Contribuciones del CENAIM durante el VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura

SUPERVIVENCIA DIFERENCIAL DE FAMILIAS DE *LITOPENAEUS VANNAMEI* DESAFIADAS CON EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA

Franklin Pérez[1,2,], Luis Gómez[2], Víctor Otero[2], Filip Volckaert[3] y Jorge Calderón[1]*
[1] Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM
[2] PROMOGEN Cía. Ltda.
[3] Catholic University of Leuven, Belgium

Introducción

Entre los múltiples problemas virales reportados en camarón, el Virus de la Mancha Blanca (WSV por sus siglas en inglés) es el más extendido y devastador (Wang *et al.*, 1999; Tapay *et al.*, 1999). Esta enfermedad empezó a producir mortalidades en Asia en 1992, fue reportado en EEUU en 1995 y se detectó en Centro y Suramérica en 1999.

Los animales afectados por el Virus se vuelven letárgicos, paran de alimentarse y nadan erráticamente alrededor de los bordes de la piscina en donde mueren. En muchos casos no se observan manchas blancas que es el síntoma típico en las especies cultivadas en Asia. Mortalidades masivas se observan generalmente entre 30 y 40 días luego de la siembra.

El impacto de la Mancha Blanca llamó la atención de los productores ecuatorianos hacia la necesidad de programas de mejoramiento dirigidos a la producción de animales resistentes o tolerantes. Sin embargo, no existe información relacionada con el comportamiento de la enfermedad bajo condiciones controladas o la efectividad de pruebas de desafío a nivel local.

La selección familiar es usada cuando el caracter bajo mejoramiento no puede ser medida directamente en el individuo a seleccionar o cuando la heredabilidad es baja. En el caso de la resistencia al Síndrome de Taura (TSV por sus siglas en inglés) la heredabilidad es baja, menor al 0.1 (Argue *et al.* 1999). Si la tendencia es similar con el WSSV, la selección familiar es el único esquema utilizable para obtener animales resistentes. En este tipo de programas mientras más pronto se pueda dar la selección de familias resistentes o tolerantes, más pronto se pueden eliminar familias sin valor genético.

El presente trabajo presenta los resultados obtenidos en el desarrollo de pruebas de desafío para Mancha Blanca en estadios tempranos. Estos protocolos fueron adaptados además para evaluar un grupo de 25 familias provenientes de padres sobrevivientes a fuertes eventos de Mancha Blanca en piscinas comerciales con el fin de determinar la existencia de variabilidad en resistencia a WSSV. Estos experimentos fueron llevados a cabo como pruebas piloto dentro de un esquema de selección familiar para resistencia contra el Virus de la Mancha Blanca.

Materiales y Métodos

Pruebas de desafío en estadios tempranos

Postlarvas en estadios PL20, PL30 y PL40 fueron utilizadas para determinar el estadio más temprano de mortalidad a WSSV en tres experimentos secuenciales utilizando larva del mismo origen. Animales provenientes de un pool de familias levantadas individualmente hasta el estadio correspondiente fueron distribuidos en frascos de vidrio de 3 litros de capacidad (20 animales por frasco). Se evaluaron 3 tratamientos de infección: inmersión en un extracto viral (dilución de10^{-2} del stock original) clarificado por centrifugación en solución TNE a partir de epidermis de camarones enfermos; ingestión de papilla infectada a razón de 5% de biomasa de la unidad experimental (95% de tejido infectado licuado con 5% de agua –por peso-); y tejido licuado (5% de tejido infectado licuado con 95% de agua –por peso) a razón de 10 ml por litro por unidad experimental. Adicionalmente se incluyó un control de animales no infectados. Todos los tratamientos, incluido el control no infectado fueron distribuidos bajo un diseño completo al azar con 4 réplicas (cada réplica fue un frasco con 20 animales) por tratamiento y mantenidos a 25ºC. El día previo a la infección se suspendió la alimentación de los animales. La infección con el tratamiento correspondiente se repitió dos veces el mismo día durante 3 horas. Entre cada periodo de infección se procedió a un recambio total de agua. Los animales fueron alimentados antes y después de la infección con la dieta CENAIM-40 desarrollada en nuestro Centro. Animales muertos fueron removidos dos veces por día y los supervivientes fueron contabilizados cada dos días desde el primer día hasta el séptimo día postinfección. Los datos colectados fueron normalizados mediante la transformación de arcoseno y evaluados mediante análisis de varianza. Cuando se encontraron diferencias significativas se hicieron comparaciones de rango utilizando la prueba de Diferencias Mínimas Significativas.

Desafío de familias

Un total de 25 cruces provenientes de reproductores supervivientes a fuertes eventos de WSSV fueron levantados en forma individual. Las 25 familias fueron infectadas en tres estadios: PL35, PL55 y PL75. En cada estadio 160 animales de cada familia fueron distribuidos en 8 réplicas (frascos de 3 litros de capacidad con 20 animales por frasco) bajo un diseño completamente al azar. Adicionalmente se utilizó un control infectado y otro no infectado formado por animales provenientes de todas las familias mezclados en números similares. Todos los frascos fueron mantenidos a 25ºC con fuerte aireación y los animales fueron alimentados con CENAIM-40 antes y después de la infección. La alimentación fue suspendida el día anterior a la infección. Para la infección se utilizó papilla (95% de colas licuadas con 5% de agua) en un volumen de 10% de la biomasa calculada para cada unidad experimental, repartida en dos dosis el mismo día. Tres horas después de la primera y segunda dosis de papilla se procedió a un recambio total de agua en cada unidad experimental. Animales muertos fueron retirados de los frascos dos veces por día. Animales supervivientes fueron contados cada dos días por 15 días. Datos de supervivencia fueron normalizados mediante la transformación de arcoseno. Análisis de varianza y la prueba de diferencias mínimas significativas fueron utilizadas para detectar diferencias estadísticas. Correlación entre rangos en los diferentes estadios fue determinada utilizando el coeficiente de Pearson en datos normalizados mediante la transformación de arcoseno.

Resultados

La figura 1 muestra la supervivencia en los tratamientos en los tres estadios evaluados. La tasa de supervivencia para PL20, PL30 y PL40 al séptimo día postinfección se presenta en la tabla 1.

En PL20 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos de infección ni con el control no infectado. En PL30 se encontraron diferencias significativas en supervivencia entre el control no infectado y el resto de tratamientos. Similar situación fue detectada en PL40. En general, la supervivencia de los tratamientos retados con el virus entre PL20 y PL40 fue mayor mientras más temprano fue el estadio en que se realizó el desafío.

En la figura 2 se muestra la curva de mortalidad de 25 familias retadas con el Virus de la Mancha Blanca en PL35. Curvas similares fueron obtenidas en PL55 y en PL75. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas para los tres estadios ($p<0.001$). Datos de supervivencia de las familias y controles evaluados en los tres estadios se presentan en la tabla 2, junto con los rangos de significación. En PL35 la supervivencia de las familias varió entre 1.9% y 23.1%. En PL55 el rango se ubicó entre 0.6% y 20%. En PL55 los valores se ubicaron entre 0% y 8.1%.

En la figura 3 se muestran los diagramas de dispersión de la supervivencia de las familias entre los tres estadios evaluados. El análisis entre los diferentes estadios demostró que no existe correlación significativa ($r=0.10$; $p>0.05$) entre PL35 y PL55 ni entre PL35 y PL75 ($r=0.16$; $p>0.05$). En cambio se encontró que existe una correlación positiva estadísticamente significativa en supervivencia de familias entre los estadios PL55 y PL75 ($r=0.62$; $p<0.01$).

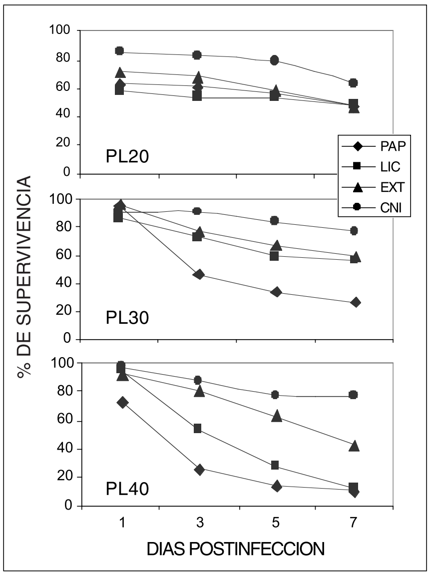

Fig. 1. Tasa de supervivecia de *L. vannamei* infectado por tres métodos (licuado –LIC-, papilla –PAP- e inmersión –INM-) en PL20, PL30 y PL40. CNI: control no infectado.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia, desviación estándar (en paréntesis) y rangos de significación utilizando diferencias mínimas significativas en tres estadios de camarón blanco, *L. vannamei*, desafiados mediante infección por inmersión en extracto viral (INM), papilla (PAP) y licuado (LIC). Se incluyen los datos del control no infectado (CNI).

PL20		PL30		PL40	
TRATAM.	**% SUPERV.**	**TRATAM.**	**% SUPERV.**	**TRATAM.**	**% SUPERV.**
CNI	63.8 (2.9)	CNI	77.5 (14.4) A	CNI	76.3 (12.5) A
LIC	48.8 (7.5)	INM	58.8 (2.5) B	INM	42.5 (8.7) B
INM	47.5 (21.0)	LIC	56.3 (11.1) B	LIC	12.5 (14.4) C
PAP	47.5 (22.5)	PAP	26.3 (8.7) C	PAP	11.3 (4.8) C

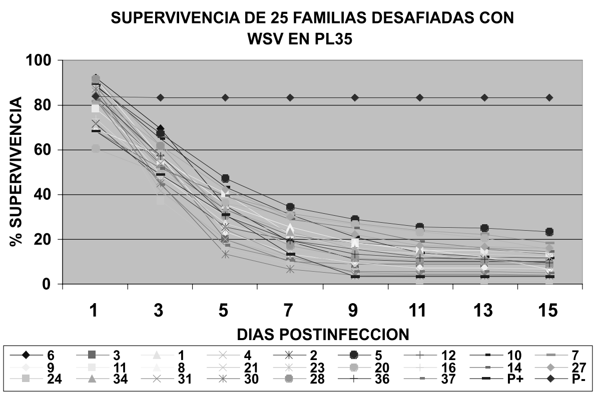

Fig. 2. Supervivencia de 25 familias retadas con el Virus de la Mancha Blanca en PL25. Se incluyen los datos del control infectado y el no infectado.

Tabla 2. Porcentajes de supervivencia (de menor a mayor) y rangos de significación con diferencia mínima significativa en 25 familias y dos controles (P+: control infectado; P-: control no infectado) desafiados con el Virus de la Mancha Blanca.

PL35		PL55		PL75	
FAMILIA	% SUPERV	FAMILIA	% SUPERV	FAMILIA	% SUPERV
24	1.88 ^{a}	10	0.63 ^{a}	1	0.00 ^{a}
30	3.75 ^{ab}	1	0.63 ^{a}	6	0.00 ^{a}
P+	3.13 ^{abc}	37	1.25 ^{ab}	8	0.63 ^{ab}
37	5.00 ^{abcd}	2	1.25 ^{abc}	10	0.63 ^{ab}
31	3.75 ^{abcd}	7	1.25 ^{abc}	30	0.63 ^{ab}
8	6.88 ^{abcde}	6	1.88 ^{abcd}	7	0.63 ^{ab}
21	5.62 ^{abcde}	30	3.13 ^{abcd}	2	1.25 ^{abc}
4	6.25 ^{abcde}	23	3.13 ^{abcde}	16	1.25 ^{abc}
9	6.88 ^{abcde}	31	3.75 ^{abcde}	31	1.25 ^{abc}
28	8.75 ^{abcdef}	34	4.37 ^{abcde}	37	1.25 ^{abc}
36	9.38 ^{abcdef}	8	4.37 ^{abcde}	3	1.88 ^{abcd}
3	8.75 ^{bcdefg}	3	6.25 ^{bcdef}	23	1.88 ^{abcd}
2	9.38 ^{bcdefg}	21	5.00 ^{bcdef}	27	3.75 ^{abcd}
6	10.00 ^{bcdefg}	9	6.88 ^{bcdef}	20	2.50 ^{abcd}
1	9.38 ^{bcdefg}	12	6.25 ^{bcdef}	21	3.13 ^{abcd}
34	9.38 ^{bcdefg}	14	6.25 ^{bcdef}	14	3.75 ^{abcd}
14	14.37 ^{bcdefg}	20	8.12 ^{cdef}	P+	3.75 ^{abcd}
16	12.50 ^{bcdefg}	5	9.38 ^{defg}	24	3.13 ^{abcd}
23	12.50 ^{cdefgh}	P+	8.12 ^{efgh}	34	3.13 ^{abcd}
10	11.87 ^{defgh}	24	10.00 ^{efghi}	4	4.37 ^{abcd}
12	13.12 ^{efgh}	36	11.25 ^{fghi}	11	4.37 ^{bcd}
20	15.63 ^{efgh}	11	11.87 ^{fghi}	12	5.00 ^{bcd}
11	13.75 ^{efgh}	4	13.12 ^{fghi}	36	6.25 ^{cd}
27	16.25 ^{fgh}	27	15.00 ^{ghi}	28	6.25 ^{cd}
7	18.13 ^{gh}	16	16.25 ^{hi}	9	5.62 ^{d}
5	23.13 ^{h}	28	20.00 ^{i}	5	8.12 ^{d}
P-	83.13 ^{i}	P-	78.75 ^{j}	P-	73.75 ^{e}

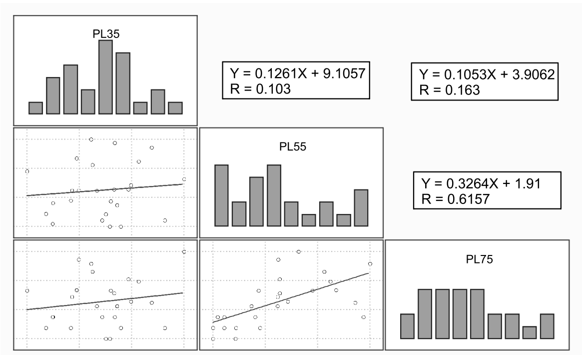

Fig. 3. Regresión y correlación de resistencia a WSSV en 25 familias desafiadas en PL35, PL55 y PL75. Los histogramas en la diagonal representan la supervivencia la población total de familias en los tres estadios.

Discusión

Larva infectada con el WSSV en PL20 no mostró mortalidades masivas durante los 7 días que duró el experimento. En un trabajo previo, larvas en PL12 infectadas mediante extracto viral no mostraron tampoco mortalidad (datos no publicados). Mortalidades estadísticamente significativas se produjeron cuando la infección fue realizada en PL30. Igualmente el porcentaje general de mortalidad fue más alto en PL40 que en PL30. Venegas *et al.* (1998) reportan resultados parecidos en *P. japonicus* en los cuales mortalidades masivas no fueron detectadas antes de PL10 e igualmente las mortalidades en PL37 fueron mayores que en PL20 y PL10. Estos resultados concuerdan con las observaciones de los laboratorios de producción de larvas ecuatorianos en los cuales no se han reportado mortalidades masivas debidas a WSSV. Estudios de infectividad mediante inmersión en *P. monodon* (0.02 g de peso promedio), *P. japonicus* (0.08 g) y *P. penicillatus* (0.003 g) mostraron que estas especies son altamente susceptibles dando 100% de mortalidad entre cinco y seis días después de la infección (Chou *et al.* 1998). Nuestros datos soportan la idea de que *L. vannamei* es menos susceptible al Virus de la Mancha Blanca al menos en los estadios tempranos. Diferencias en susceptibilidad al virus han sido demostradas entre especies pertenecientes a los géneros *Penaeus, Machrobrachium* y *Farfantopenaeus* (Hameed *et al.* 2000, Wang *et al.* 1998, Wang *et al.* 1999).

Al comparar los resultados entre PL30 y PL40 se determina que los porcentajes de mortalidad son más altos en el segundo estadio para cada uno de los tres métodos de infección. En pruebas de desafío con animales de 1 g utilizando papilla infectada como inóculo, hemos encontrado mortalidades que alcanzan el 100% en 7 días (datos no publicados). Esto indica aparentemente que *L. vannamei* incrementa su susceptibilidad al WSSV a medida que los animales crecen al menos bajo condiciones de bioensayos controlados.

Si el comportamiento descrito es similar en campo, nuestros datos podrían explicar las mortalidades masivas en piscinas comerciales en donde la siembra se realiza a partir de PL12. Bajo estas condiciones animales moribundos son detectados en la mayoría de casos entre 30 y 40 días después de la siembra, es decir entre PL42 y PL52. El periodo sin mortalidad podría explicarse como el tiempo necesario para amplificar la enfermedad en un evento tipo cascada. Alrededor de PL30 podrían aparecer los primeros animales moribundos a causa del virus. Esos animales serían canibalizados y una segunda ola de moribundos se produciría entre 7 y 10 días después. Probablemente dos o tres olas suscesivas de infección serían necesarias para infectar a la mayor parte de la población y producir mortalidades masivas. Un esquema de amplificación mayor podría deberse a la presencia de portadores positivos en la piscina (diferentes tipos de camarones, copépodos, cangrejos y otros organismos).

En PL30 la infección mediante papilla fue la mejor vía de inoculación mientras el licuado y la inmersión en extracto viral dieron resultados intermedios. Por otro lado en PL40 la papilla y el licuado dieron resultados estadísticamente similares. En este caso el licuado varió de ser una vía de inoculación intermedia a ser una vía de inoculación altamente infectiva. Este resultado podría explicarse si se considera al licuado como un tratamiento intermedio entre papilla e inmersión en extracto viral. Los resultados en PL30 reflejarían la ingestión de cantidades de tejido infectado menores que en el tratamiento con papilla. Por otro lado en PL40 el licuado aportaría con pequeñas cantidades de tejido que serían consumidos por los animales y que junto con una mayor susceptibilidad a las partículas virales libres darían los resultados observados.

La evaluación de la susceptibilidad de familias al WSSV indican la existencia de diferencias en la respuesta al virus. Esta variabilidad es la base para cualquier programa de selección e implica que un proceso de mejoramiento podría ser exitoso a mediano plazo. Sin embargo, al momento no es posible determinar cuál será la ganancia genética por ciclo de selección. Para esto será necesario determinar la heredabilidad del carácter resistencia al WSSV. Trabajos a futuro deberán realizarse utilizando un esquema de medio-hermanos (half-sibs) para determinar parámetros genéticos. Por la misma vía, un proceso de selección de familias resistentes junto con un grupo control podrían servir para estimar heredabilidad alcanzada sin necesidad de experimentos con medio-hermanos. Datos sobre heredabilidad en sentido estrecho de resistencia a TSV (Argue *et al.* 1999) indican heredabilidades menores al 0.1. Con ese nivel de heredabilidad el único esquema de selección con posibilidades de éxito es la selección familiar.

Con los protocolos de challange tests desarrollados en CENAIM hemos evaluado juveniles de 1 g provenientes de tres programas de selección. Dos de ellos utilizaron reproductores supervivientes de eventos fuertes de WSSV mientras el tercero utilizó animales que no presentaron mortalidades masivas en piscina (datos no publicados). Los tres grupos presentaron mortalidades del 97 al 99% siete días después del inicio del desafío y no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Los resultados obtenidos por esos programas son explicables si asumimos una heredabilidad baja para resistencia a WSSV. La utilización de reproductores supervivientes es equivalente a una selección masal. Este tipo de selección no es efectiva cuando los valores de heredabilidad son bajos.

La población de familias presenta una escala continua de resistencia en los tres estadios. No se ha encontrado familias con resistencias extremas. En el caso de que el carácter bajo estudio estuviese controlado por uno o muy pocos genes se esperaría encontrar familias con altos niveles de resistencia. Nuestros resultados apuntan tentativamente a que el carácter resistencia a WSSV es cuantitativo y controlado por múltiples genes, es decir una resistencia horizontal. Aún cuando el proceso de selección es más difícil en este tipo de caracteres al compararlo con caracteres controlados por uno o por pocos genes (resistencia vertical), la resistencia que se obtiene por un proceso de selección es más estable ya que para el patógeno es difícil superarla. La resistencia vertical puede ser superada por el patógeno en muy pocas generaciones, a veces en una sola, lo que fuerza a la búsqueda continua de nuevas fuentes de resistencia.

Los valores de correlación entre PL35 versus PL55 y PL35 versus PL75 son bajos y no significativos estadísticamente. En cambio los valores entre PL55 versus PL75 son altos y estadísticamente significativos. Estos resultados merecen una investigación más profunda para poder explicarlos. Al momento no podemos determinar las causas de este comportamiento, pero existiría la posibilidad de que la resistencia al WSSV en diferentes estadios esté controlado por diferentes sets de genes. Esos genes podrían estar ligados a caracteres de desarrollo fisiológico. En estadios tempranos los cambios fisiológicos son muy rápidos y requieren de la intervención concertada de un gran número de genes que actúan por periodos cortos y luego se apagan. En cambio a medida que el animal se desarrolla, los cambios fisiológicos se vuelven más lentos y los grupos de genes que controlan diferentes caracteres se vuelven más estables al funcionar por mayor tiempo.

Las correlaciones entre diferentes estadíos tienen un efecto en el esquema de selección que debe seguirse para buscar resistencia a WSSV. Si la correlación fuese alta entre los 3 estadíos, sería necesaria una sola prueba de desafío para seleccionar familias resistentes. En cambio nuestros resultados sugieren que son necesarias por lo menos dos pruebas de desafío: una en PL35 y otra en PL55 hacia adelante. La información generada en las dos pruebas de desafío deberán ser utilizadas en un índice de selección que coloque un peso específico a la resistencia en cada estadío.

Al comparar la mortalidad promedio en las familias en los diferentes estadios se observa que esta es mayor mientras mayor edad tiene el camarón. Estos resultados coinciden con las pruebas en PL20, PL30 y PL40 discutidas anteriormente e indican que mientras más edad tiene el camarón más susceptible se vuelve al WSSV.

Nuestras investigaciones resaltan tres puntos importantes:

- No se puede inducir mortalidades por WSSV en estadios tempranos de *L. vannamei*.
- A medida que el camarón se desarrolla se vuelve más susceptible al WSSV.
- Existe variabilidad en la susceptibilidad a WSSV en familias de *L. vannamei* lo que es útil para un proceso de mejoramiento genético.

Bibliografía

Argue B., Arce S., Lotz J. y Moss S. 1999. Heretability for resistance to taura syndrome virus in specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. Page 28 in World Aquaculture´99: Book of Abstracts. 26 April-2 May, 1999, Sidney, Australia. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Chou H., Huang C., y Kow G. 1998. Studies on trasmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in Penaeus monodon and P. japonicus via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture 164:263-272.

Hameed S., Charles X. y Anilkumar M. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosembergii* to white spot syndrome virus. Aquaculture 183:207-213.

Tapay L., Nadala C. y Loh P. 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. Journal of Virological Methods 82:39-43.

Venegas C., Nonaka L., Nushiake K., Shimizu K., Nishizawa T. y Muroga K. 1998. Pathogenicity of penaeid, rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. Fish Pathology 34:19-23.

Wang Q., White B., Redman R. y Lightner D. 1999. Per os challange of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. Aquaculture 170:179-194.

Wang Y., Lo C., Chang P. y Kou G. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture 164:221-231.