American Naturalist**, 974, p.549–557.

Darwin, C. (1875). On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle of life. 6 edição, Chicago, **Encyclopaedia Britannica**, 1952 (Great Books of the Western World 49).

Fisher, H. S. e Rosenthal, G. G. (2006). Female swordtail fish use chemical cues to select well-fed mates. **Animal Behaviour**, 72, p. 721-725.

Giaquinto, P. C., Berbert, C. M. S., Delicio, H. C. (2010). Female preferences based on male nutritional chemical traits. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 64, p.1029-1035.

Gonçalves-de-freitas, E. e Nishida, S.M. (1998). Sneaking behaviour of the Nile tilapia. **Boletim Técnico do Cepta**, 11, p. 71-79.

Gonçalves-de-Freitas, E. Castro, A. L. S., Billalba, T. C. e Mendonça, F. Z. (2009). Sexual selection and social hierarchy in fishes. **Oecologia brasiliensis**, 13(1), p. 80-88.

Hamilton, W. D. e Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites. **Science**, 218, p.384-387.

Hamilton, W.D. e Zuk, M. (1988). Parasites and Sexual Selection - Reply. **Nature**, 341, p. 289-290.

Johansson, B. G. e Jones, T. M. (2007). The role of chemical communication in mate choice. **Biological Reviews**, 82, p. 265–289.

Karlson, P. e Luscher, M. (1959). Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, 183, p. 55–56.

Kavaliers, M. e Colwell, D. (1995). Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice. **Animal Behaviour**, 50, p.1161-1169.

Kavaliers, M., Colwell, D. D., Braun, W. J. e Choleris, E. (2003). Brief exposure to the odours of a parasitized male alters the subsequent mate odour responses of female mice. **Animal Behaviour** 65, p. 59–68.

Martin, J., Civantos, E., Amo, L. e López, P. (2007). Chemical ornaments of male lizards *Psammmodromus algirus* may reveal their parasite load and health state to females. **Behaviour Ecology Sociobiology**, 62, p.173–179.

Munoz, A. (2004). Chemo-orientation using conspecific chemical cues in the stripe-necked terrapin (*Mauremys leprosa*). **Journal of Chemical Ecology** 30, p. 519–530.

Noga, E.J. (2000). Diagnoses made by affected organs. In: - **Fish diseases: diagnosis and treatment**, Ames: Iowa State University, p.139-162.

Noonan, K. C. (1983). Female mate choice in the cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum*. **Animal Behaviour**, 31, p.1005–1010.

Oliveira, S. T. L., Veneroni-Gouveia, G., Santurio, J. M. e Costa, M. M. (2013). *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after their take of aflatoxins. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 80 p. 400-406.

Penn, D. & Potts, W. K. (1998). Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. **Tree**, vol. 13. p.391-396.

Rantala, M. J., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A., e Suhonen, J. (2002). Do pheromones reveal male immunocompetence? Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**, 269(1501), p. 1681–1685.

Solomon, D. J. (1977). A review of chemical communication in freshwater fish. **Journal of Fish Biology** 11, p. 363–376.

Stacey N. (2003). Hormones, pheromones and reproductive behavior. **Fish Physiology and Biochemistry**, 28 p. 229-235.

Trivers, R.L. (1974). Parent-offspring conflict. **American Zoologist**, 14, p.249-264.

Walters, G.R., Plumb, J.A. (1980). Enviromental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal Fish Biology**, 17, p.177-185.