PROGRAMA DE DOMESTICACIÓN Y MEJORAMIENTO

GENÉTICA

El area de Genética en su planificación a mediano plazo contempla actividades en dos campos distintos: (1) Genética Cuantitativa y (2) Genética Molecular.

(1) Genética Cuantitativa tiene como objetivo general obtener líneas de camarón con caracteres de interés comercial superiores al material silvestre utilizado por la industria. Con ese fin CENAIM se asoció con tres empresas camaroneras y se conformó la empresa PROMOGEN que se dedicará al desarrollo de estas líneas. Dentro de ese marco se planteó la evaluación de 200 familias para crecimiento y supervivencia durante el 2000. Como objetivo específico antes de finalizar el año 2002 se pretende la entrega de 400.000 reproductores mejorados al sector camaronero nacional.

(2) En Genética molecular el objetivo general es la implementación de técnicas que permitan acelerar el desarrollo de variedades mejoradas de camarón a mediano plazo. Para el 2000 se planteó el desarrollo de técnicas moleculares y la implementación de pruebas de parentesco para alta selección.

RESUMEN DE CONCLUSIONES

Genética Cuantitativa

1. Se determinó que existe amplia variabilidad genética para crecimiento en camarón, suficiente para obtener ganancias entre 5 y 15% por ciclo de selección.
2. Se cuenta con 7 familias seleccionadas para peso y supervivencia que durante el 2001 deberán ser multiplicadas.

Genética Molecular

1. La generación de marcadores moleculares tipo AFLP en camarón fue implementada bajo condiciones de CENAIM.
2. La obtención de librerías enriquecidas para microsatélites mediante clonación con "primers" randómicos es factible. Podrían existir posibilidades de patente en el nuevo método implementado.

PROYECTOS REALIZADOS Y RESULTADOS RELEVANTES

Genética Cuantitativa

Durante el año 2000 se realizaron dos series de experimentos para selección y se desarrollaron protocolos para pruebas de desafío contra mancha blanca para evaluación de familias. En el primer grupo de experimentos se determinó la factibilidad de utilizar jaulas para levantamiento de animales hasta 1 g, marcaje mediante elastómeros bajo condiciones de campo y levantamiento de familias en condiciones de camaronera. Se evaluaron 10 familias en condiciones de baja densidad (2 m^2). Los resultados indicaron que los protocolos implementados funcionan. Igualmente se colectaron datos iniciales sobre variabilidad entre familias para peso y supervivencia. La desviación estandar para crecimiento está en 0.9 g entre familias y entre 1.8 y 2 g dentro de familias.

El segundo grupo de experimentos se desarrolló con PROMOGEN en tres camaroneras asociadas. Se realizaron tres levantamientos de 50 familias y un levantamiento de 37 familias. En tres levantamientos hubo ataque de mancha blanca por lo cual no se completó la evaluación planificada para peso y supervivencia. Sin embargo los animales supervivientes de esos eventos fueron levantados en forma grupal, sin considerar su origen familiar, hasta reproductores y serán utilizados en el 2001 para generación de cruces dentro del programa. En el levantamiento de 37 familias se completó la evaluación para peso y supervivencia. Siete familias de ese grupo fueron seleccionadas en base a peso y supervivencia y levantadas a reproductores (Figura 1). Adicionalmente dentro de esas siete familias se realizó un proceso de selección intrafamiliar basado en peso para generar animales superseleccionados.

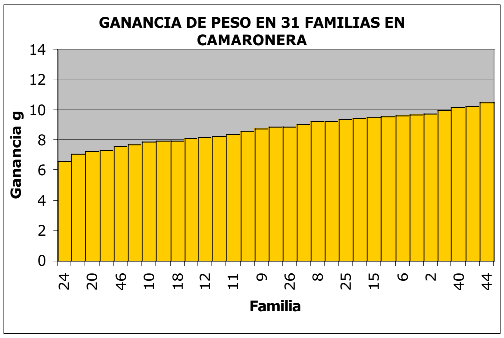

Figura 1. Peso a cosecha de 31 familias de camarón blanco evaluadas en camaronera. PROMOGEN 2001.

Genética Molecular

Implementación de AFLPs (Amplified fragment length polymorphism).

Esta técnica es una herramienta de caracterización genética que permite estudiar el genomio de cualquier individuo a nivel de laboratorio. Los marcadores genéticos determinados mediante AFLPs están ligados a caracteres de interés de acuerdo al diseño experimental utilizado. Para la búsqueda de resistencia a mancha blanca en camarón se propuso tomar muestras de animales susceptibles (aquellos que mueren por el ataque viral) y resistentes. Ambos grupos serán comparados mediante AFLPs y los marcadores moleculares ligados a resistencia o susceptibilidad serán caracterizados y utilizados posteriormente para seleccionar reproductores. Con el fin de probar la técnica a nivel local se realizaron pruebas piloto que demostraron la factibilidad de implementar AFLPs bajo las condiciones de CENAIM.

Optimizacion de las pruebas de PCR para White Spot.

Desde la aparición de la mancha blanca en el país, CENAIM viene realizando su diagnóstico mediante PCR utilizando kits comerciales. En las fases iniciales de la epidemia se evaluó la posibilidad de utilizar protocolos previamente publicados. Sin embargo por la urgencia se decidió la utilización de kits comerciales de diagnóstico. Sin embargo, el costo de cada reacción por el sistema es entre 8 y 10 veces más elevado que el diagnóstico mediante protocolos que utilicen componentes aislados. Con el fin de disminuir costos para el trabajo de investigación, se realizaron pruebas para determinar la posibilidad de utilizar componentes separados para detección de mancha blanca. Se demostró la factibilidad de utilizar esos componentes junto con un sistema rápido de aislamiento de ADN. Comparaciones con los kits comerciales para determinar sensibilidad se planean realizar durante el 2001.

Clonación de Microsatélites

Microsatélites son secuencias repetitivas de DNA que están esparcidas en todo el genomio de prokariotas. Este tipo de marcador molecular tiene un alto nivel de variación. Son útiles para estudios de poblaciones, identificación de individuos y mapeo genético. Mediante clonación de fragmentos producto de amplificación de secuencias no específicas mediante PCR se obtuvo una biblioteca genómica de camarón altamente enriquecida con secuencias de microsatélites. Por secuenciación automática de esos clones se determinaron 30 secuencias de microsatélites que deberán ser evaluadas para determinar su utilidad como secuencias de trabajo. Esta técnica es totalmente nueva y tiene la ventaja de ser mucho más rápida y específica para la generación de microsatélites en comparación a los métodos que se utilizan normalmente.

Endocrinología

El plan estratégico de investigaciones 1999–2002 para el área de Endocrinología plantea como prioridades de investigación estudios relacionados a los procesos de maduración y muda, proponiendo como objetivos específicos: a) Mejoramiento reproductivo de camarones en cautiverio a través del uso de neuropéptidos homólogos (Proyecto VLIR-CENAIM y Proyecto VLIR-ESPOL); b) Estudio "molecular" de los neuropéptidos presentes en el sistema nervioso central de hembras reproductivas, involucrados en la maduración (Proyecto VLIR-ESPOL); c) Estudio básico de la muda y su relación con la maduración en cautiverio (Proyecto VLIR-ESPOL).

Resumen de Conclusiones

Estudio inicial del proceso de la muda

1. Se identificó en el sistema nervioso la presencia de un factor ecdisiotrópico que estimula la producción de la hormona de la muda (ecdiesteroides) en cultivos *in vitro* con el órgano Y.
2. Se preparó un extracto de 3500 sistemas nerviosos de juveniles (12-15 gramos) para proceder a purificar por HPLC el factor ecdisiotrópico.

Estudio molecular de los neuropéptidos durante la maduracion

Esta fase inicial consistió en aislar el ARNmensajero y preparar una versión de ADN complementario.

Proyectos Realizados y Resultados relevantes

Estudio inicial del proceso de muda

Luego de la implantación de las técnicas de cultivo *in vitro* de órganos Y y análisis de ecdiesteroides por el método de ELISA y de caracterizar la producción de ecdiesteroides en adultos en el órgano Y y hemolinfa durante el ciclo de muda (1999), se procedió a la identificación de un factor ecdisiotrópico en el sistema nervioso.

Se preparó un extracto de sistemas nerviosos de hembras maduras e inmaduras los cuales fueron probados en órganos Y de animales en distintos estadios de muda. Se observó que la adición del extracto de sistemas nerviosos estimuló la producción de ecdiesteroides en órganos Y en estadios de intermuda, premuda temprana y premuda tardía (primer subestadio) (Figura 2). De esta manera se confirma que en el sistema nervioso de camarones adultos existe un compuesto (péptido) el cual estimula de producción de la hormona de la muda. Se han disectado 3500 sistemas nerviosos de juveniles (14-17 gramos) y preparado un extracto melanólico el cual fue posteriormente procesado (eliminación de lípidos, filtración y prepurifacación) hasta alcanzar las condiciones de pureza para ser utilizado en el primer paso de purificación por HPLC.

Estudio molecular de los neuropéptidos durante la maduración

Se disectaron los sistemas nerviosos de animales adultos y se extrajo el ARN. Se aisló por medio de kits el ARNmensajero y se preparó una versión de ADN complementario. Se prevee la incorporación de éste material genético en una biblioteca de expresión. Se están preparando los "primers" (secuencia de péptidos de interés) para su uso en el "screening" de la biblioteca de cDNA.

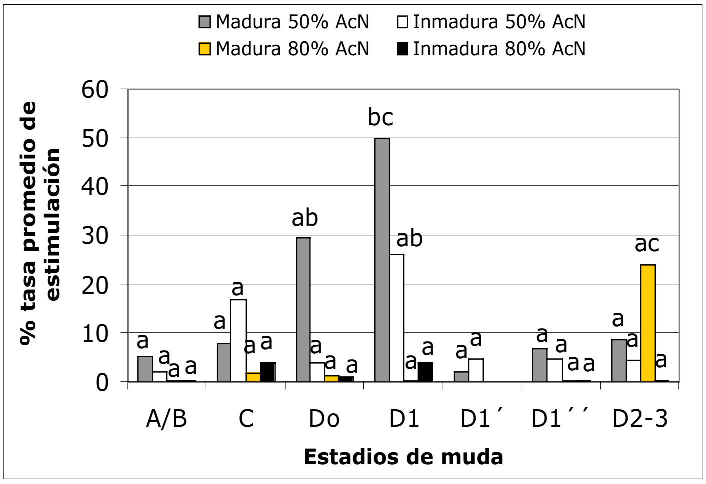

Figura 2. Efecto de extractos de sistemas nerviosos de hembras *Litopenaeus vannamei* maduras e inmaduras sobre la tasa de producción de ecdiesteroides por parte del órgano Y en diferentes estadios de muda.. Los estadios de muda son:A= postmuda temprana, B= posmuda tardia, C= intermuda, Do-D_1= premuda temprana, D_{2-3}= premuda tardia. Diferencias estadísticas (LSD F test P<0,05) entre las tasas de estimulación estan indicadas por las letras sobre cada barra. Una misma letra indica que no existe diferencia estadística.