

**“Prevención de enfermedades y mejoramiento genético del camarón
Litopenneaus vannamei”**

**“Disease prevention and genetic improvement of the white leg shrimp
Litopenneaus vannamei”**

Benoit Diringer¹⁻³, Gael Leclercq¹, Xavier Serrano¹, John Montano¹, Virna Cedeño¹, Emmerik Motte¹, Eric Mialhe¹ Carlos Mello²

Resumen

El principal problema del cultivo de camarón a nivel mundial lo constituyen las enfermedades infecciosas, de tipos virales o bacterianos intracelulares (rickettsias). Este problema se puede superar, a corto plazo, a través de la puesta en marcha de medidas de prevención de estas enfermedades basadas en la utilización exclusiva de larvas sanas provenientes de reproductores certificados. En paralelo, la actividad debe considerar el inicio de programa de mejoramiento genético de medio a largo plazo de *Litopenaeus vannamei* basado en criterios de crecimiento, fecundidad, resistencia a las enfermedades infecciosas y al estrés de hipoxia para potencializar su productividad y su sostenibilidad. El presente trabajo ilustra los conceptos desarrollados en los programas de prevención y mejoramiento genético que nuestro equipo ha puesto en marcha alrededor del mundo.

Palabras claves; Camarón, prevención de enfermedades, mejoramiento genético, resistencia, GAS, proteómica, transcriptómica,

Summary

Infectious diseases, in particular viral and intracellular bacterial ones (Rickettsias) represent the main constraint for Shrimp farming today. In the short term outbreaks can be avoided through disease prevention measures based on the use of disease free larvae and pathogen free certification of brooders. In parallel, the shrimp aquaculture sector ought to consider the implementation of middle and long term genetic improvement programs of *Litopenaeus vannamei* based on heritable characters such as growth, fecundity, infectious disease and hypoxia resistance in order to increase productivity and sustainability of shrimp farming exploitations. This paper presents the main lines of programs developed by our team worldwide.

¹ Concepto Azul S.A, Cdla. Vernaza Norte, MZ 10 Villa 34, Guayaqui – Ecuador, PO Box 0902-142A

² Concepto Azul S.A. Rua Lauro Linhares, nº 728 - office 303 - CEP-88006-001, Florianopolis/SC - BR

³ Inca’Biotec SAC, Calle 7 de Enero, 470, Tumbes, Tumbes, Peru. 00 51 972 701 484.

Key words; Shrimp, disease prevention, genetic improvement, GAS, resistance, transcriptomic, proteomic.

Introducción

El camarón es una de las principales especies cultivada en el panorama acuícola mundial, tanto por su importancia en volúmenes de producciones como por su valor comercial y social debido a la cantidad de empleos generados. Sin embargo, en todas las regiones del mundo, numerosas epizootias, en particular virales (WSSV, IHHNV, MBV, IMNV, YHV, TSV, BPV, HPV...) y rickettsiales (NHP bacterias intracelulares) afectan severamente las explotaciones. Estas enfermedades son transmitidas verticalmente de los reproductores a las post-larvas, lo que conduce a un cultivo de animales infectados y subsecuentemente a la propagación de los agentes patógenos y su permanencia en varias especies reservorios (zooplancton, jaibas).

Las pérdidas económicas y sus impactos sociales causadas por estos patógenos justifican la instauración de programa de prevención de enfermedades, y en paralelo a programas de mejoramiento genético con la obtención de camarones resistentes.

La prevención de virosis y rickettsiosis es bien conocida y se basa en análisis individuales de muestras de hemolinfa y heces, respectivamente [1, 2, 3]. Estos análisis realizados en los reproductores por técnicas como la nested-PCR (Polimerase Chain Reaction), RT nested PCR, real time PCR, o LAMP son extremadamente específicos y sensibles, y conlleven a una eliminación progresiva de algunos de estos patógenos.

Estas operaciones de prevención de corto plazo deben ser acompañadas de programas de mejoramiento genético. Esos programas deben considerar el establecimiento de familias y líneas puras basadas en una selección individual de reproductores en base a criterios de crecimiento y finalmente a los mejores reproductores en base a criterios de fecundidad al final del ciclo de producción.

Estos reproductores con fuerte crecimiento, exentos de agentes patógenos y altamente fecundos serán utilizados para producir lotes de larvas destinados a ser los reproductores de la generación siguiente. Estas larvas serán entonces sometidas a varios estrés de hipoxia a fin de seleccionar individuos que tengan una mejora capacidad de resistencia global (Figura 1).

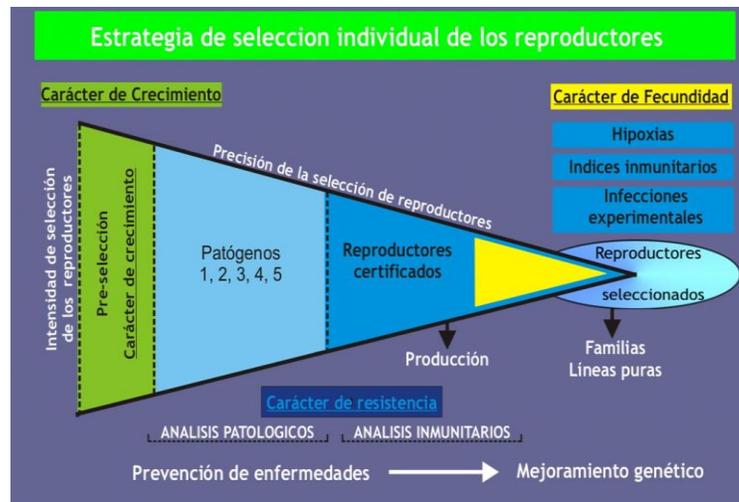


Figura 1; Esquematación de la estrategia de Concepto Azul para sus programas de prevención de enfermedades y mejoramiento genético.

El presente artículo propone explicar los conceptos desarrollados y aplicados por nuestro equipo en los diferentes programas de mejoramiento genético de camarón en los cuales participamos alrededor del mundo.

Conceptos

Los programas de mejora genética en los camarones, realizados por Concepto azul (CA) (Panamá, Brasil norte, Brazil Sur, Perú, Indonesia) se sostienen sobre una estrategia con varios componentes que pueden desarrollarse en paralelo. La figura 2 representa los diferentes componentes necesarios para el establecimiento de un programa de prevención y mejoramiento genético completo.



Figura 2; Esquematización de los componentes requeridos para los programas de prevención de enfermedades y mejoramiento genético diseñados por Concepto Azul.

1. La estrategia se basa en la selección individual directa de reproductores locales, adaptados a las condiciones y parámetros ambientales de la región. Ello permite una selección más fiable y más eficaz en términos de ganancia de mejora en cada generación. Los reproductores seleccionados en cada generación deben presentar una superioridad en términos de crecimiento, fecundidad y resistencia.
2. La selección para el crecimiento es simple de aplicar ya que el criterio de selección, que corresponde a un carácter cuantitativo típicamente multigénico, es fácil de establecer de manera reproducible y fiable a cada generación. El índice de crecimiento es expresado en gramos por semana. Es necesario sin embargo tener en cuenta que la variabilidad de la alimentación artificial y natural así como la variedad de la flora microbiana influyen mucho sobre el crecimiento [4]. El mejoramiento del crecimiento podría próximamente beneficiarse de marcadores moleculares que corresponden a los genes primordiales implicados en los procesos de multiplicación y crecimiento celulares. Ya se caracterizaron tales genes en insectos y se busca a sus homólogos en camarones [5]. Convendrá entonces aplicar, o técnicas de transcriptómica (real-time PCR) para cuantificar individualmente las tasas de transcripción de estos genes, o técnicas de proteómica (espectrometría de doble masa MALDI TOF/TOF) para cuantificar individualmente las tasas de traducción [6]. Se trataría entonces de selección asistida por genes (GAS: Gene Assisted Selection).
3. La selección para la fecundidad es fácil de aplicar ya que los criterios de selección, que corresponden a caracteres cuantitativos típicamente multigénicos, son fáciles de establecer de manera fiable. La tasa de fecundidad corresponde a un índice diferente para las hembras (numerosos huevos por desove y frecuencia de desove) y los machos (velocidad de regeneración de los espermatoforos y tasa promedio de fecundación). Cuando un microscopio confocal está disponible es tan posible cuantificar precisamente con fluorocromos las tasas de viabilidad de los gametos [7]. Cuando un espectrómetro de masa de tipo MALDI TOF/TOF está disponible es tan posible aplicar técnicas de proteómica y lipidómica para determinar la composición proteica y lipídica de los huevos y elegir a las mejores hembras [8].
4. La selección para la resistencia puede referir a parámetros fisicoquímicos (resistencia a la hipoxia, resistencia a la baja salinidad, etc). Las operaciones de selección son fáciles de aplicar para elegir animales supervivientes, siendo la presión de selección artificial en sala de bioensayos extremadamente fuerte y fácilmente reproducible a cada generación.
5. La selección para la resistencia puede también referir a agentes patógenos, los más dramáticos son los virus, en particular, WSSV (White Spot Syndrome Virus)

virus a genoma ADN) e IMNV (Infectious Myonecrosis Virus, virus a genoma ARN). Las operaciones de selección pueden llevarse según dos metodologías.

(1) Primera metodología de selección de camarones resistentes a virus corresponde a infecciones experimentales estandarizadas con suspensiones de virus tituladas en real-time PCR (virus ADN) o en real-time RT-PCR (virus ARN) para conocer la concentración en moléculas genómicas virales. En sala de bioensayos, somete a los animales a la fase larval a muy fuertes infecciones, que son idénticas a cada generación con el fin de poder establecer la heritabilidad de la resistencia. Se analiza a los individuos que sobreviven a las infecciones en el tercer mes post infección para seleccionar exclusivamente los que fueron capaces de eliminar completamente los virus. Estos camarones, infectados experimentalmente y libres de virus, son denominados SPR (Specific Pathogen Resistent). Esta metodología fue aplicada con éxito por Concepto Azul, por una parte para establecer familias y líneas puras resistentes al virus WSSV en Panamá con demostración de la resistencia frente a cepas de WSSV de China, por otra parte para establecer familias y líneas puras resistentes al virus IMNV. La resistencia aumenta mucho a partir de la tercera generación. La resistencia es transmisible a camarones no mejorados por fecundación con el esperma de camarones mejorados altamente resistentes.

(2) La segunda metodología de selección de camarones resistentes a virus corresponde a la selección asistida por genes (GAS: Gene Assisted Selection). Se trata en este caso de seleccionar a los camarones que tienen las tasas de transcripción (análisis en real-time RT-PCR) o traducción (análisis en espectrometría de doble masa) las más elevadas para los genes primordiales del sistema de defensa antiviral. Concepto Azul dispone de las herramientas de análisis para estos genes. Este esquema de mejoramiento genético, que está en curso de evaluación en Perú, presenta teóricamente dos ventajas principales: por una parte una fuerte heritabilidad de la superioridad de las tasas de transcripción y traducción, por otra parte la multi resistencia en la medida en que estos genes defensa son no específicos frente a virus a genoma ADN y ARN.

6. Los programas de Concepto Azul permiten establecer a familias según un esquema de selección masal (selección individual de los mejores reproductores pero producción colectiva de nauplii). La selección masal permite una mejora inmediatamente explotable pero que requiere de mantener indefinidamente la presión de selección. Este esquema es poco compatible con una mejora extrema debido al mantenimiento de una relativa fuerte diversidad genética en cada familia. Las familias pueden ser mejoradas para varios caracteres. Tales familias no pueden ser protegidas comercialmente sino por medio de marcadores genéticos específicos utilizados para la definición en los procesos de registro de la propiedad y permisos.
7. Los programas de Concepto Azul permiten establecer líneas puras por cruces consanguíneos entre individuos "excepcionales" para un carácter. Este esquema

de selección requiere mantener una presión de selección extrema durante algunas generaciones para estabilizar definitivamente el carácter. Estos animales mejorados están utilizables como híbridos entre líneas puras que presentan caracteres complementarios (resistencia extrema x crecimiento extremo). La protección de tales líneas puras puede hacerse, por una parte comercialmente como para las familias con ayuda de marcadores moleculares específicos y, por otra parte biológicamente por la comercialización exclusiva de híbridos.

Conclusión

La presencia, la propagación, y la aparición de enfermedades infecciosas han impactado severamente los cultivos de camarón en todos los continentes por el pasado y podrían afectar la sostenibilidad de esta actividad.

Para ello, es indispensable la puesta en marcha de programas de prevención de enfermedades locales basados en herramientas moleculares para eliminar la transmisión vertical de estos patógenos. La prevención debe ser apoyada por programas de mejoramiento genético que permiten incrementar los rendimientos mejorando las tasas de crecimiento y de fecundidad por selecciones fenotípicas, aumentar la resistencia a parámetros fisicoquímicos y obtener líneas de camarones resistentes a enfermedades.

El incremento progresivo de la resistencia puede lograrse a través de; (1) infecciones experimentales aplicando una presión de selección fuerte y repetida a cada generación para mantener los caracteres y establecer una fuerte heritabilidad. (2) Vía la selección asistida por genes (GAS) primordiales del sistema de defensa lo que permitiría obtener animales multi resistentes en la medida en que estos genes de defensa son no específicos frente a virus de genoma ADN y ARN. La selección por GAS se realiza mediante técnicas moleculares de última generación que vienen siendo evaluadas en el caso de la transcriptómica (real-time PCR) para cuantificar individualmente las tasas de transcripción de estos genes, o que están en desarrollo en el caso de la proteómica (espectrometría de doble masa MALDI TOF/TOF) para cuantificar individualmente las tasas de traducción.

Referencias

Brogiolo W., Stocker H., Ikeya T. Rintelen F., Fernandez R., Hafen E., 2001. **An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control.** Current Biology, Volume 11, Issue 4, 213-221.

Falkner JA, Kachman M, Veine DM, Walker A, Strahler JR, Andrews PC., 2007. **Validated MALDI-TOF/TOF mass spectra for protein standards.** J Am Soc Mass Spectrom. (5):850-5.

Garcia CF, Cunningham M, Soulages JL, Garda HA, Pollero R., 2006. **Structural characterization of the lipovitellin from the shrimp *Macrobrachium borellii***. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*;145(3-4):365-70.

Hsu, H.-C., Lo, C.-F., Lin, S.-C., 1999. **Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders**. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39 ; pp13-19.

Larabell C.A., 2000., **Confocal Microscopy of Live *Xenopus* Oocytes, Eggs, and Embryos**. *Methods in Molecular Biology*, Volume 135, IV, 175-182.

Leclercq G., Mialhe E., Zambrano D., Escobar A., Cedeno V., Motte E., Boulo V., Chamorro R., Martinez G., Visuetti J., Arevalo M., Camargo R., Correa E., Moreno E., 2004a. **Analytical epidemiology and prevention of NHP (necrotizing hepatopancreatitis) in intensive and extensive shrimp farms in Panama, Peru and Ecuador**. WAS, Honolulu, Hawaii, USA.

Motte E., Yugcha E., Luzardo J., Castro F., Leclercq G., Rodríguez J., Miranda., Borja O., Serrano J., Terreros M., Montalvo K., Narvaez A., Tenorio N., Cedeno V., Mialhe E., Boulo V., 2003. **Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei***. *Aquaculture*, 191(1-4) ; pp57-70.

Motte E., Serpin S., Schires G., Pinto P., Mauri Y., Santana M., Valdez M., Medina J., Vera T., Cayra E., Diringier B., Cornejo S., Mialhe E., 2009. **Domestication of gut microbiota for shrimp and fish aquaculture improvement**. World Aquaculture Society (WAS).