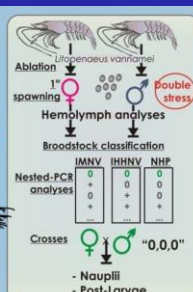
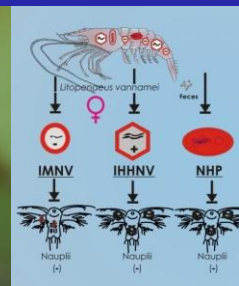
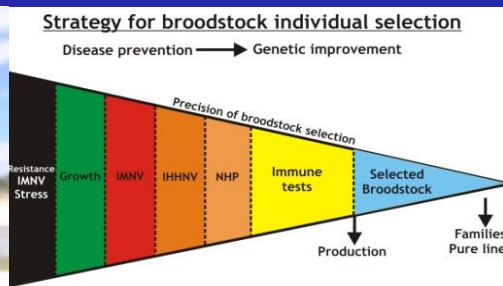




Avanços no Melhoramento Genético do *L. vannamei* no Brasil para a Resistência ao IMNV e o Crescimento

Gael Leclercq
 CAPD / Concepto Azul Brasil
 gael_leclercq@yahoo.com

FENACAM 2013



Doenças e desafios na produção no Nordeste

Doenças e Desafios no Nordeste do Brasil

PATÓGENOS NAS FAZENDAS



IMNV



IHHNV



NHP



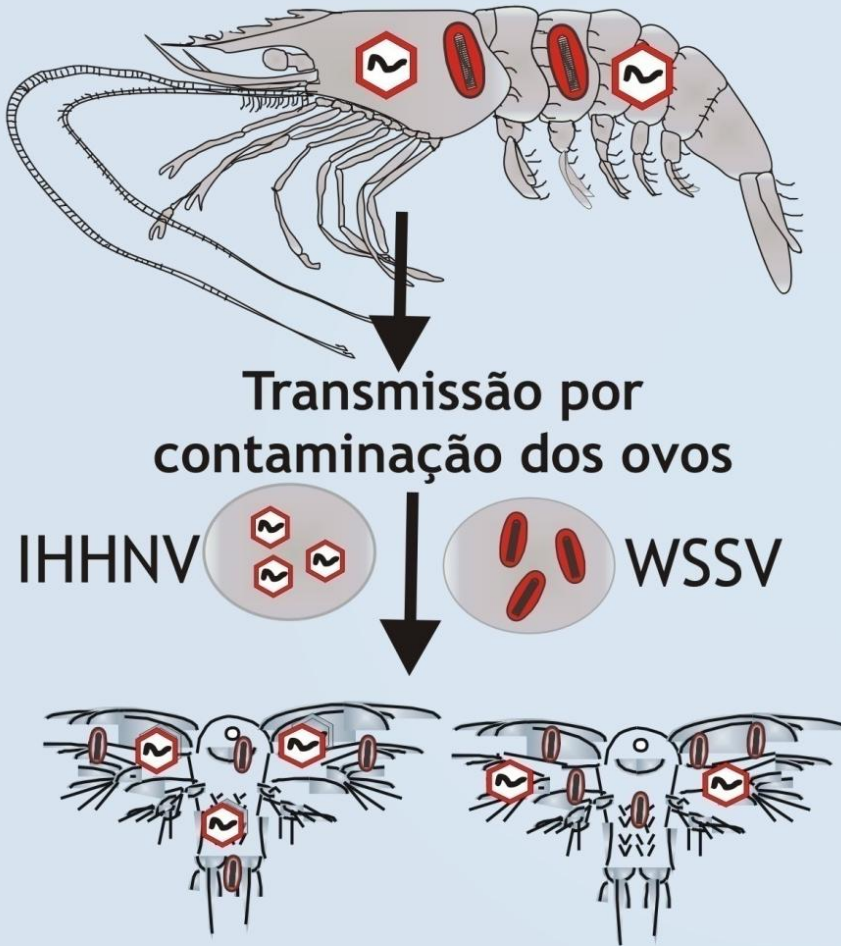
WSSV

FATORES DE ESTRESSE

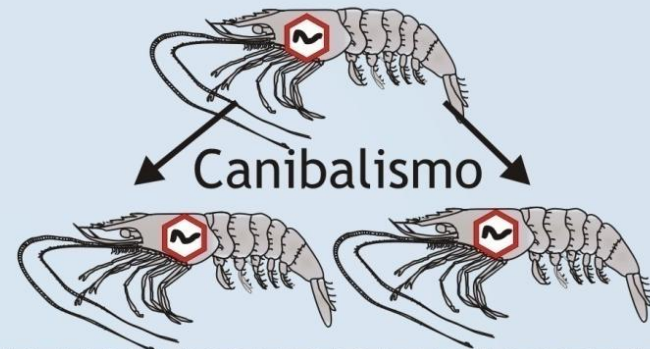
- Alta densidade
- Hipóxia
- Variação de temperatura
- Variação de salinidade
- Câmbios na flora microbiana

Transmissão dos vírus e NHP

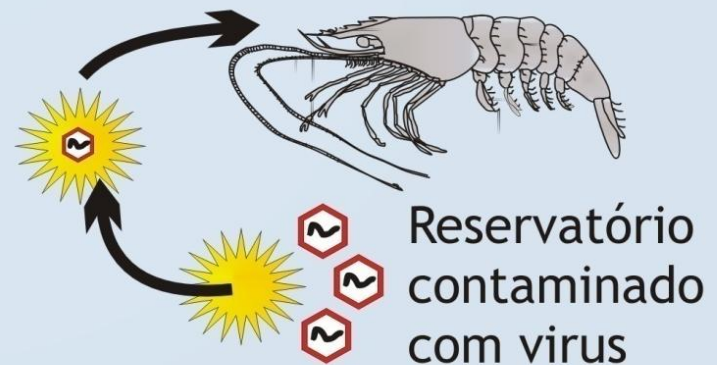
Transmissão vertical



Transmissão horizontal direta



Transmissão horizontal através de um reservatório



IMNV – (Infectious Myonecrosis Virus)

Sinais clínicos

Necrose muscular

Mortalidade em viveiros e reprodutores até 80%

Família: Totiviridae

Morfologia: Não envelopado

Tamanho: 40nm

Genoma: - Estrutura: dsRNA
- Tamanho : 8 Kb



Infecção de ovários e ovos / Larvas
= Transmissão vertical

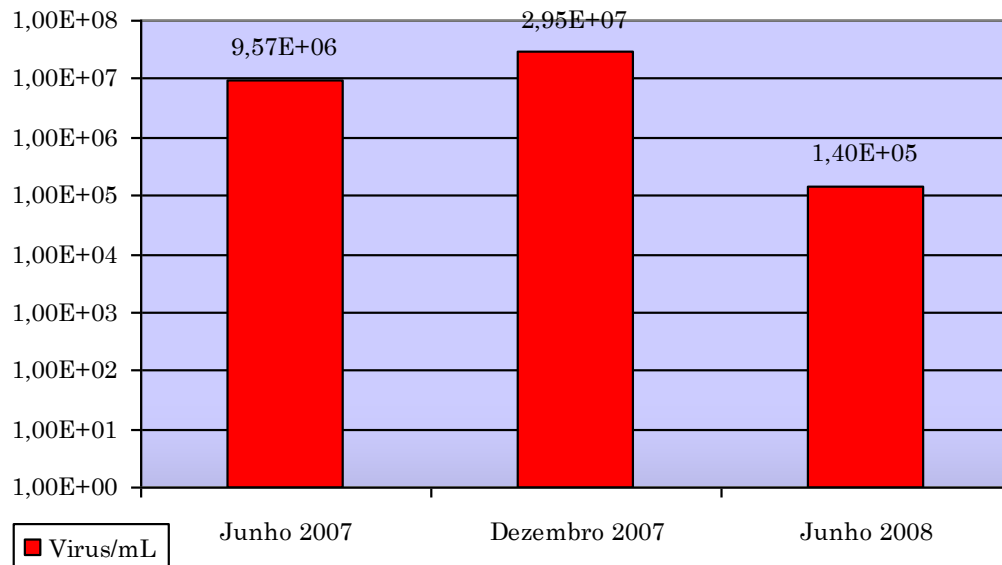


Microscopia eletrónica

ESTAGIO ANÁLISE	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
PCR IMNV Femeas	100%	77%	46%	0%
PCR IMNV ovos	2+/3 (67%)	1+/3 (33%)	1+/3 (33%)	0/5 (0%)
PCR IMNV Nauplio III	3+/3 (100%)	2+/2 (100%)	1+/3 (33%)	0/5 (0%)


Epidemiologia do IMNV / meio ambiente

Quantificação por Real time PCR
do vírus IMNV na água da Fazenda



Hospedeiros na fazenda

AMOSTRAS	Nested PCR
OSTRAS	40% (2/5)
ZOOPLANCTON	77% (21/27)
CARANGUEJOS	80% (8/10)



Mais de um milhão de partículas virais IMNV por mL água de fazenda

Impossibilidade da erradicação no meio ambiente
Fazendas em sistema aberto



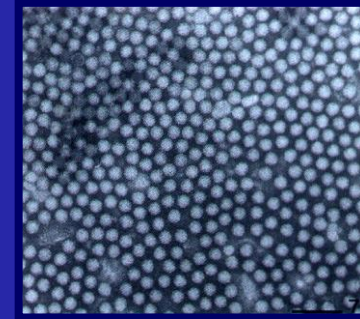
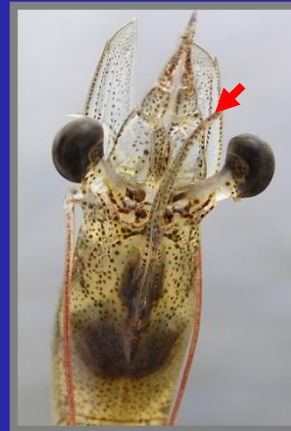
IHHNV

Virus da Necrose Infecciosa Hipodérmica e Hematopoiética

Familia: Parvoviridae

✓ Síntomas

- Deformações
- Disparidade de tamanho



Impacto

Redução de sobrevivência : ate 50%

Redução de crescimento : até 50%

Redução de produtividade: 30%

Alto FCA

Transmissão horizontal

PCR positivas: amostras agua Fazendas

Infeção de ovarios e ovos / Larvas = Transmissão vertical

Females	Group 0						Group 1					Group 2				Group 3				Group 4					
Nested-PCR:	-						+					+				+				+					
Dot-blot:	-						+					++				+++				++++					
Stages	# Females						# Females					# Females				# Females				# Females					
Eggs before disinfection	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6
Eggs after disinfection	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*
Nauplius V	-						-					-				-				-					
Zoea III	-						+					++				+++				++++					
Mysis III	-						-					++				+++				++++					
PL5	-						-					++				+++				++++					
PL15	-						-					++				+++				++++					
PL25	-						-					++				+++				++++					

NHP

Hepatopancreatitis Necrotizante

Agente etiológico:

- ✓ Bacteria Gram negativo
- ✓ Bacterias intracelulares do tipo rickettsia
- ✓ Bastões pequenos, pleomórficos
0.59-1.18 μm
- ✓ Não cultiváveis.



Impacto

Infecta as células do Hepatopâncreas
Causa anorexia

Redução de sobrevivência: 10%-50%

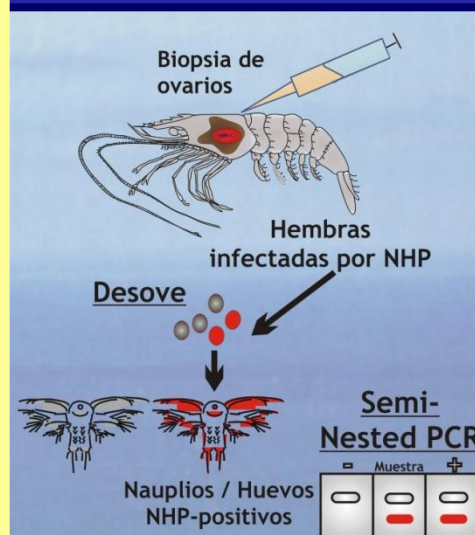
Redução de crescimento: 10%-30%

Redução de produtividade: 20-70%

Transmissão horizontal

PCR positivas: amostras agua Fazendas

Infecção dos ovocitos / Larvas = Transmissão vertical



Qualidades requeridas para os Reprodutores e as PLs

Triplo critério: Resistência / Crescimento / Sanidade

Resistência

Reprodutores resistentes aos agentes patógenos e fatores de estresse

- => Implementação de desafios múltiplos
- => Cruzamentos dirigidos (inbreeding / herdabilidade)
- => Desenvolvimento de marcadores moleculares da resistência (MAS/GAS)

Crescimento

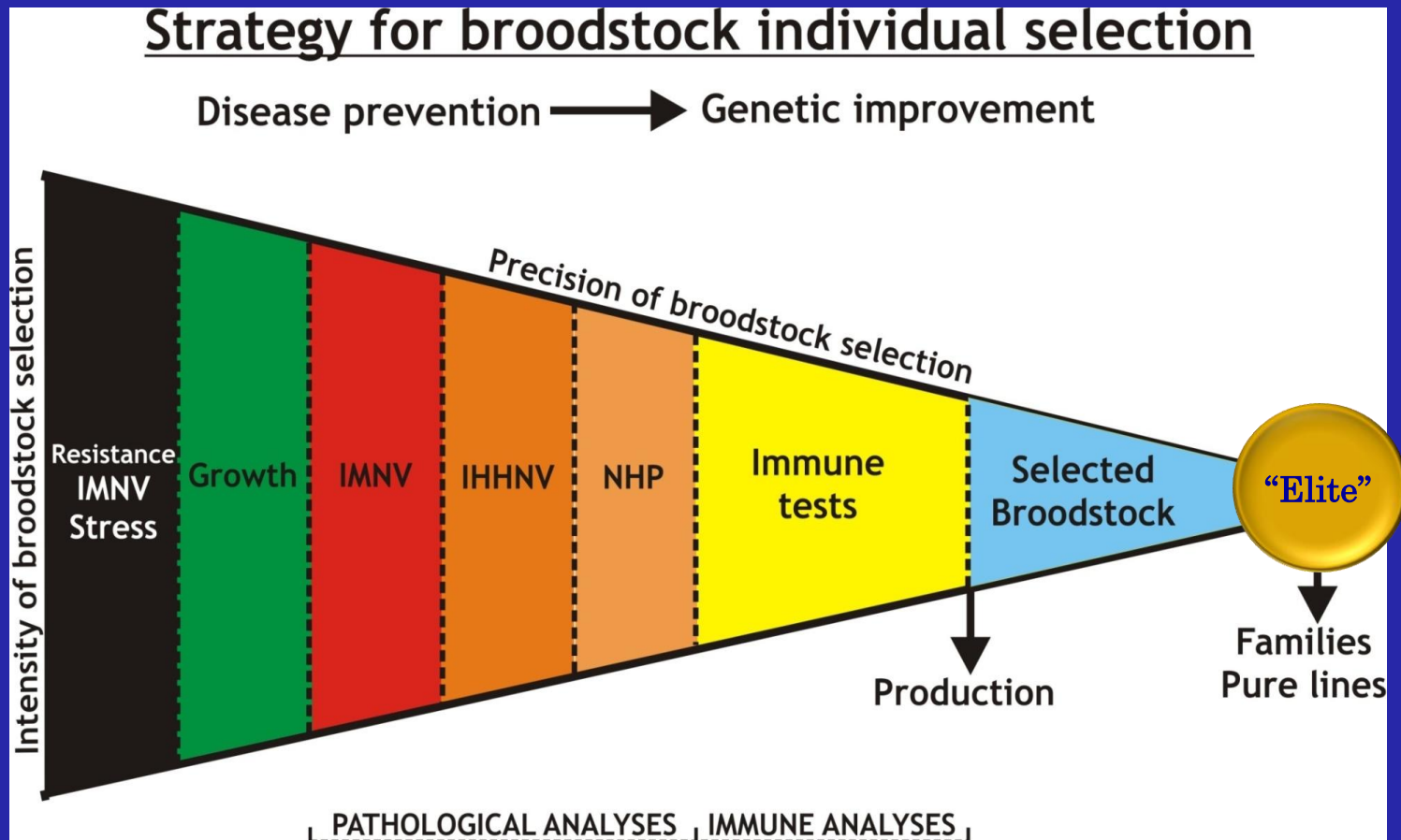
- => Seleção individual e familiar combinada para crescimento em condições de laboratório e Fazenda
- => Desenvolvimento de marcadores moleculares do crescimento (MAS/GAS)

Sanidade

Reprodutores e PLs livres dos patógenos IMNV, IHNV, WSSV e NHP

- => Prevenção da transmissão vertical / análises individuais reprodutores por LAMP

Estratégia integrada: Da Prevenção de doenças ao Melhoramento genético



- Seleção multi critério
- Exposição direta aos patógenos
- Seleção em Laboratório e Fazenda
- Seleção familiar e individual

Controle Sanitário - Certificação dos reprodutores

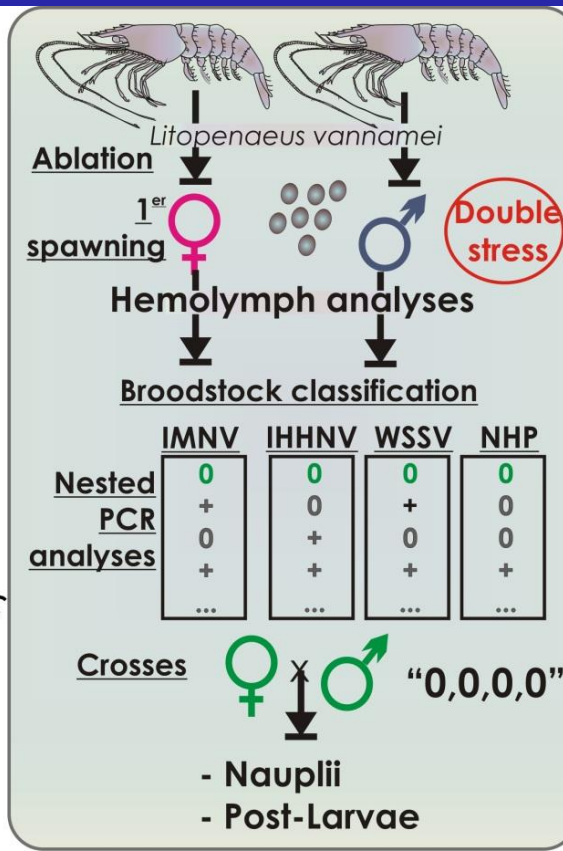
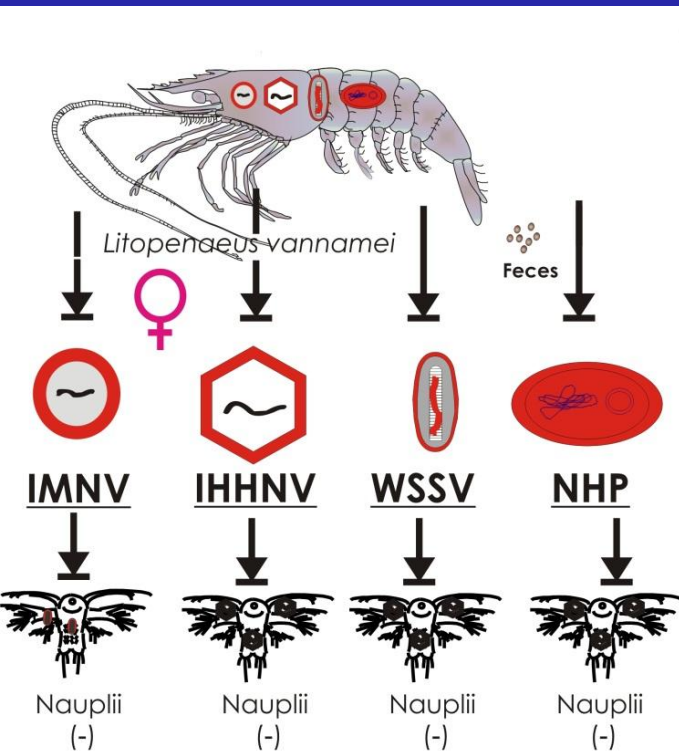
Portadores assintomáticos



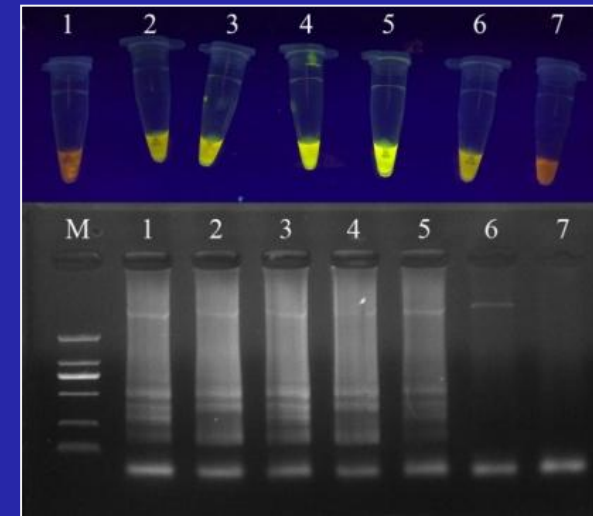
Marcação com anel



Extração de hemolinfa

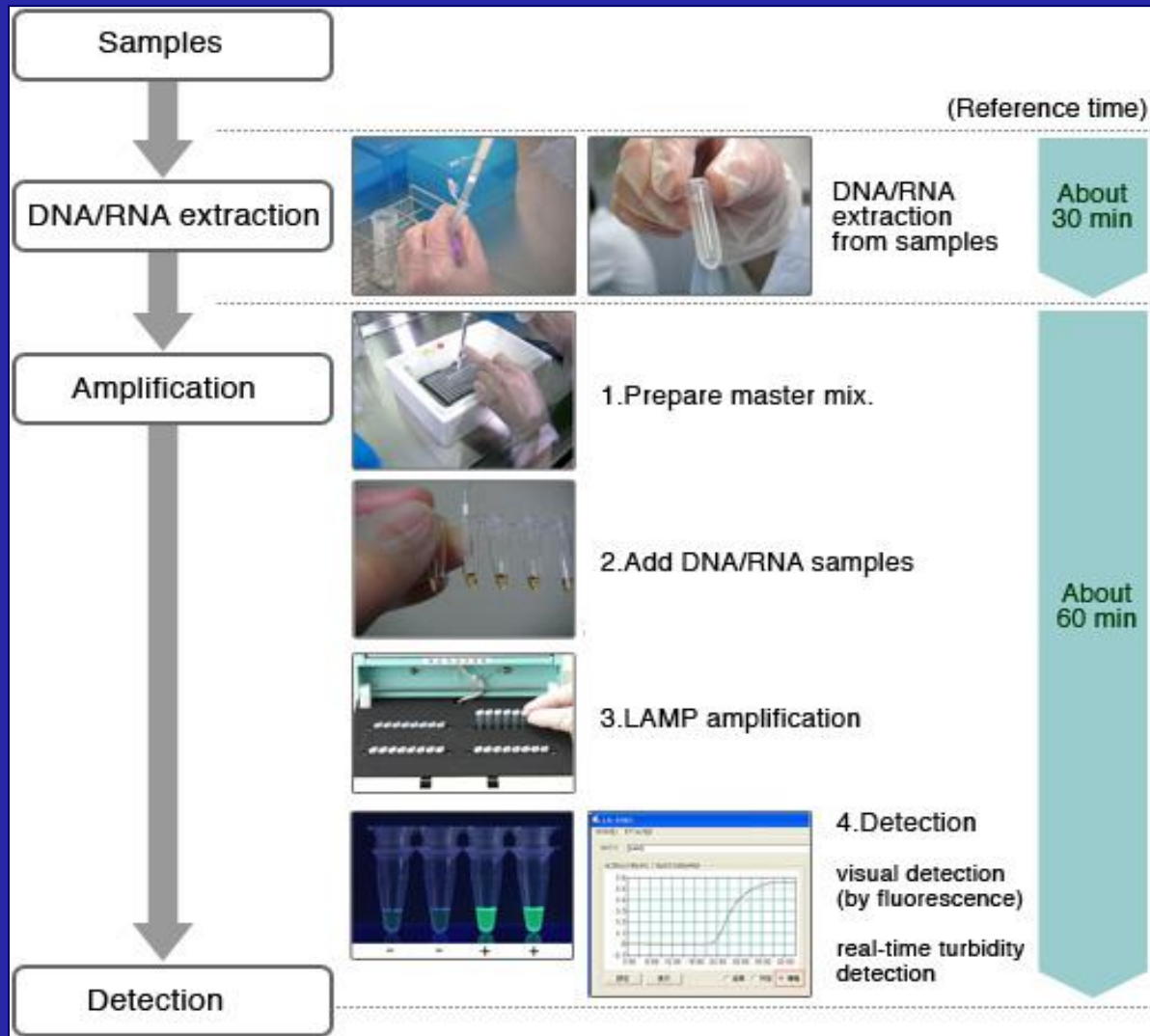


Resultados análises LAMP



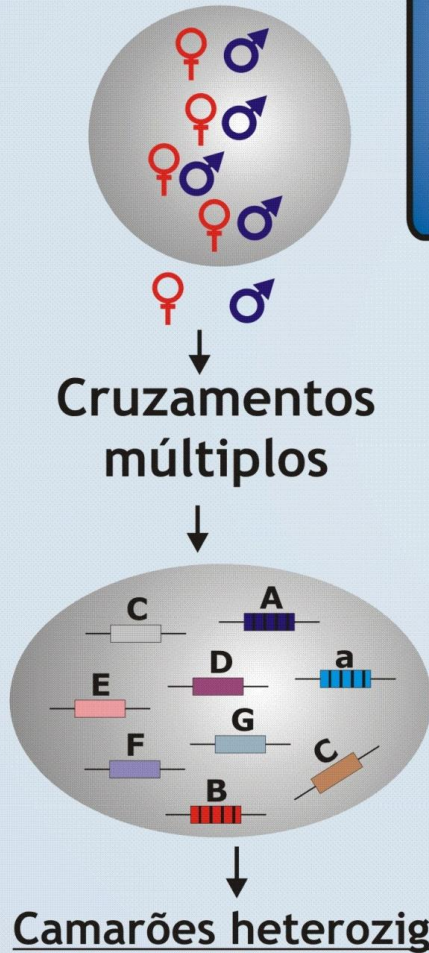
Diagnóstico molecular

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)



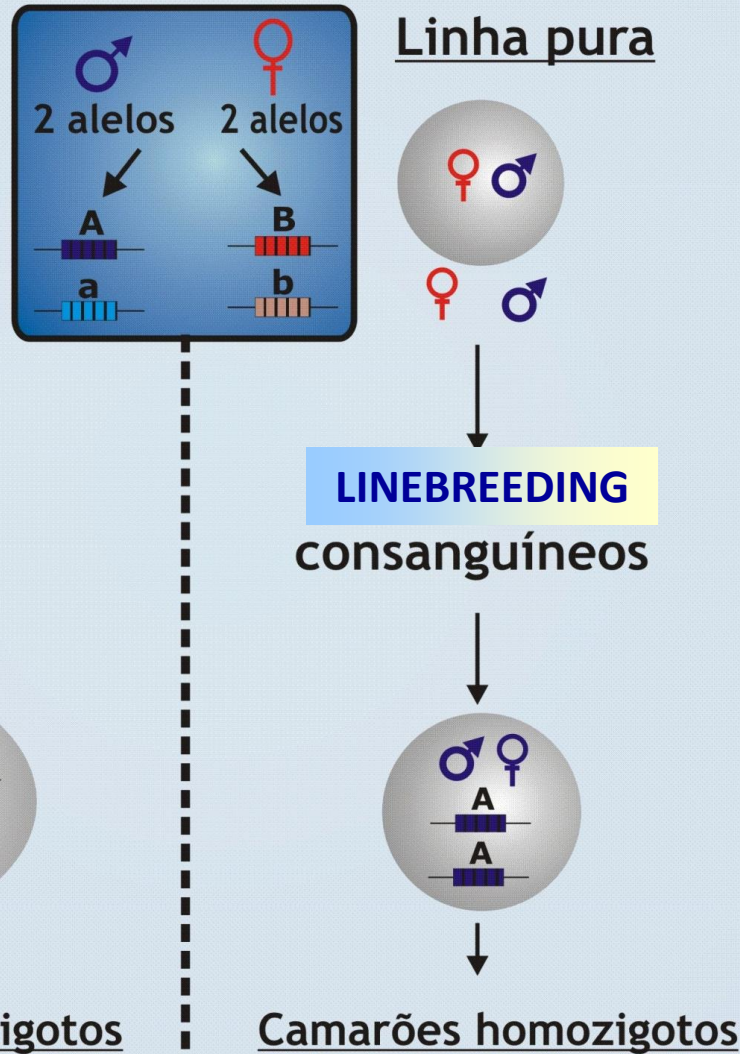
Famílias e Linhas Puras: manejo do Inbreeding

Seleção masal



Característica não estabilizada

Linha pura



Característica estabilizada



Inseminação artificial



32 Tanques de 1000 L
Larvicultura individual

Manejo de datos / Software específico

Hembra	Tp	Ie H M	Cat (Ie)	G	LP	Estad.	Diagnóst. NI BI NH WS	Selec	Ranking Grupo LP	Peso	Talla	CreS (tr-60d)	Fecha cuarent.	Fecha ingreso	Fecha abla.	Sem. #	Cruc. #	Des. #	Des. (Prom)	Des. Sem.
149 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	1 1	70,00		1,849	25/03/2008	25/03/2008	03/04/2008	0,00	0	0	0,00	
241 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	3 2	60,00		1,574	25/03/2008	31/03/2008	03/04/2008	0,00	0	0	0,00	
453 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	5 3											
75 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	7 4											
499 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	11 5											
452 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	11 5											
886 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	11 5											
608 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	13 6											
695 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	15 7											
1253 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	17 8											
87 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	17 8											
1187 AM LP 209-09	R	EM	3	3	0	V	- - -	<input checked="" type="checkbox"/>	19 9											

Linhares		#	42	#	LP	0	Total	42	Total	42
(0,0)	%	#	100,00	#	Ie	42	Promedio	0,00	Promedio	4
(0,0,0)	%	#	100,00	#	H	0				
(0,0,0,0)	%	#	0,00	#	M	0				
							Mín.	1	1	2
							Máx.	74	25	7




Programa de Mejoramiento genético del Camarón *Litopenaeus vannamei*

Consulta Edición

Líneas puras

Hembras

Machos

Masales

Híbridos

Producción

Creación

Nueva LP

Nueva Hembra

Nuevo Macho

Nueva Masal

Nuevo Híbrido

Resultados

Panel de Búsqueda

Promedios

Usuário: potipora

Resistencia ao IMNV e fatores de estresse

Seleção Resistência ao IMNV: Pressão de Seleção



62 Tanques de infecção



Pós infecção / sintomas

Pressão de seleção Artificial



Alta Concentração:
10 bilhões vírus/mL

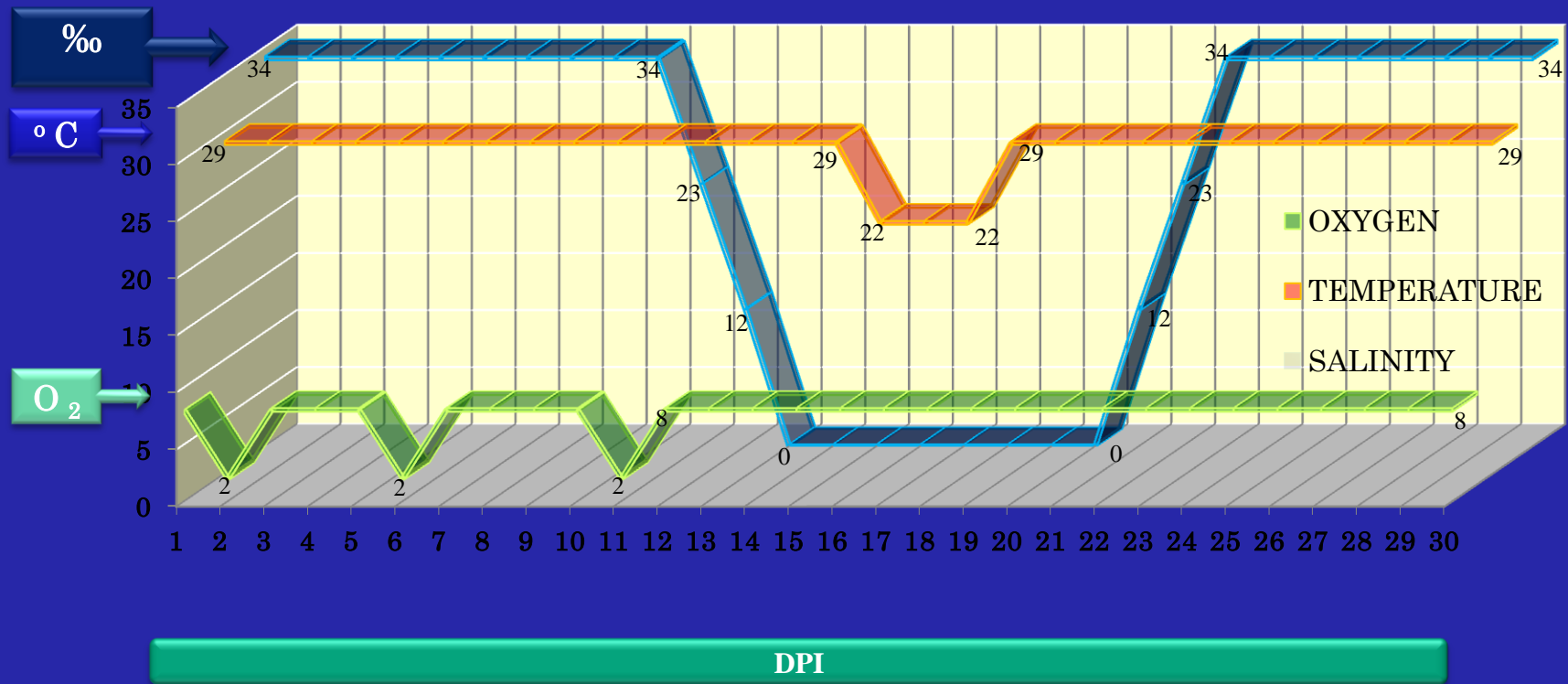


Vírus clarificado



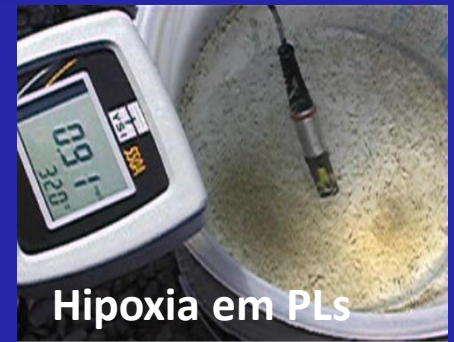
Camaroos sintomáticos

Seleção para resistência combinada ao vírus IMNV e fatores de stress



Alta pressão
de seleção

Infecção IMNV
Stress baixa salinidade
Stress baixa temperatura
Hipoxia
Alta densidade

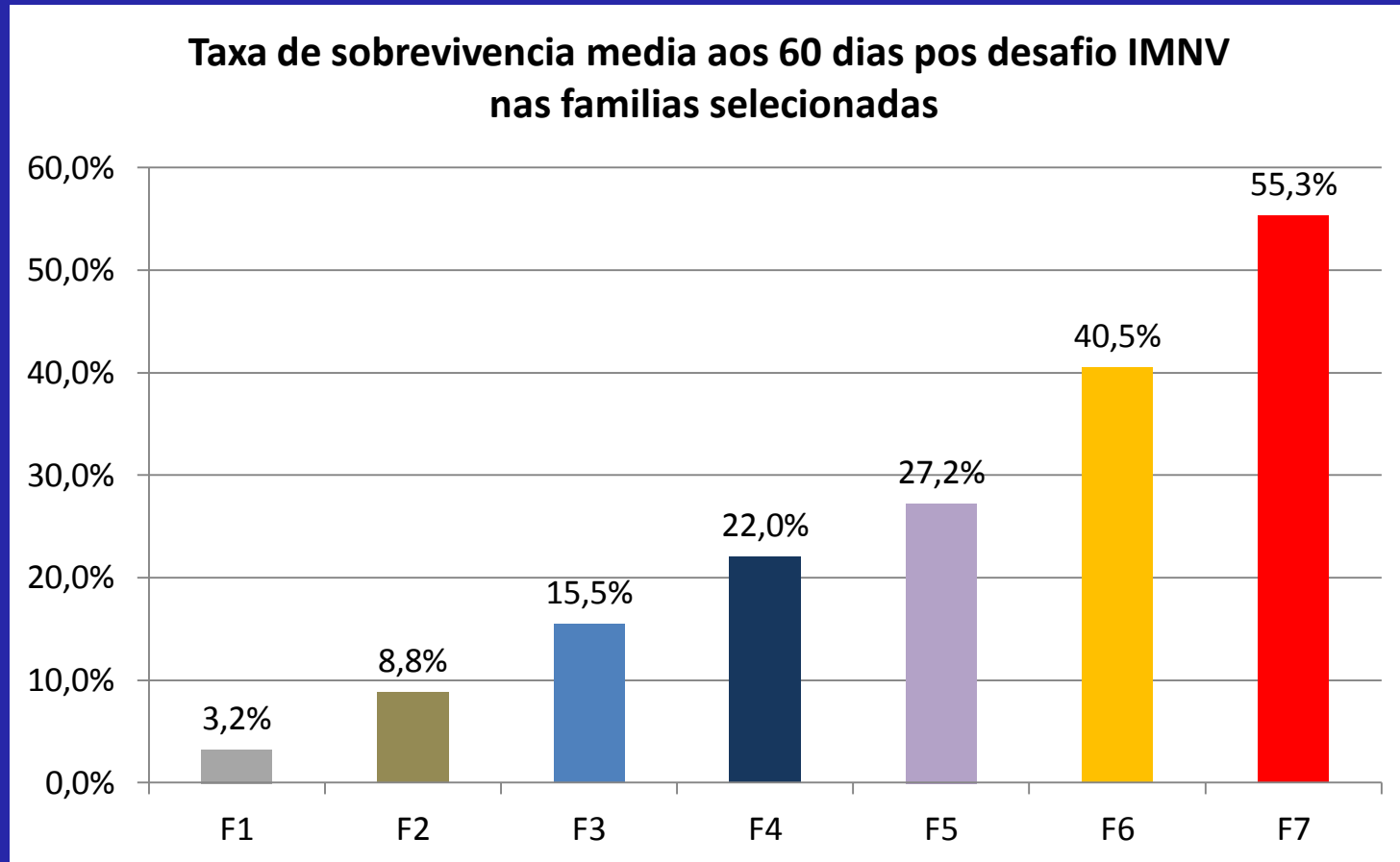


Seleção familiar / Gerações

População inicial F0: 120 milhões de pós larvas

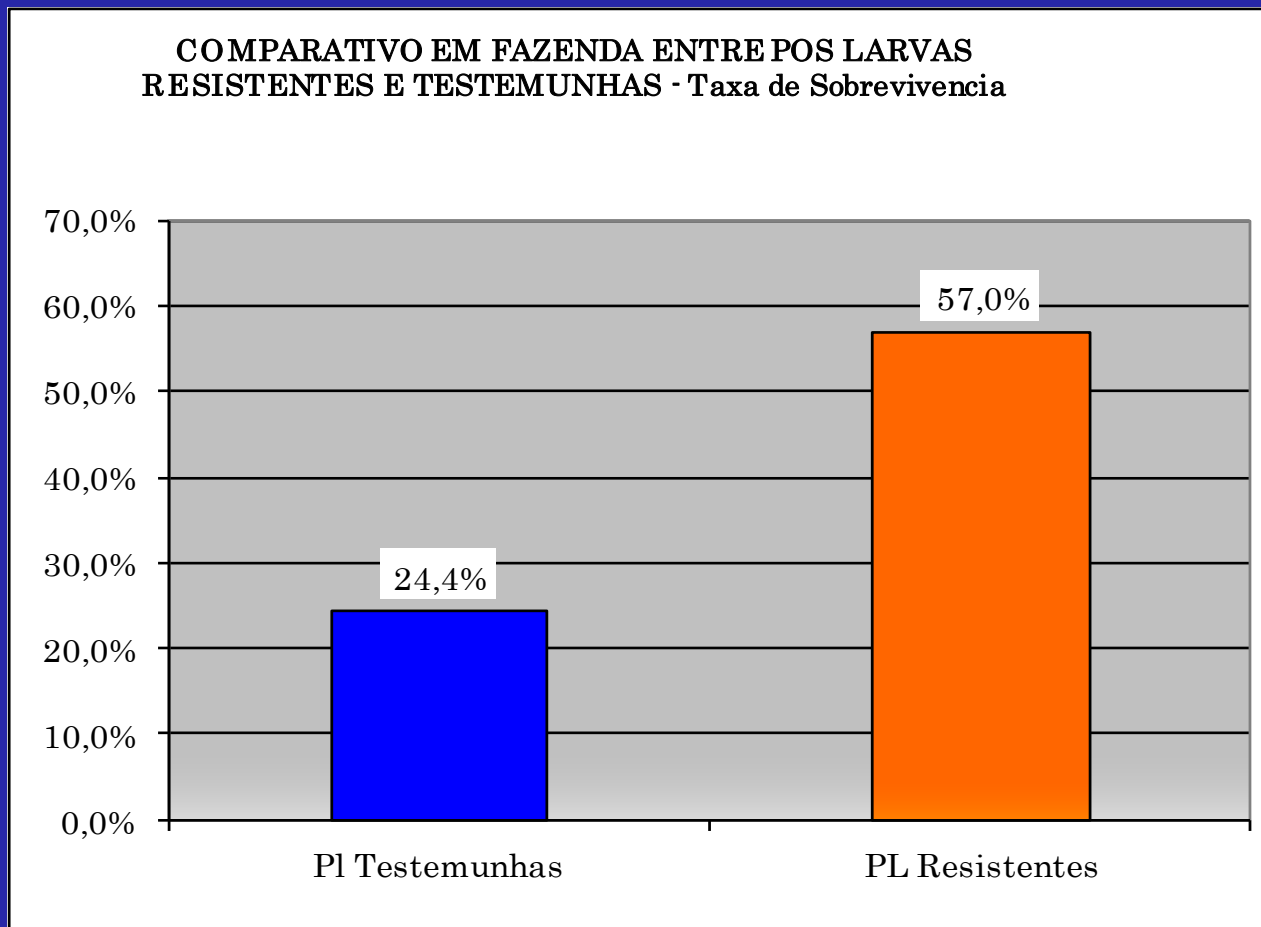
Geração	Total Famílias	Famílias Selec.	Coef. Seleção	Sobv. % 60 DPI
F1	129	41	31,8%	3,2%
F2	218	45	20,6%	8,8%
F3	165	32	19,4%	15,5%
F4	220	14	6,4%	22,0%
F5	199	13	6,5%	27,2%
F6	146	13	8,9%	40,5%
F7	147	12	8,1%	55,3%
F8	114			
			0,00005%	X 17,3

Resultados da seleção para a resistência ao IMNV: Aumento da resistência a cada geração



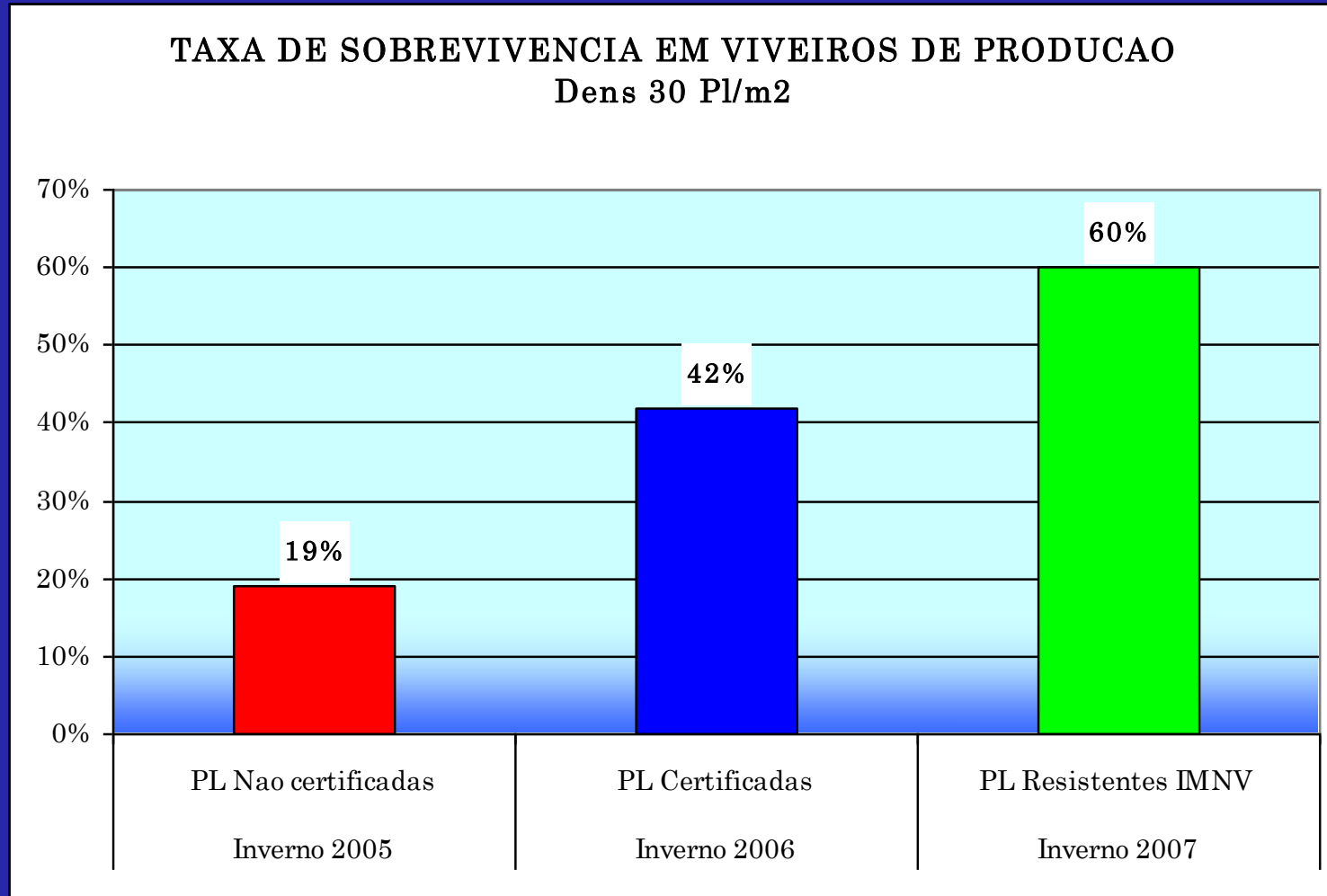
- **Desafio combinado : IMNV e fatores de estresse**
- **Duração : 60 dias**
- **Biomassa final: 2,0 a 2,5 Kilo/m³ (Famílias Elite)**

Sobrevivência comparativa em Fazenda entre PLs selecionadas e PLs sensíveis (2007)



14 VE PL Sensíveis vs 26 VE POTIPORÃ
Dens. 30 Pls/m²
Povoamento no inverno 2007 (Abril)

Recuperação da Produção na Fazenda QGA com Pós Larvas Resistentes IMNV e certificadas



Crescimento

Marcação de famílias para avaliação comparativa do crescimento



Marcação de sobreviventes com elastômeros

Unidade de levantamento de reprodutores

- 15 Tanques de cultivo intensivo
- 15 Viveiros de 0,3 ha semi intensivos

Seleção:

- Inter familiar
- Individual intra familiar

Avaliação comparativa do crescimento e sobrevivência Entre famílias - (PLs / F6 infectadas IMNV)

Familia	Estoc	Peso	Peso	Cresc	%
#	#	Estoc	Final	Sem	Sobv.
1012	250	1,0	13,4	1,45	98,0%
1007	250	3,0	13,1	1,18	74,8%
1013	250	2,5	13,1	1,24	80,0%
1014	250	2,0	14,0	1,40	86,4%
	1 000	2,13	13,40	1,32	84,8%



Desafio IMNV : 60 dias.
Engorde : 60 dias.

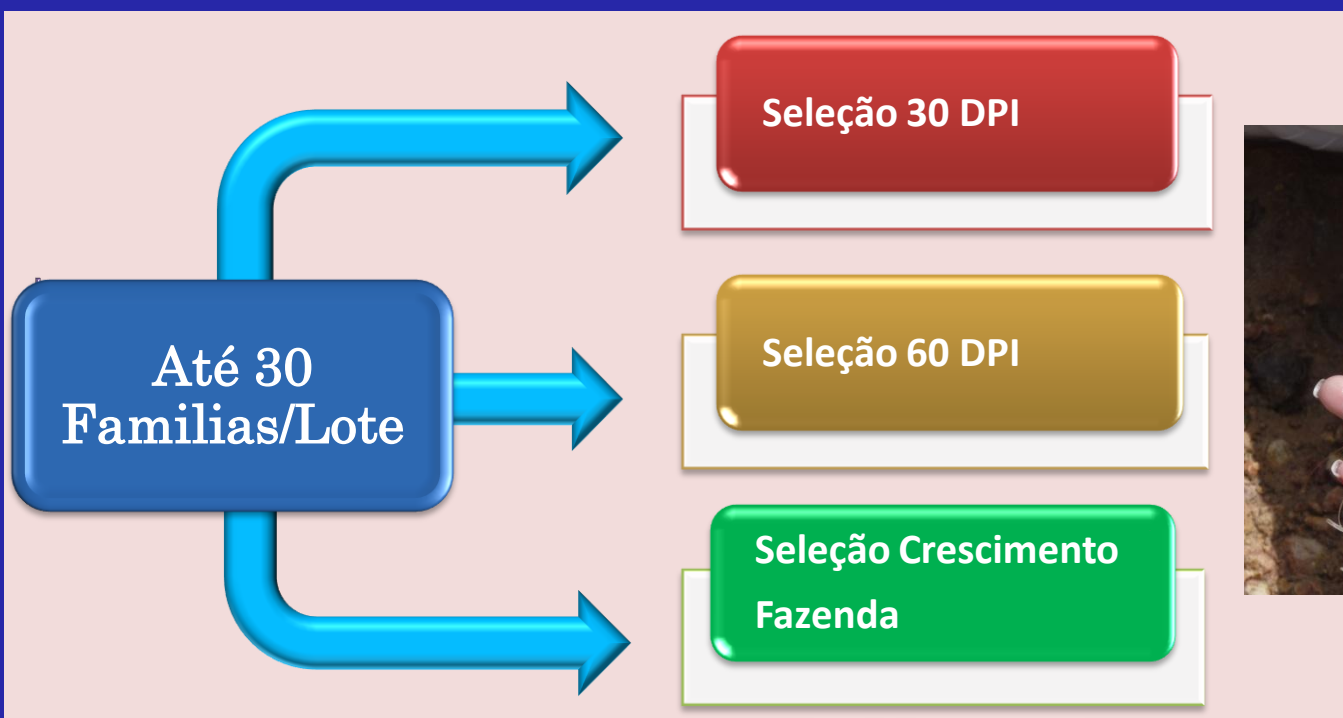
Densidade estocagem: 25.000 PLs/m³
Densidade estocagem: 50 Juvenis/m²

Resultados:

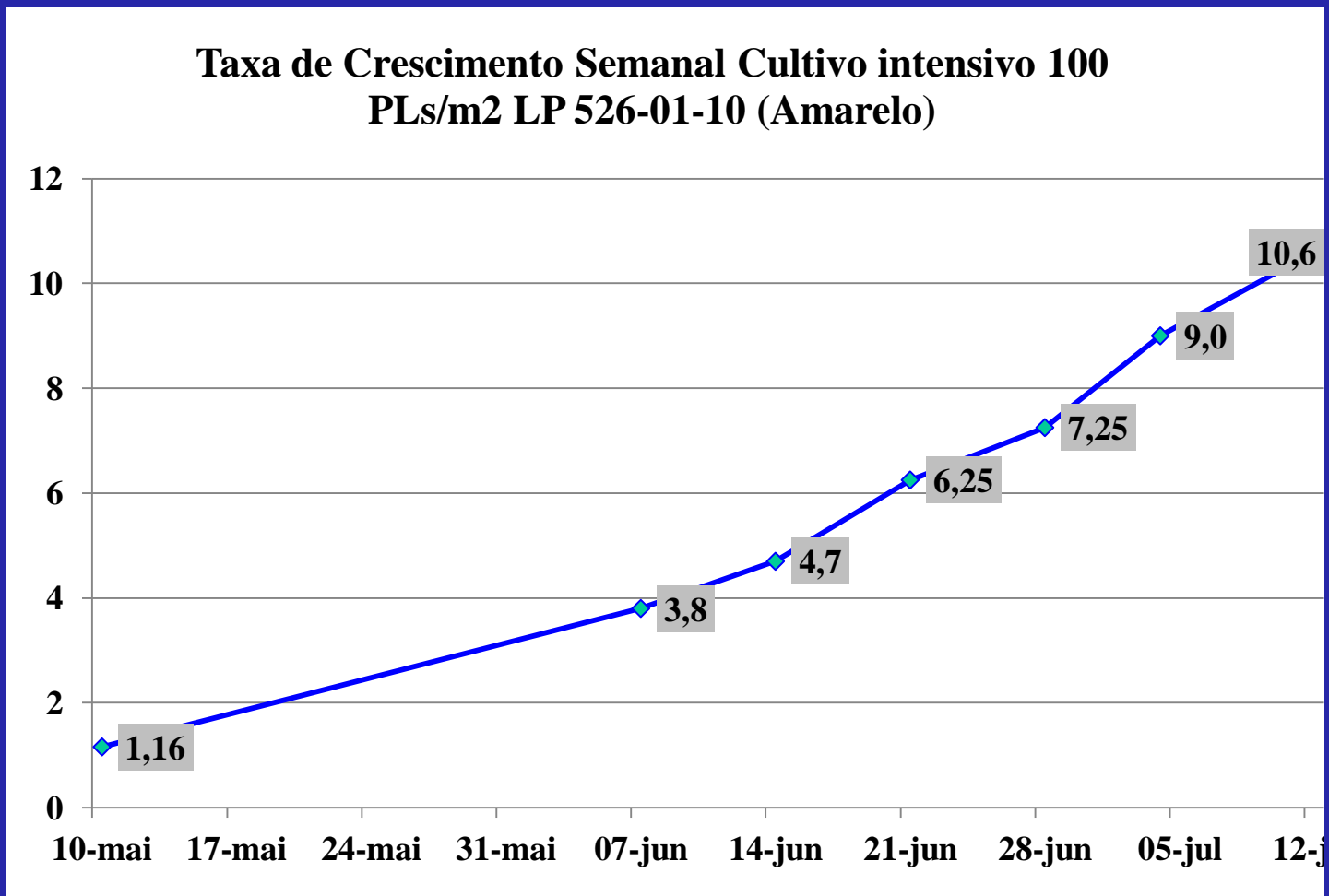
- Crescim medio semanal 1,27 grs/sem (1,45 grs/sem melhor familia)
- Sobv. = 85% (Melhor familia: 98%)

Seleção familiar: Melhoramento simultaneo: Resistencia e Crescimento

Geração Famílias Elite	Sobv. IMNV a 60 DPI	Taxa cresc. (Gr / semana)
F6 « Elite »	40,5% (+48%)	1,96 (+14%)
F5 « Elite »	27,2% (+22%)	1,72 (+12%)
F4 « Elite »	22,0%	1,53



Teste de Crescimento a alta densidade



Precria: 1 mes. Densidade 1000 PLs/m2

Engorde: 63 dias. Densidade: 100 Pls/m2

➤ Taxa crescimento semanal : 1,05 grs/sem (1,5 grs/sem 4 ultimas semanas)

➤ Taxa Sobv : 75%

➤ Taxa crescimento semanal a baixa dens em Fazenda: 2,41 grs/sem (VM 11)

Perspectivas

Seleção para resistência múltipla ao IMNV e WSSV

Marcadores moleculares de Resistência e Crescimento

WSSV

White Spot Syndrome Virus

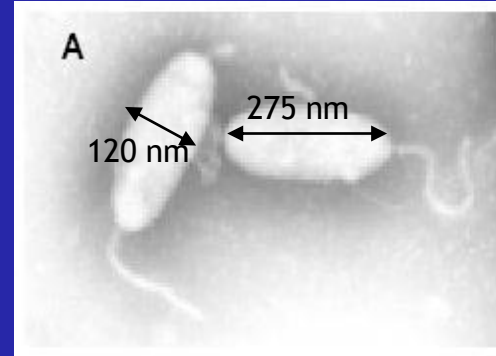
✓ Síntomas

Letargia,
manchas brancas

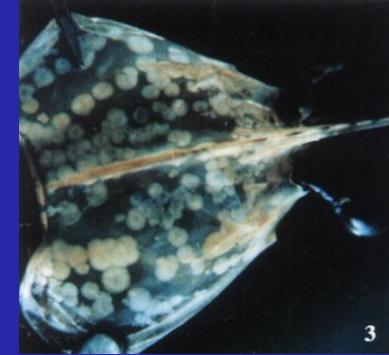
Familia: Nimaviridae

✓ Propriedades biológicas

- Espectro variado de huéspedes
- Amplo tropismo tisular
- Replicación nuclear



Micrografía electrónica: partículas virais



✓ Epidemia / Impacto:

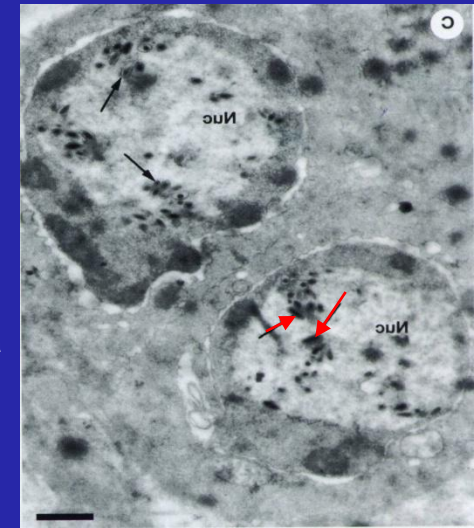
Até 100% de mortalidade

- Santa Catarina desde 2004
- Bahía desde 2008
- PE, PB, RN desde 2011
- Ceará (desde 2005 ?)

Infecção de ovocitos / Larvas = Transmissão vertical



Microscopia
eletrônica
de um
ovocito
infetado
com WSSV



Transmissão Horizontal

Hospedeiros / Vetores- Fazenda

- Caranguejos, copépodos, insetos e outras espécies de camarões nas fazendas (Lo, C.F, 1996).
- Ovos de rotíferos contaminados pelo WSSV podem se manter nos solos dos Viveiros apesar do vazão sanitário. (Yan et al, 2004).
- Microalgas: o fitoplanctão pode ser contaminado pelo WSSV (Jiang, 2011)



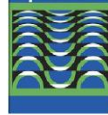
Impossibilidade da erradicação no meio ambiente em sistemas semi intensivos

Demonstração da Resistência ao WSSV



Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online



Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program

Jorge Cuéllar-Anjel ^{a,*}, Brenda White-Noble ^b, Paul Schofield ^b, Roberto Chamorro ^a, Donald V. Lightner ^b



Three *Penaeus vannamei* F8, F9 and F12 generation families were challenged per os with *White spot syndrome virus* (WSSV) at the University of Arizona Aquaculture Pathology laboratory (UAZ). These families were developed by the Panamanian shrimp company Camaronera de Coclé, S.A. (CAMACO) from founder stocks which were survivors of white spot disease a decade ago.

“Survival in the Kona line WSSV positive control was 0% as all the Kona line shrimp had died by day 6 post infection. At termination, survival in the CAMACO WSSV challenged groups was 23%, 57% and 26% for families LP-1, LP-2 and LP-3,”

WSSV challenges performed at UAZ during using *P. vannamei* during the period of 1996 to 2010 resulted in an overall survival rate of ~5% with a low of 0% and a high of 25%. A total of 176 families were challenged during this period with most WSSV challenges resulting in no survival

SYNTHESIS OF 10 YEARS OF A *Litopenaeus vannamei* BREEDING PROGRAM AT THE SHRIMP FARM CAMARONERA DE COCLE S.A. IN PANAMA Roberto Chamorro. WAS, Natal, 2011

In 2001, the companies **CAMACO** (Panama) and **CONCEPTO AZUL** (Ecuador) began a program for the prevention of illnesses and genetic improvement of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*.The resistance in front of the virus WSSV of the strains of shrimp from CAMACO, has allowed us to **increase in ten generations, the average rates of survival in several Panamanian shrimp farms from 5% (2000) to 75% (2010)**



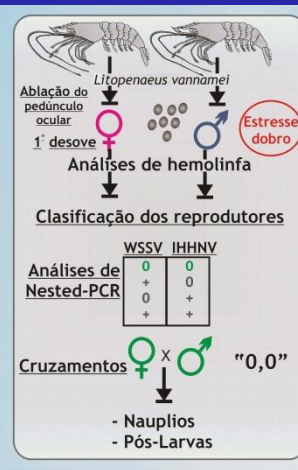
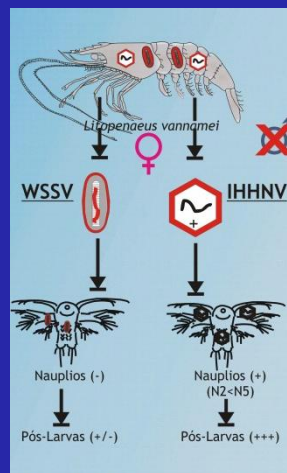
Prevenção de doenças Melhoramento Genético



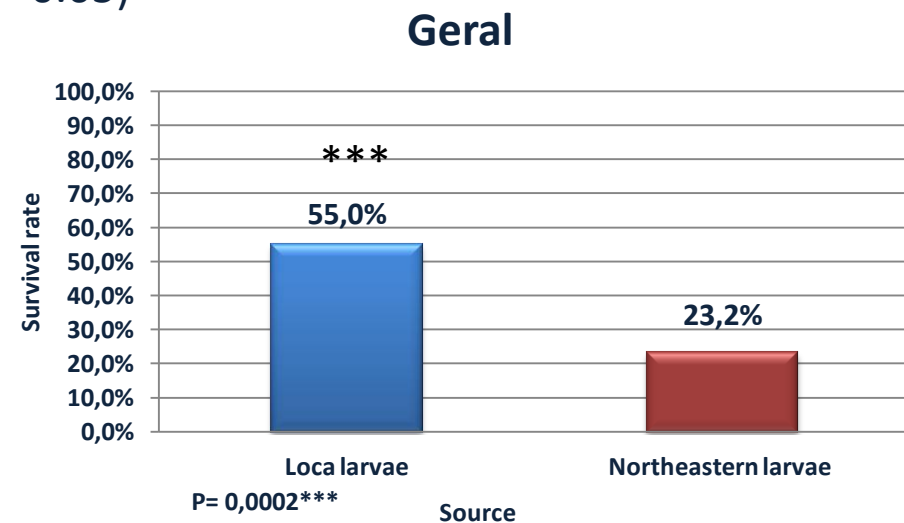
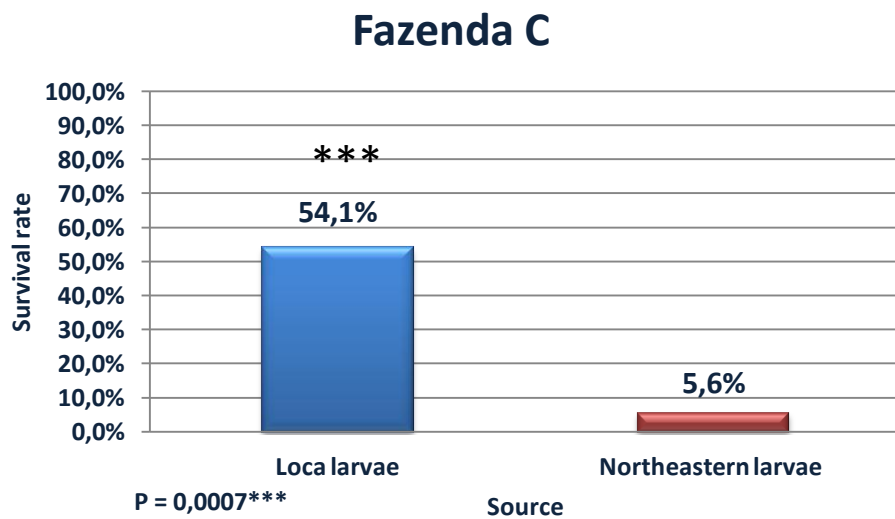
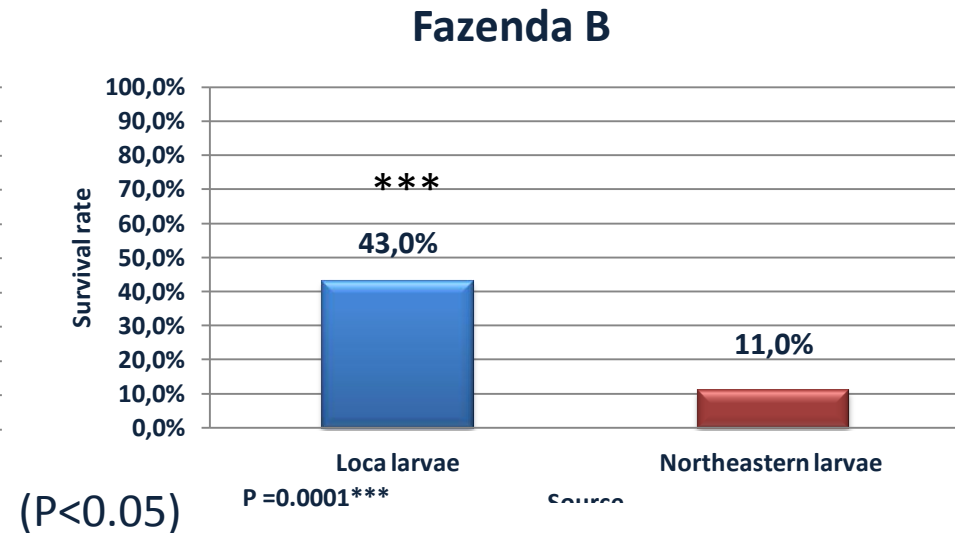
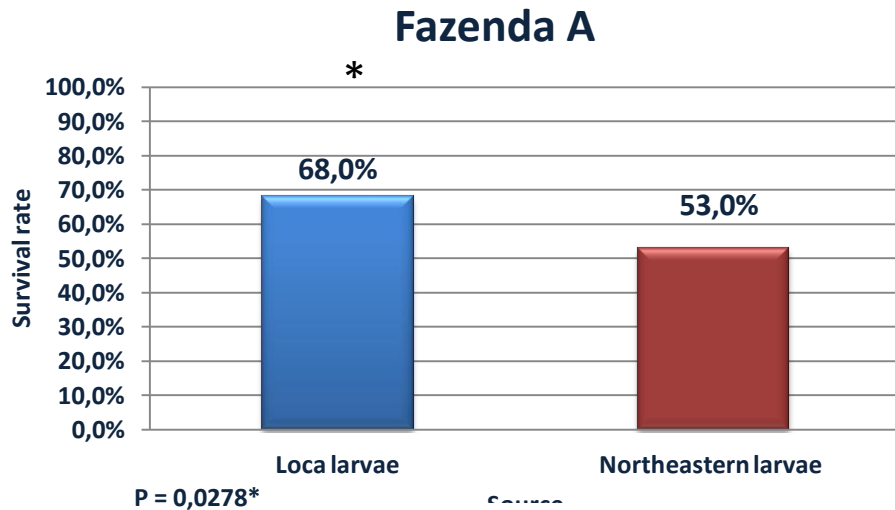
Santa Catarina, 2007 a 2011

Critérios da Seleção:

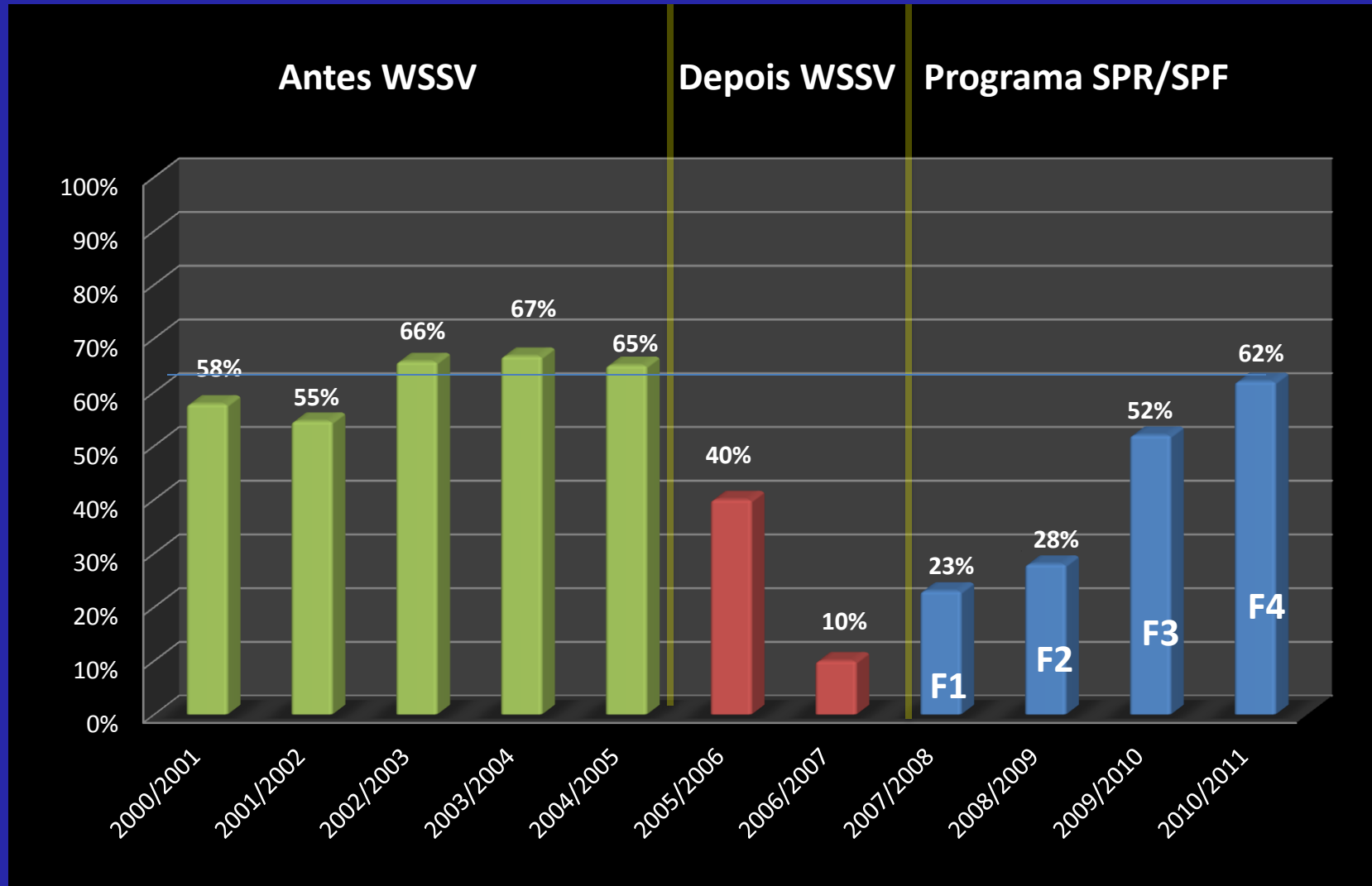
- Resistência ao WSSV: 5 gerações sobreviventes a infecção WSSV natural
- Resistência a hipóxia em bio-ensaios
- Crescimento em viveiros (condições verão e inverno)
- Certificação sanitária dos reprodutores e Pós Larvas



Resultados comparativos em Fazendas de Santa Catarina 2011: PLs selecionadas “Resistentes” WSSV vs PLs do Nordeste

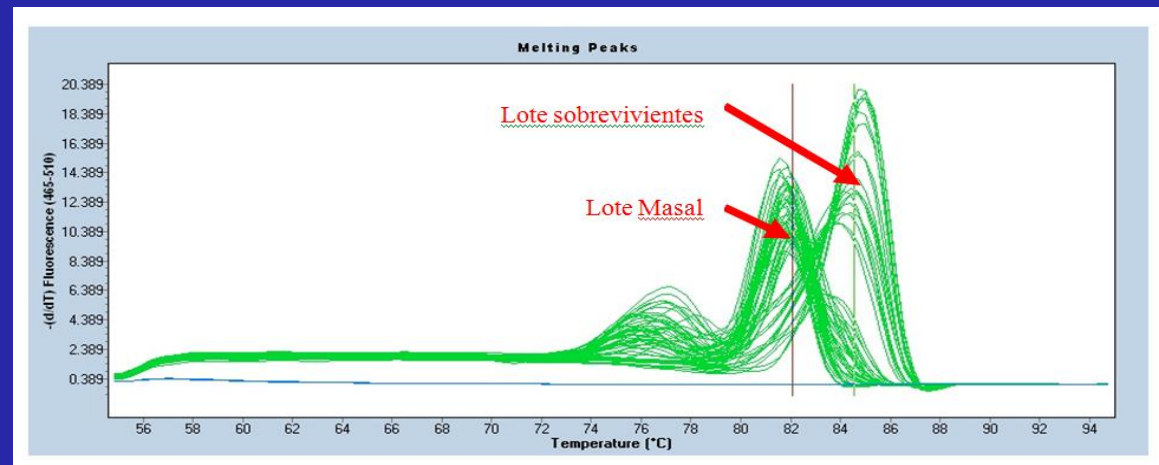


Evolução da sobrevivência em Fazendas no Estado de SC

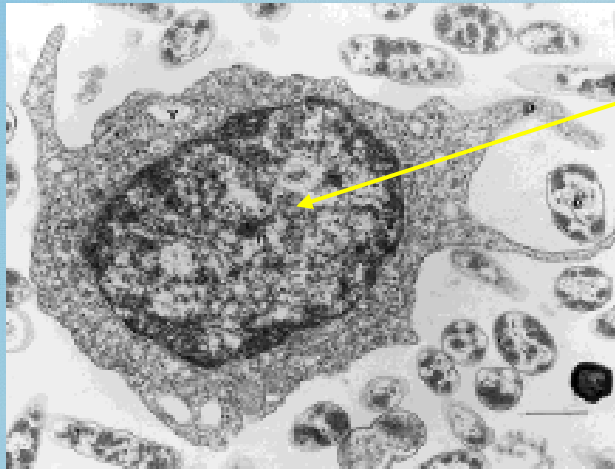


Estratégia para a seleção Resistência ao WSSV e IMNV No Nordeste do Brasil em áreas contaminadas

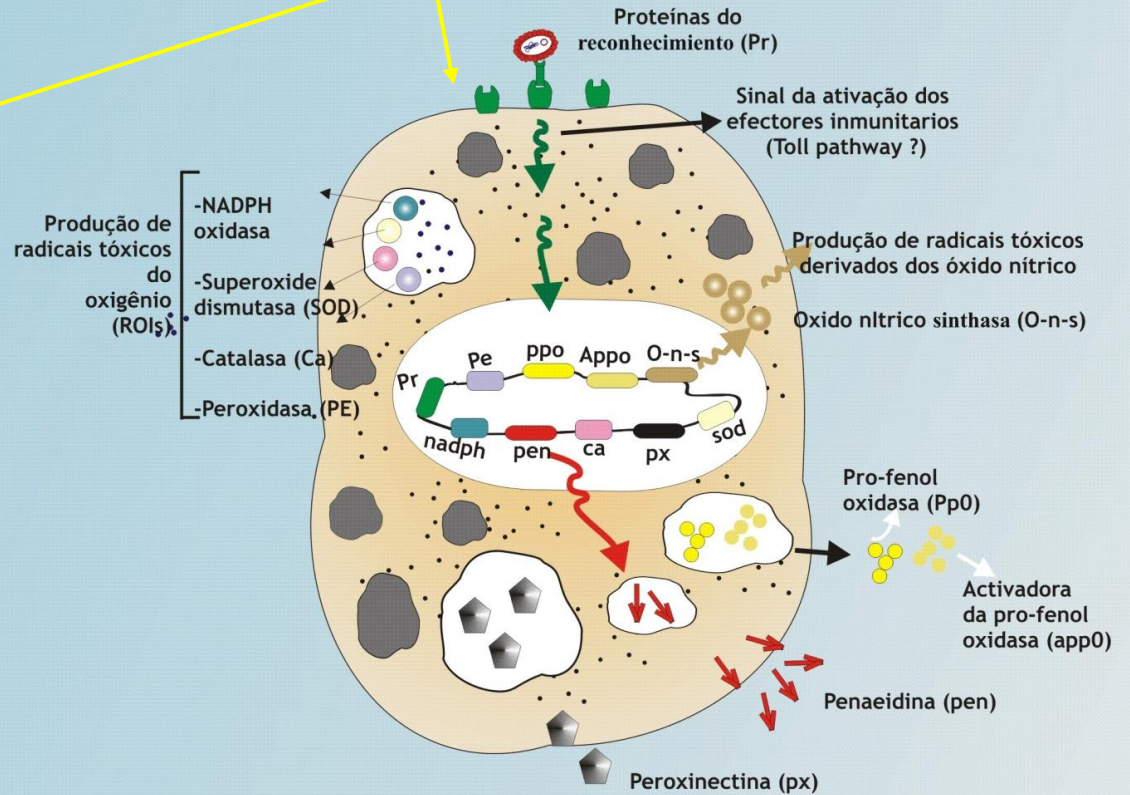
- 1) Implantar os desafios experimentais duplos IMNV/WSSV.
- 2) Avaliar os diferentes cruzamentos entre famílias frente ao desafio experimental WSSV e IMNV e em condições de produção comercial
- 3) Selecionar e levantar as futuras famílias após duplo desafio IMNV e WSSV
- 4) Identificar os genes envolvidos na resistência aos dois vírus



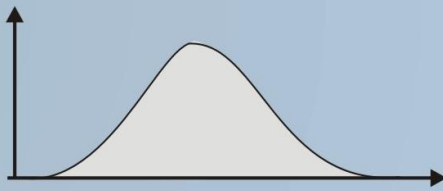
Bases moleculares da Resistência



Célula imune



Caracteres quantitativos

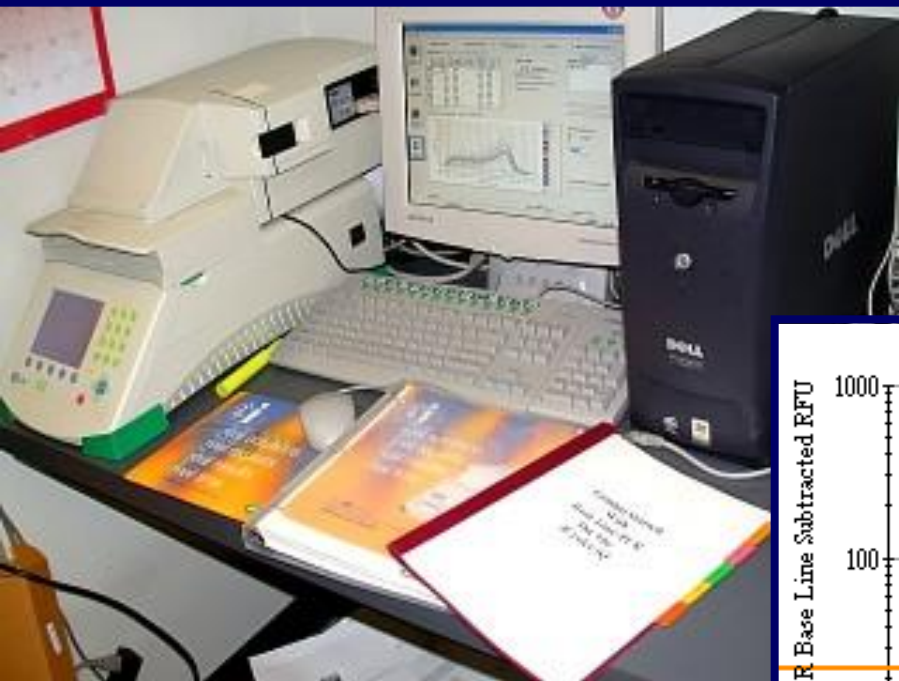


- Medíveis
- Variação continuada
- Influenciado pelo ambiente
- Regulado por muitos genes

Diferenças no nível da expressão

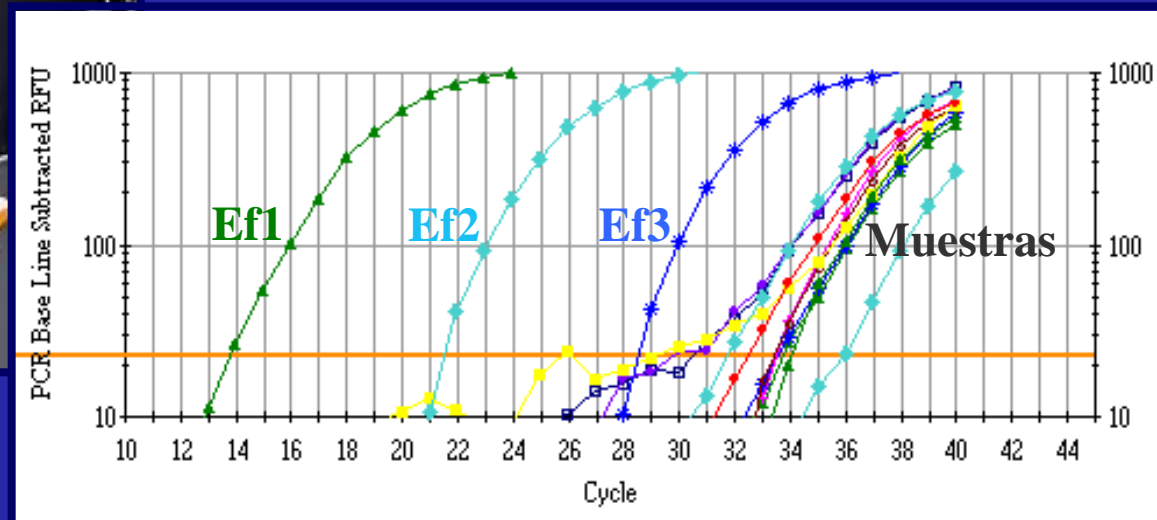


GAS : Gene Assisted Selection



Real-Time PCR

Quantificação precisa do nível de expressão dos genes imunitários

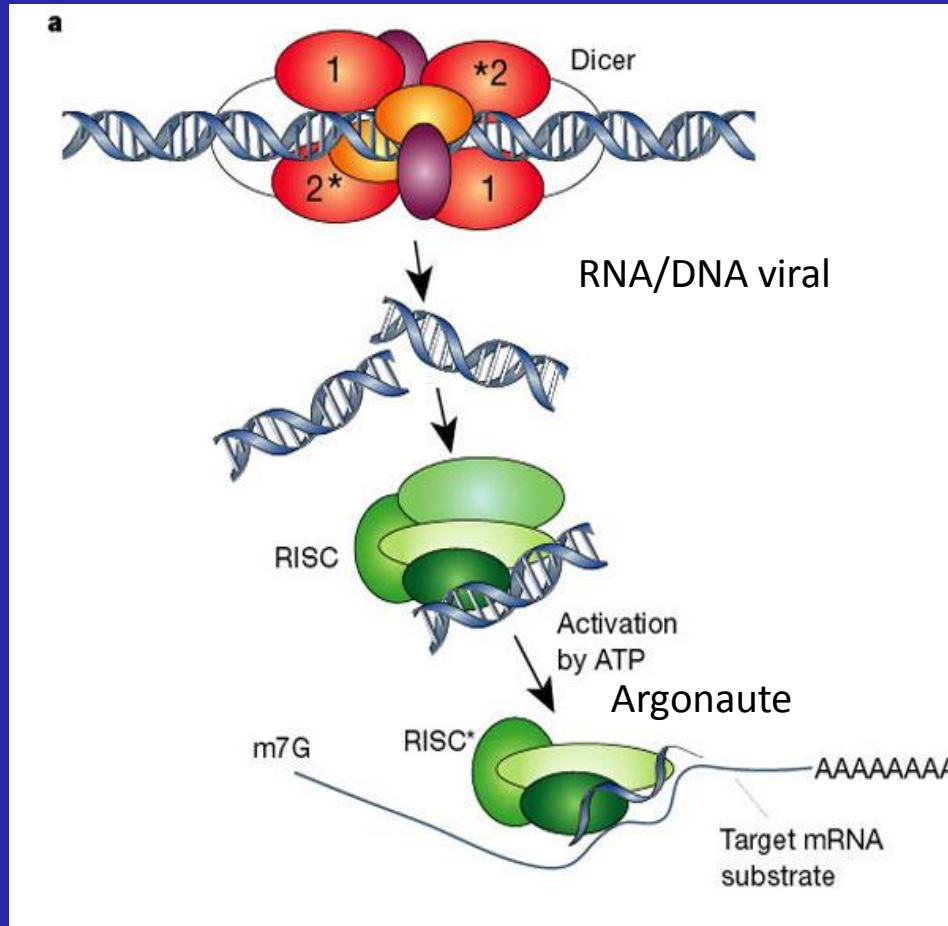


Identificação dos genes envolvidos na resistência aos vírus e fatores de stress de linhas puras e famílias

➔ Seleção assistida por marcadores imunitários

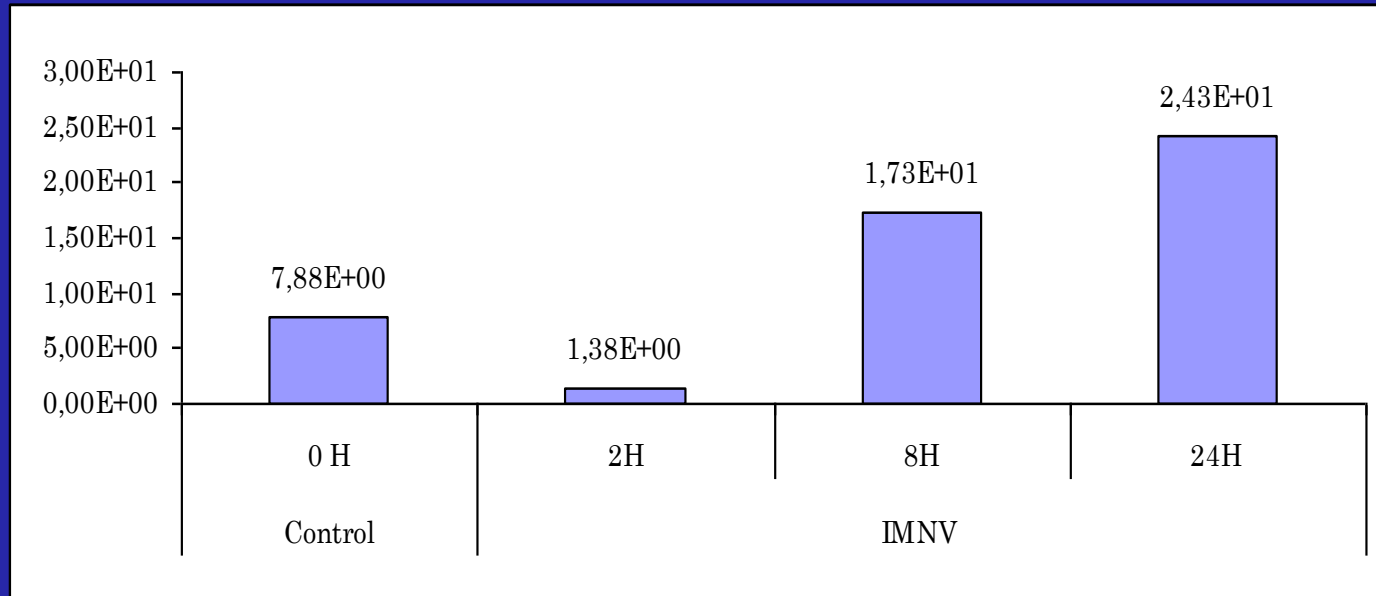
Resposta anti-viral: Sistema RNA interferência

O sistema de RNA interferência exerce uma ampla atividade anti-viral e afeta tanto os vírus DNA como RNA em *Drosophila* (Jules A. Hoffmann, 2013 prêmio Nobel em Imunologia 2012).

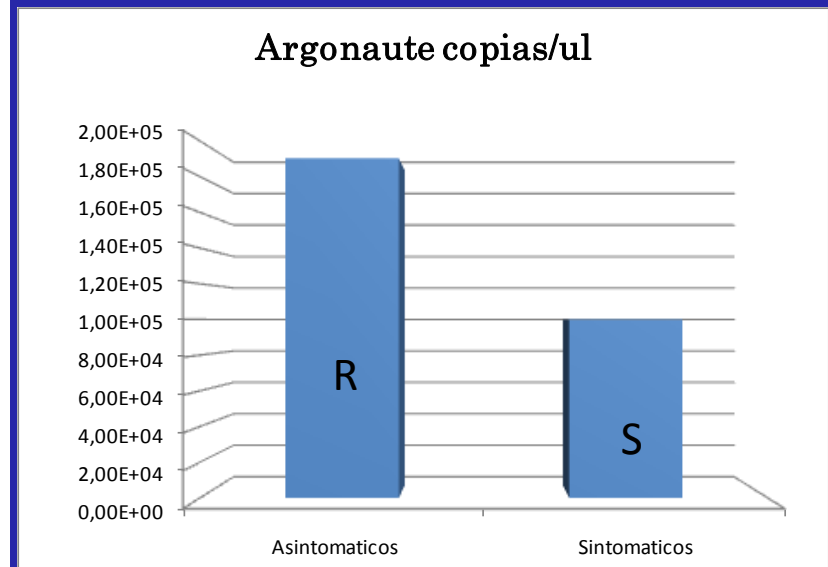
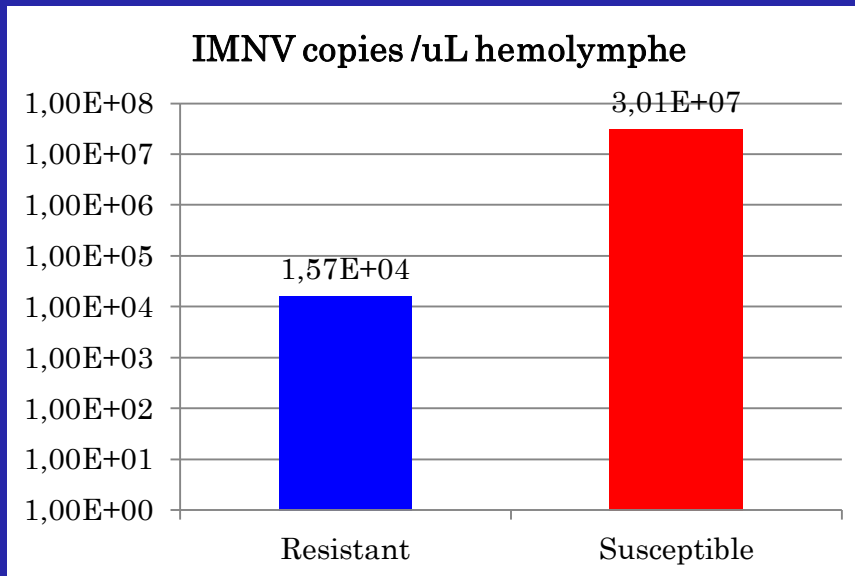


Kemp C, Mueller S, Goto A, Barbier V, Paro S, Bonnay F, Dostert C, Troxler L, Hetru C, Meignin C, Pfeffer S, Hoffmann JA, and Imler JL. 2013. **Broad RNA interference-mediated antiviral immunity and virus-specific inducible responses in *Drosophila*.** *J Immunol.* 190 (2): 650-658.

Quantificação da expressão dos genes DICER e ARGONAUTE

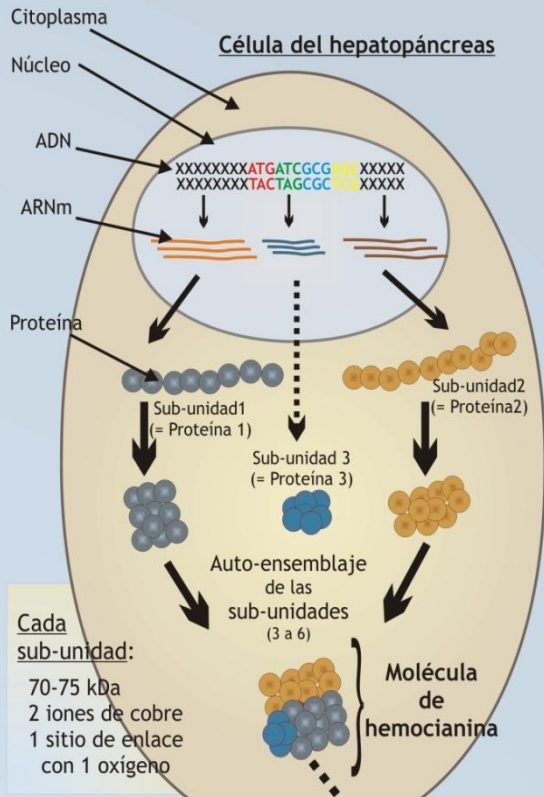


Indução do gene ARGONAUTE após infecção pelo IMNV



Expressão do gene ARGONAUTE em camarões Resistentes e sensíveis

Hemocianina e Resistencia ao WSSV



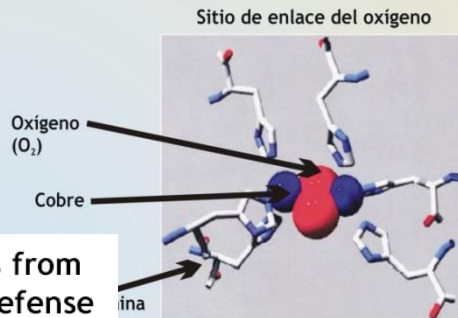
Hemocianina

Proteína

- 3500-4500 Kda
- Contiene iones de cobre capaces de unirse con oxígeno

2 Funciones

- Transportadora de oxígeno
=> Adaptación a la anoxia (Deficiencia en oxígeno)
- Actividad de fenoloxidasa
=> Respuesta inmune



In order to find the immune-relevant factors responsible for the virus resistance in the WSSV-resistant shrimp, a suppression subtractive hybridization method was employed to identify differentially expressed genes and their expression profile in the hepatopancreas of the virus-resistant penaeid shrimp. Thirty five genes were identified from more than 400 clones, of which eight are found for the first time in penaeid shrimp. bGBP is the most abundant gene in our subtractive library except hemocyanin. (Xun Xu et al, 2004)

Penaeid hemocyanin have non-specific antiviral properties and no cytotoxicity against fish cells infected by iridovirus (Zhang *et al.*, 2004).

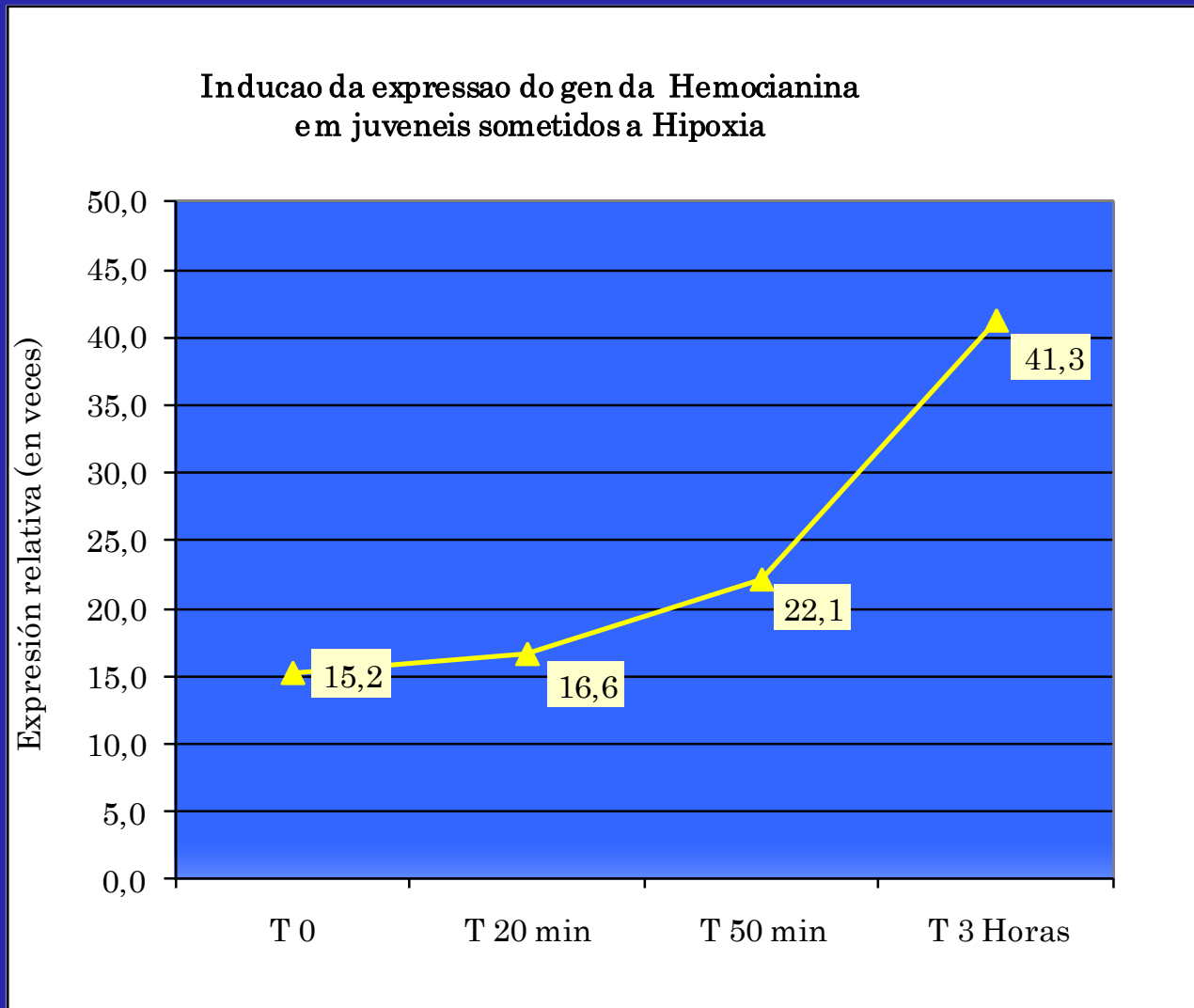
Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense

Kaiyu Lei^{a,b}, Fang Li^{a,b}, Mingchang Zhang^{a,b}, Haijie Yang^c, Tian Luo^b, Xun Xu^{b,*}

Funções antivirais da Hemocianina

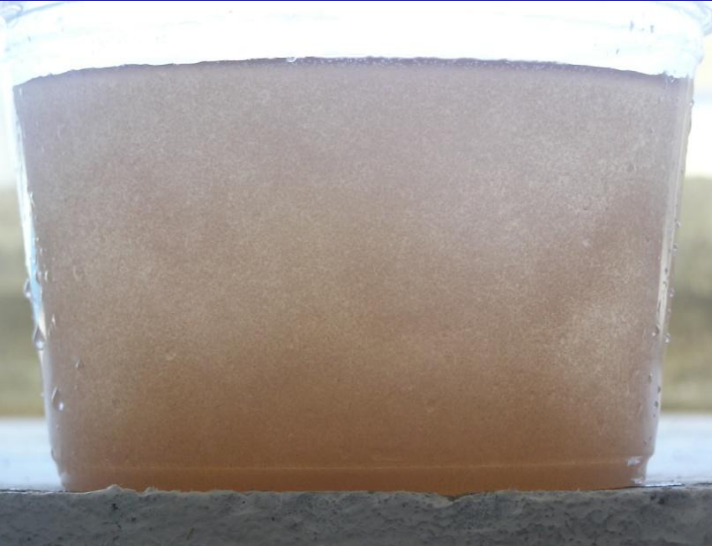
1. Se adere ao vírus WSSV
2. Pode retardar a infecção por WSSV
3. Os camarões resistentes a WSSV apresentam elevadas concentrações de hemocianina

Hipóxia induz a expressão da Hemocianina

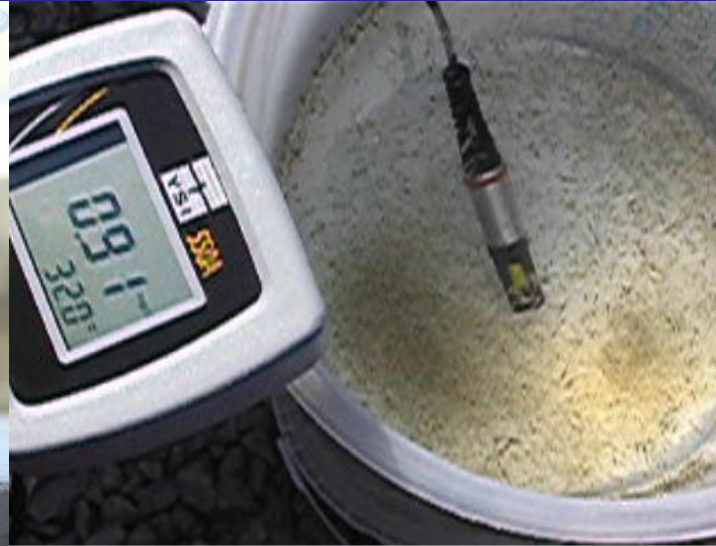


Bio ensaios hipoxia em Pos larvas

Seleção para Resistência a hipoxia



Hipóxia em Náuplios



Hipóxia em Pós larvas



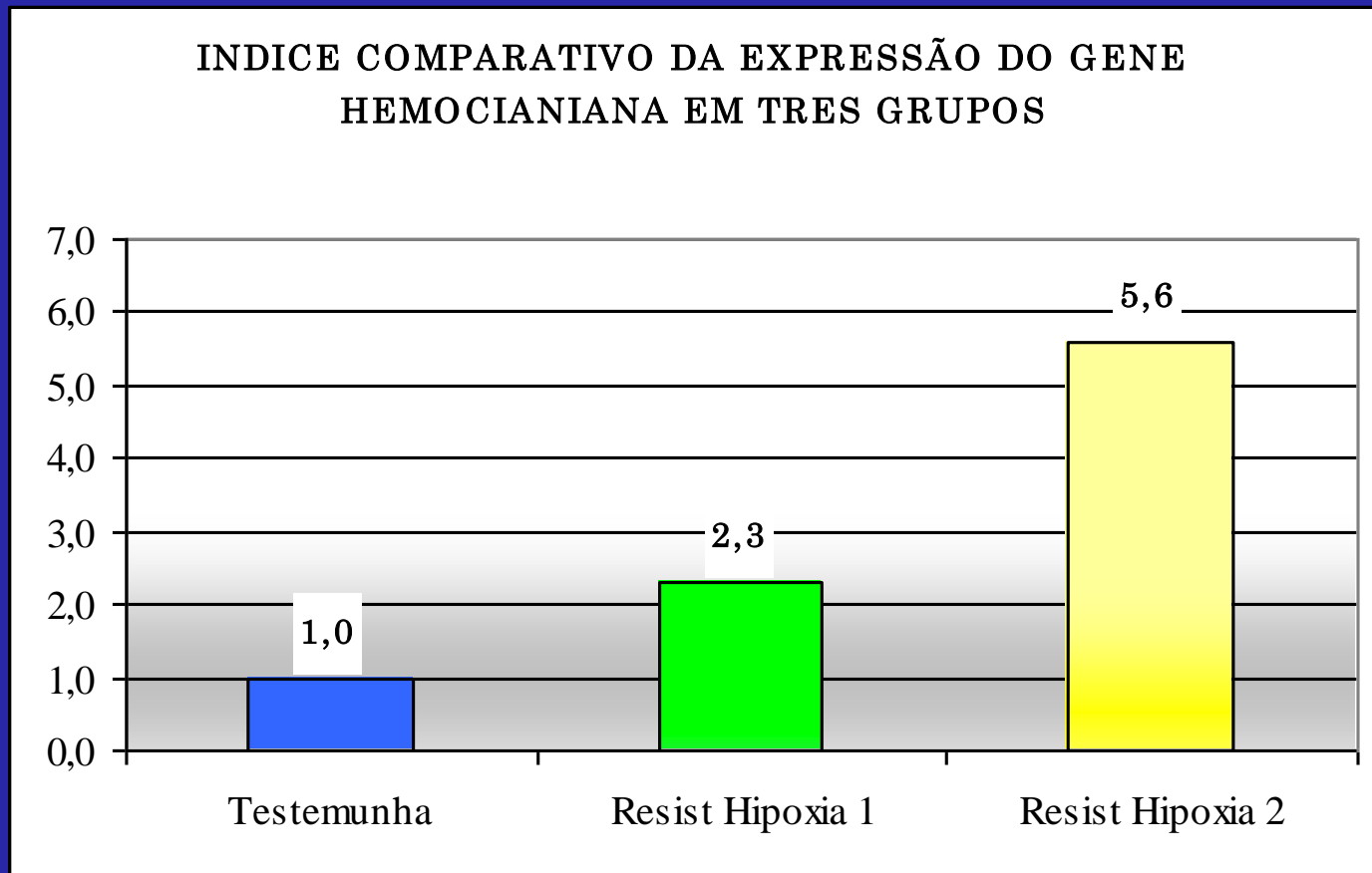
Hipóxia em juvenis infectados IMNV

Hipóxia causa:

- Mortalidade
- Incremento da sensibilidade as doenças
- Redução da taxa de crescimento



Genética, expressão da hemocianina e Resistência a hipoxia

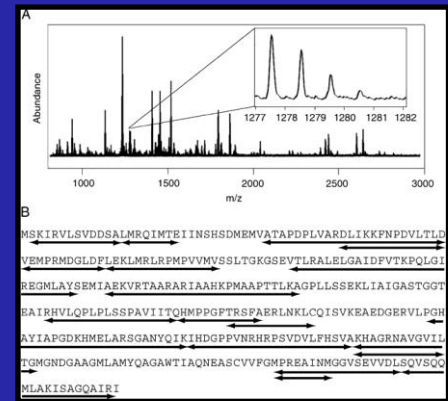


Análise quantitativa da expressão do gene hemocianina por Real Time PCR em diferentes gerações selecionadas por resistência a Hipóxia

Proteômica para a Prevenção de doenças e Melhoramento Genético

MALDI-TOF/TOF

- Detecção rápida e sensível de agentes patogênicos
 - Capacidade: 384 amostras/hora
 - Detecção simultânea de múltiplos patógenos
 - Maior sensibilidade
- Detecção e quantificação de proteínas imunitárias
- Desenvolver marcadores de Resistencia e Crescimento
- Nutrigenômica / Nutrigenética



Obrigado !

Gael Leclercq
gael_leclercq@yahoo.com
www.conceptoazul.com.ec