

# Verificación de la correlación genética negativa entre crecimiento y resistencia al virus de la mancha blanca (wssv)

Erazo E.C., Lozano, C., Salazar, M., Gitterle, T.

Programa de mejoramiento genético del camarón Blanco *P. vannamei*  
CENIACUA

## 1. INTRODUCCION

En el año de 1997 el Centro de Investigación de la Acuicultura de Colombia “CENIACUA” con la colaboración del Instituto de investigación en Acuicultura de Noruega “AKVAFORSK”, el gobierno colombiano y el gremio camaronicultor representado por ACUANAL, dan inicio al programa de selección y mejoramiento genético del camarón *P. vannamei*.

Los objetivos de este programa son el incremento en el crecimiento, la sobrevivencia en finca y la resistencia a enfermedades del camarón cultivado en Colombia por medio de metodologías de selección familiar e individual.

El trabajo realizado hasta el momento ha generado logros valiosos en áreas como el mejoramiento genético, la salud animal y el manejo de cultivos entre otros, los cuales se han difundido en el sector productivo y la comunidad científica en general.

### 1.1. Programa de Mejoramiento Genético del camarón blanco *Penaeus vannamei*

#### 1.1.1 Núcleo genético

El Programa de Mejoramiento Genético del camarón blanco *Penaeus vannamei*, combina metodologías de selección familiar e individual, por medio de la producción y mantenimiento de un núcleo genético, el cual se compone de lotes y estos a su vez de familias de hermanos enteros y hermanos medios. Las operaciones necesarias para producir y mantener los núcleos de reproductores seleccionados se realizan en las instalaciones de CENIACUA en el Corregimiento de Punta Canoas, 11 Km al norte de la Ciudad de Cartagena (Bolívar).

La producción y evaluación de los lotes cumple con varias etapas, las cuales se mencionan a continuación: a. Cruzamiento de reproductores con los mayores valores de cría (Breeding Values BV) y producción de familias. b. Larvicultura de las familias en tanques individuales. c. Crecimiento de las familias en tanques individuales hasta 1 g de peso. d. Marcación de las familias con elastómeros (códigos de color). e. Evaluación de crecimiento y sobrevivencia en fincas. f. Infecciones experimentales y cálculos de resistencia familiar. g. Calculo de valores de cría por merito individual y familiar. h. Cría de reproductores e ingreso a maduración. i. Selección de los reproductores que conformaran el siguiente lote.

Desde 1999 la expansión del WSSV ha generado grandes pérdidas económicas al sector camaronicultor del pacífico colombiano. Con el fin de afrontar esta problemática, CENIACUA incluyo en su programa de mejoramiento genético, la resistencia a WSSV como nuevo criterio de selección. Desde el inicio del programa hasta la fecha se han producido 17 lotes, de los cuales 16 se han evaluado para crecimiento y sobrevivencia en finca, 13 para resistencia al WSSV y 2 para resistencia al virus del Taura (TSV).

Además de pie de cría seleccionado, el programa de mejoramiento genético ha aportado extenso conocimiento acerca del WSSV y de su relación con las otras características de selección. Parte de este conocimiento surgió de la evolución de las pruebas de desafío diseñadas para determinar la resistencia al virus de cada familia y lote evaluado.

#### 1.1.2. Evolución pruebas de desafío al WSSV

##### Infección oral (papilla) Lote 3-7

La infección experimental con el virus del WSSV de los lotes 3 al 7 se realizo de forma oral (per os) con papilla. La metodología consistió en dar músculo de camarones contaminados con el virus a representantes de cada familia, durante varios días. Esta forma de infección produjo correlaciones genéticas negativas entre el peso de cosecha de las familias evaluadas y su resistencia al WSSV (Gitterle et al., 2005). Es decir, las familias con mayor sobrevivencia en la infección eran también las que mostraban menor crecimiento en las fincas (tabla 1).

Al observar esta tendencia sostenida, surgió la hipótesis que al infectar con músculo contaminado existiera un efecto confundido entre la correlación de las dos características (resistencia al WSSV y crecimiento en finca) y el comportamiento de los animales; es decir que si durante la infección los individuos de mayor tamaño compitieran por la papilla, comieran primero y mayor cantidad de tejido infectado que los animales pequeños, los animales grandes se enfermarían y morirían mas rápido y en mayor cantidad.

Con el fin de controlar la variable “competencia”, en los lotes siguientes (Lote 8-10) se infectó per os, por medio de una

sonda oral, suministrando a cada individuo una dosis conocida del virus en la boca (figura 1). Los resultados de esta técnica fueron variables obteniendo correlaciones negativas significativas de las dos características en los lotes 9 y 10, y una correlación negativa no significativa en el lote 8. (Tabla 1)

Tabla 1. Correlaciones fenotípicas y genéticas entre WSSV y crecimiento en los lotes 3 al 10 del programa de mejoramiento genético de camarón *P. vannamei*.

Lote	Correlación Fenotípica (WSSV-Crec)	Correlación Genética (WSSV-Crec)
3	-0.50*	-0.94* <sup>a</sup>
4	-0.32*	-0.51* <sup>a</sup>
5	-0.28*	-0.16 <sup>a</sup>
6	-0.52*	-0.31 <sup>a</sup>
7	-0.31*	-0.47* <sup>a</sup>
8	0.01	0.06 <sup>b</sup>
9	-0.05	0.27* <sup>b</sup>
10	-0.15	0.33* <sup>b</sup>

\*Correlación con valor  $P < 0.05$

a = Correlación genética calculada usando los componentes genéticos aditivos de la covarianza entre la resistencia a WSSV y el peso de cosecha.

b = Correlación genética entre valores de cría de resistencia a WSSV y peso de cosecha (resistencia expresada como riesgo de muerte, por lo tanto estos valores de correlación positivos, denotan una relación inversa entre la resistencia y el peso).

Con el fin de verificar si la correlación genética negativa entre crecimiento y resistencia al WSSV es verdadera se desarrolló un experimento en el cual se evaluó el crecimiento y la resistencia a WSSV de progenies de cuatro grupos de animales genéticamente diferentes (altos valores de cría de peso de cosecha, bajos valores de cría de peso de cosecha, altos valores de cría de WSSV y bajos valores de cría de WSSV). En este sentido, si la verdadera correlación negativa entre estas dos características es desfavorable, las progenies de los animales con buenos valores de cría de crecimiento deberían sobrevivir menos a la infección con WSSV que las progenies de los animales con valores de cría bajos para crecimiento. Del mismo modo las progenies de los animales con altos valores de cría para WSSV deberían crecer menos que las progenies de los animales con bajos valores de cría para WSSV.

## 2. OBJETIVOS

- 2.1. Verificar la relación genética entre crecimiento y resistencia al virus de la mancha blanca en animales seleccionados con valores de cría para estas características.
- 2.2. Evaluar el crecimiento de las progenies de animales seleccionados para alto y bajo crecimiento en condiciones comerciales y experimentales.
- 2.3. Evaluar la resistencia al WSSV de las progenies de animales con valores de cría altos y bajos para esta característica.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Conformación de los grupos de comparación

Los animales con alto y bajo potencial genético para crecimiento y resistencia al WSSV se escogieron teniendo en cuenta sus valores de cría para cada una de estas características. Los valores de cría son calculados a partir del desempeño de los individuos y sus familiares (hermanos enteros y medios) corrigiendo por efectos ambientales tales como las condiciones de engorde, la época del año y el sexo y representan la superioridad estimada de sus progenies para cada una de las características evaluadas. Los valores de cría pueden combinarse y expresarse como un solo valor por medio de un índice que permite estandarizar el desempeño de cada individuo en una población, teniendo como promedio 100 y desviación estándar de 10.

Las progenies de los diferentes grupos se produjeron mediante inseminación artificial, escogiendo los reproductores bajo

los siguientes parámetros:

Grupo de buenos valores de cría para WSSV (BW): Este grupo se produjo a partir de 10 cruzamientos realizados con reproductores con valores de cría para WSSV de una desviación estándar por encima del promedio de la población. (rango entre 1 y 2.5 desviaciones estándar).

Grupo de malos valores de cría para WSSV (MW): Este grupo se produjo a partir de 10 cruzamientos realizados con reproductores con valores de cría para WSSV por debajo del promedio de la población. (rango entre -2.4 y 0 desviaciones estándar).

Grupo de buenos valores de cría para crecimiento (BC): Este grupo se produjo a partir de 10 cruzamientos realizados con reproductores con valores de cría para peso de cosecha de una desviación estándar por encima del promedio de la población. (rango entre 1 y 2.1 desviaciones estándar).

Grupo de bajos valores de cría para crecimiento (MC): Este grupo se produjo a partir de cinco cruzamientos realizados con reproductores con valores de cría para peso de cosecha por debajo del promedio de la población. (rango entre -0.9 y -0.2 desviaciones estándar).

La larvicultura de cada cruzamiento se hizo por separado. Cuando alcanzaron el estadio de PL15, las Postlarvas de los cruzamientos de cada grupo fueron trasladadas a tanques de 1300 L de capacidad y mezcladas, para asegurar igual representación de cada cruzamiento dentro de los grupos.

Los animales se alimentaron en comederos (2 por tanque) cada cuatro horas (seis raciones por día). Los animales fueron alimentados con dieta comercial.

Tabla 2. Descripción de los pesos de marcación y códigos de color de los grupos comparados en el experimento.

<b>Grupo</b>	<b>Peso de marcación (g)</b>	<b>COLOR CODIGO</b>	<b># animales marcados</b>
BW	2.4	AFA	370
MW	2.4	FVF	325
BC	2.6	NAN	370
MC	2.5	RAR	370

Después de alcanzar el peso mínimo de marcación (1 g), los animales se marcaron diferencialmente con elastómeros fluorescentes en el sexto segmento abdominal. La sobrevivencia desde PL15 hasta este punto fue del 87% (tabla 2).

### 3.2. Evaluación de Crecimiento

Para comprobar que los grupos de altos y bajos valores de cría para crecimiento presentaban diferencias en su peso de cosecha, el crecimiento de los grupos fue evaluado bajo condiciones comerciales y en un experimento controlado.

### 3.3. Comparación del crecimiento Comercial

Con el propósito de evaluar el crecimiento de los grupos en condiciones comerciales de cultivo se enviaron 50 animales de cada grupo a dos fincas de la costa atlántica y a un tanque de 50 toneladas en el sistema de Núcleos Genéticos de Punta Canoa. Los animales de los grupos se sembraron junto con animales de uno de los lotes de familias del programa de selección genética y permanecieron juntos por un tiempo aproximado de 100 días.

### 3.4. Comparación del crecimiento experimental

Cuatro tanques de 1300 L fueron sembrados con 15 animales de cada grupo para un total de 60 animales por tanque y por grupo (33.5 animales/m<sup>2</sup>). Estos se mantuvieron allí durante 60 días.

### 3.5. Prueba de desafío al WSSV

Una vez evaluado el crecimiento de los grupos sembrados en los cuatro tanques de 1300L, los animales sobrevivientes de los cuatro grupos fueron enviados a las instalaciones de CENIACUA localizadas en la Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas (UDCA) en la Ciudad de Bogotá, con el fin de infectarlos experimentalmente con el virus de la mancha blanca (WSSV).

En la UDCA, los animales se sembraron en dos tanques de 4000L en donde fueron aclimatados para salinidad y

temperatura durante una hora. Diez días después de su llegada, se realizó la infección experimental per os, con una sonda oral, administrando 10 microlitros de inoculo viral ( $1 \times 10^4$  partículas virales por mL) a cada uno de los camarones del experimento



(figura 1, tabla 3).

Tanque	Grupos			
	BC	MC	BW	MW
1	33	30	20	25
2	17	26	33	29
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>56</b>	<b>53</b>	<b>54</b>

Tabla 3. Número de animales infectados por grupo y tanque

Después de la infección, la mortalidad de los animales se registró hora a hora durante todo el periodo del experimento.

### 3.6. Análisis estadístico

El análisis del crecimiento de los grupos, como peso de cosecha, se realizó mediante un modelo lineal general utilizando el paquete estadístico SAS® en donde la variable de respuesta fue el peso individual de cada animal, y los efectos fijos fueron: tanque, sexo, y grupo, utilizando peso de siembra como co-variable.

El análisis de los resultados de sobrevivencia a la infección con WSSV se realizó mediante un modelo lineal general utilizando como variable de respuesta una variable binaria (1,0; vivo o muerto), y como efectos fijos: tanque y grupo.

Del mismo modo se compararon curvas de sobrevivencia por medio de la prueba de Wilcoxon y log-rang utilizando el procedimiento de surviving analysis en SAS®

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Comparación de crecimiento de los grupos en fincas

La sobrevivencia de las piscinas en las fincas 1 y 2 y del tanque de 50 Tn en Punta Canoa fue del 10, 31 y 64% respectivamente. La alta mortalidad ocurrida en la finca 1 fue causada por un ataque de espiroplasma el cual afectó fuertemente esta finca, por esta razón, la finca 1 fue excluida del análisis. En la tabla 4 se presenta el número de animales cosechados por grupo y finca, el peso promedio y la sobrevivencia.

Al aplicar el modelo lineal general no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre el peso promedio de los cuatro grupos comparados. Se encontraron diferencias significativas entre fincas y entre sexos siendo las hembras en promedio un gramo más pesadas que los machos. Las medias marginales de peso de cada grupo corregidas para finca y sexo al igual que sus valores de cría para peso se presentan en la tabla 5.

Finca	Grupo	N	S (%)	PP (g)
1	BC	2	4	24,50
	BW	7	14	24,57
	MC	1	2	24,00
	MW	4	8	23,50
2	BC	13	26	15,35
	BW	8	16	13,63
	MW	14	28	15,61
	MC	14	28	15,11
Punta Canoa	BC	26	52	24,04
	BW	27	54	23,98
	MC	35	70	22,47
	MW	37	74	23,22

Tabla 4. Numero de animales analizados (N), sobrevivencia (S) y peso promedio (PP) de cada grupo en cada finca y en el tanque de Punta Canoa

Grupo	LSM (g)	VCC
BC	19.8 a	1.6
BW	19.3 a	0.5
MC	18.6 a	-0.45
MW	19.3 a	1.2

Tabla 5. Medias marginales (LSM) y valores de cría para peso expresados en desviaciones estándar (VCC) de los cuatro grupos estimadas por el GLM. Diferentes letras denotan diferencias significativas.

El número de observaciones por grupo y finca pudo ser demasiado bajo comparado con los efectos fijos incluidos dentro del modelo, aumentando la varianza del error. Por lo tanto, con el fin de aumentar el número de observaciones se agruparon los animales teniendo en cuenta solo su valor de cría para peso de sus progenitores. En este sentido se conformaron dos grupos. De altos y bajos valores de cría para peso (avc y bvc).

Se encontraron diferencias significativas entre los dos nuevos grupos (P)

De esta forma se puede deducir que los animales producidos con reproductores con valores de cría para peso por encima del promedio de la población crecen mejor bajo condiciones comerciales que los animales provenientes de reproductores con bajos valores de cría.

#### 4.2. Comparación del crecimiento de los grupos bajo condiciones experimentales.

La sobrevivencia de los animales en los tanques experimentales fue muy superior a la obtenida bajo condiciones comerciales (tabla 6). Del mismo modo las diferencias entre grupos se pudieron expresar de mejor forma en este sistema también.

Grupo	Sobrevivencia (%)			
	Tanque 49	Tanque 50	Tanque 51	Tanque 52
BC	87	100	93	87
MC	93	100	93	100
BW	100	93	87	93
MW	100	87	80	87

Tabla 6. Sobrevivencia de los grupos en los tanques experimentales

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Las medias marginales de cada grupo corregidas para sexo y tanque al igual que los valores de cría para crecimiento se presentan en la tabla 7.

Se observa como los grupos con los mayores valores de cría para crecimiento (BC y MW) obtuvieron los pesos promedios más altos y los grupos con los valores de cría mas bajos (MC y BW) obtuvieron los pesos promedios menores.

Grupo	LSM (g)	VCC
BC	22.8 (a)	1.6
MC	21.7 (b)	-0.45
BW	21.4 (b)	0.5
MW	22.1 (ab)	1.2

Tabla 7. Medias marginales (LSM) y valores de cría para peso expresados en desviaciones estándar (VCC) de los cuatro grupos estimadas por el GLM en los tanques experimentales. Diferentes letras denotan diferencias significativas

Se destaca el resultado obtenido por el grupo BW (buenos para WSSV) el cual a pesar de contar con un valor de cría por encima del promedio de la población, obtuvo el peso promedio mas bajo.

Al igual que en el análisis realizado con los datos de las fincas y con el fin de aumentar el numero de observaciones los animales se dividieron en dos grupos teniendo en cuenta solo valores de cría para crecimiento de sus progenitores. Altos y bajos valores de cría para crecimiento (avc y bvc, respectivamente).

Se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre estos dos grupos (tabla 8) obteniendo el grupo de altos valores de cría un mayor peso promedio que los de bajos valores de cría.

Grupo	LSM (g)	N	VCC
Avc	22.4 a	112	1.6
Bvc	21.6 b	115	0.2

Tabla 8. Medias marginales (LSM), Numero de animales analizados (N) y valores de cría para peso expresados en desviaciones estándar (VCC) de los dos grupos en los tanques experimentales. Diferentes letras denotan diferencias significativas

De los resultados obtenidos comercial y experimentalmente se puede deducir que los animales provenientes de reproductores con valores de cría altos para crecimiento crecen mejor que los animales producidos por reproductores con bajos valores de cría.

#### 4.3 Prueba de desafío al WSSV

Los animales del tanque 1 comenzaron a morir en al día 4 post infección obteniendo la máxima mortalidad al día 8. Por otra parte en el tanque 2 después de 12 días de la infección solo 5 animales habían muerto. Por esta razón se decidió en el día 13 pos-infección, reinfectar los animales suministrando músculo infectado de uno de los animales muertos. En el día 14 las mortalidades en el tanque dos se reiniciaron ocurriendo la mayor mortalidad en el día 18 post infección con inóculo (día 6 post infección con músculo) (figura 2)

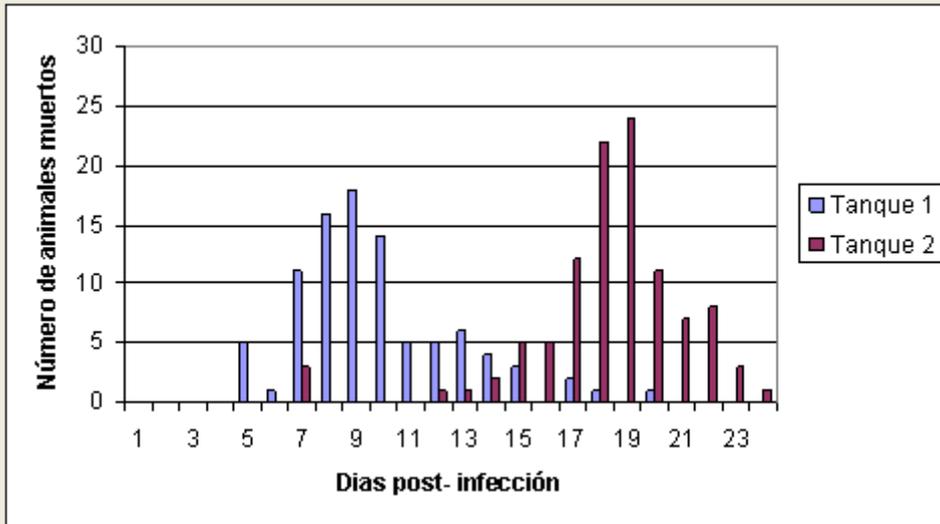


Figura 2. Mortalidad diaria en los tanques 1 y 2.

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las curvas de supervivencia de los dos tanques (figura 3). En el tanque 2 la tasa de mortalidad fue mayor, después de la infección con músculo infectado.

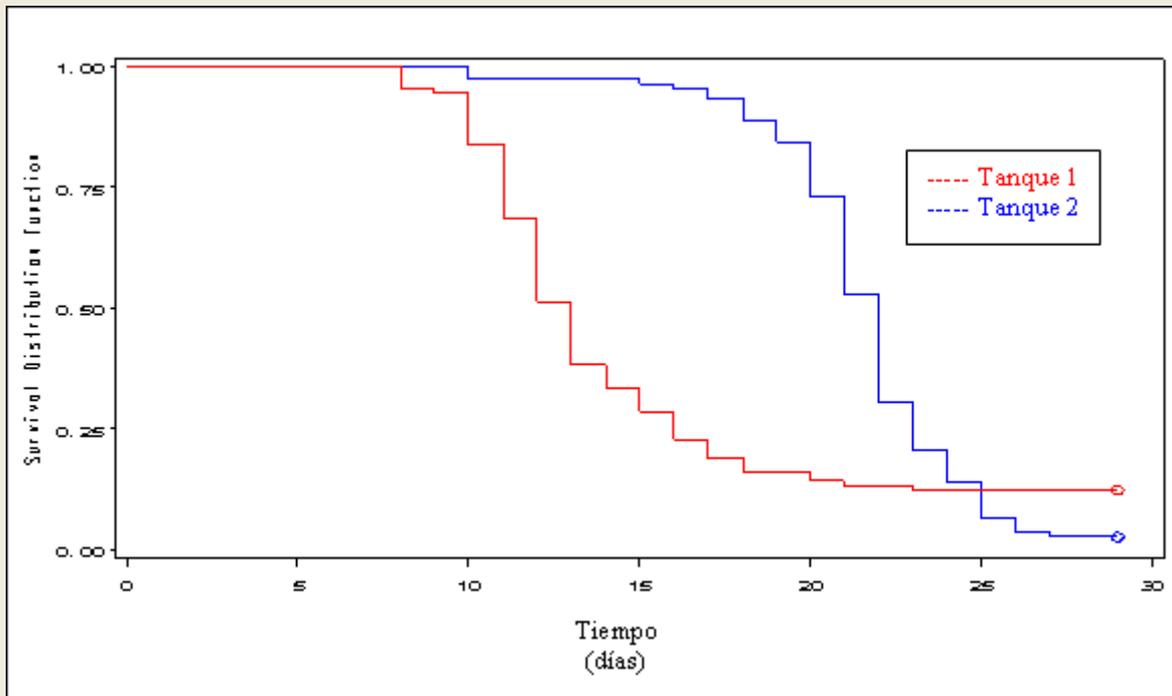


Figura 3. Función de distribución de supervivencia en los tanques 1 y 2.

Las estimaciones de los valores de cría para resistencia a WSSV se han realizado utilizando la información de la supervivencia de cada familia cuando toda la población obtiene el 50% de mortalidad. De esta forma se asegura la máxima varianza entre familias. Al 50% de mortalidad el efecto de tanque no fue significativo ( $P > 0.05$ ), mientras que se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $P$

Se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre el grupo bueno para crecimiento (BC) y el grupo bueno para WSSV (BW). Cabe resaltar que estos dos grupos obtuvieron los pesos mas altos y mas bajos respectivamente en la comparación de crecimiento (tabla 9).

Grupo	LSMS (%)	LSMP (g)	VCC
BC	39 (a)	22.8 (a)	1.6
MC	52 (ab)	21.7 (b)	-0.45
BW	66 (b)	21.4 (b)	0.5
MWI	43(a)	22.1 (ab)	1.2

Tabla 9. Medias marginales de sobrevivencia (LSMS) y peso (LSMP) y valores de cría para peso expresados en desviaciones estándar (VCC) de los cuatro grupos. Diferentes letras denotan diferencias significativas

Al igual que en los análisis de crecimiento con el fin de aumentar el número de observaciones para la comparación entre grupos de buen y malos crecimiento se crearon dos grupos teniendo en cuenta solo los valores de cría para crecimiento: avc (alto valor de cría crecimiento) y bvc (bajo valor de cría crecimiento). En el resultado del modelo lineal general se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre la sobrevivencia de estos dos grupos a 50% mortalidad de la población (tabla 10). El grupo de avc obtuvo una menor sobrevivencia que el grupo bvc (tabla 10).

Grupo	LSMS (%)	LSM (g)	VCC
avc	41 a	22.4 a	1.6
bvc	59 b	21.6 b	0.2

Tabla 10. Medias marginales de sobrevivencia (LSMS) y peso (LSMP) y valores de cría para peso expresados en desviaciones estándar (VCC) de los cuatro grupos. Diferentes letras denotan diferencias significativas

## 5. CONCLUSION

De los resultados obtenidos en este estudio se puede deducir que la correlación genética negativa entre crecimiento y resistencia al WSSV estimada en la mayoría de lotes de familias analizadas es verdadera, y no obedece a un efecto confundido por la forma de infección. Debido a esta correlación negativa se debe evaluar muy bien las estrategias de selección para incrementar simultáneamente las dos características. La selección unidireccional de una sola de estas dos características conlleva a reducción de la otra. Es decir al seleccionar solo para peso sin tener en cuenta la resistencia al WSSV puede volver más susceptibles las poblaciones a esta enfermedad. Una buena opción es la selección familiar. No obstante, para maximizar la respuesta en ambas características es recomendable tener líneas específicas para crecimiento y resistencia al WSSV asignando valores económicos diferentes en cada línea. De esta forma se obtienen mayores respuestas de una característica en cada línea pero sin perjuicio de la otra

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Bourdon, R. 1997. Understanding animal breeding. Ed. Prentice Hall.
- Gitterle T., Salte R., Gjerde B., Cock J., Johansen H., Salazar M., Lozano C. and Rye M. 2005. Genetic (co)variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Aquaculture 246. 139-149.
- Gitterle T., Gjerde B., Cock J., Salazar M., Rye, M., Vidal, O., Lozano C., Erazo C., and Salte R. 2006 Optimization of experimental infection protocols for the estimation of genetic parameters of resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Aquaculture in press.