



Minisatélites del virus del síndrome de la mancha blanca (Whispovirus) en México

LUCIO GALAVIZ SILVA*, JOSÉ REYES GONZÁLEZ GALAVIZ*, JOSÉ CUAUHTÉMOC IBARRA GÁMEZ*,
ROBERTO MERCADO HERNÁNDEZ*, ZINNIA J. MOLINA GARZA*

La demanda de camarón ha crecido de manera importante en el mercado mexicano, ya es la tercera especie en volumen, pero la primera en valor a nivel nacional. En 2006 se reportó una producción de camarón cultivado y de captura de 158,453 Tm.¹ Sin embargo, pese a los avances en cuanto a la biotecnología del cultivo, han surgido nuevas enfermedades por las altas densidades poblacionales que se manejan, porque a pesar de ello, ocurren pérdidas devastadoras de hasta 100 % de mortalidad acumulativa de 3 a 10 días, principalmente por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV: White spot syndrome virus).² El WSSV se descubrió, en 1992, debido las epizootias severas ocurridas en China. Éste es un miembro de la familia *Nimaviridae* (género *Whispovirus*), con envoltura, de un enorme tamaño (230-450 x 130-183 nm), con DNA de doble cadena (dsDNA). Los hospederos son una amplia variedad (~40) de especies de crustáceos.³ En México causa serios problemas desde 1999 hasta la actualidad,⁴ provoca pérdidas millonarias en cultivos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de Sonora y Sinaloa, principalmente.

La secuenciación del genoma de tres diferentes aislados de WSSV (WSSV-TH, WSSV-CN y WSSV-TW) de Tailandia, China y Taiwán, respec-

tivamente, muestra que la longitud del dsDNA varía de 293 a 307 Kb^{5,6} (GenBank accession no. AF440570). El genoma codifica 184 marcos de lectura abierta (ORF), de los cuales únicamente a 6% tienen homología con secuencias registradas en las bases de datos, entre los principales destacan cinco proteínas estructurales mayores, y alrededor de 40 proteínas menores,^{5,7,8} según su talla. Adicionalmente, tres ORF (ORF3, ORF89 y CN-ORF366) se considera que actúan como genes de latencia⁹, y el ORF170, se ha demostrado, codifica una proteína anti-apoptosis.¹⁰

Las regiones minisatélites son secuencias de DNA repetidas en tandem (7-100 pares de bases, pb). El análisis de estas secuencias en los microorganismos es de gran ayuda, porque permite determinar la variación genotípica entre las distintas cepas, se usan como marcadores moleculares para la identificación de cepas y determinan los factores de virulencia asociados a su patogenicidad.

Estudios recientes con algunos genomas virales indican la existencia de polimorfismo entre los virus, y han probado su utilidad como marcadores en estudios epidemiológicos y de virulencia.^{11,12} Los reportes anteriores, basados en la homología de secuencias del DNA de diferentes aislados geo-

** Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
Contacto: lgalaviz@fcb.uanl.mx

gráficos de WSSV, sugerían que un solo tipo de virus causaba las mortalidades masivas en los cultivos de camarón. Sin embargo, evidencias recientes indican la presencia de diferentes aislados del virus.^{13,14} De esta forma, el análisis de las regiones repetidas (UR's) en tándem en el genoma del virus WSSV ayudaría a caracterizar las cepas, asociarlo a su virulencia, analizar la dispersión geográfica de cada cepa en particular, e incluso para la detección de crustáceos que actúan como portadores silvestres y el establecimiento oportuno de cercos sanitarios.

Las once regiones minisatelitales del genoma de WSSV son codificantes, sin describirse a la actualidad una proteína similar en otros microorganismos, de acuerdo a los análisis tipo BLAST realizados. En este estudio se analizó el ORF 94, constituido por UR's de 54 pb, con el objeto de conocer la variabilidad de la(s) cepa(s) de WSSV y el posible origen, ya que han causado epizootias en la industria camaronícola de México, lo cual ayudará a conocer su distribución para usarla como herramienta "epidemiológica".

Materiales y métodos

Origen de las muestras

Las muestras de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se colectaron de las granjas de Culiacán, Sinaloa (Patague y Cruz Blanca), de epizootias que causaron mortalidades de 90 a 100% en 2000. En Sonora se seleccionaron tres sitios de muestreo, donde se presentaron mortalidades masivas y de amplia distribución en el ciclo 2005: Acuaproductiva, Gez Acuícola, San Ignacio Río Muerto y Remanentes. Los tejidos infectados de camarones se transportaron en CO₂ sólido, y se conservaron a -70 °C en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental. Para este estudio sólo se analizaron muestras positivas.

Extracción de ácidos nucleicos

Piezas de 50 mg fueron homogenizadas en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 5% SDS, pH 8.5), y después tratados con proteinasa K (20 mg/ml) y sarkosyl (1%) a 60°C por 2 a 4 h con periodos de agitación (vórtex Genie 2). La extracción de ácidos nucleicos se realizó con fenol equilibrado y cloroformo: isoamilico (1:24), precipitándolos con etanol. La pastilla se resuspendió en 20 iL de agua y se almacenó a 4°C.¹⁵

Amplificación de minisatélites del ORF 94

En cada reacción se agregaron 10 ng de DNA templado, y 30 pmol de cada uno de los iniciadores a 50 mL de mezcla de reacción, que contenía: Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 200mM y 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Bioline London, UK). La mezcla se incubó en un termociclador (MJ. Research) con un programa de 35 ciclos de 94°C/1min, 52°C/1 min, 72°C /1 min, y un paso final de elongación a 72°C por 10 min. Los iniciadores fueron diseñados a partir de la secuencia reportada⁵ (GenBank accession no. AF440570): ORF94-F 5'-TCT ACT CGA GGA GGT GAC GAC-3' y ORF94-R 5'-AGC ANN TGT GTA CAC ATT TCA TG-3'.¹³ Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA.) a 5V/cm en una cámara de electroforesis (Horizon 58 Gibco BRL). Los carriles se cargaron con 6 iL de producto de PCR y 1 iL de buffer de carga (Bioline). El marcador fue DNA Ladder 100 (Invitrogen). Las fotografías de las electroforesis se tomaron con una cámara Gelcam Polaroid.¹⁵

Resultados

En los camarones infectados por WSSV en Sinaloa, de la granja Patague, se presentaron productos de 830 pb (figura 1, carril 3), correspondientes a 12 UR's. En granjas de Cruz Blanca se

identificaron cuatro diferentes cepas del virus, con UR's de 4, 8, 9 y 12, con amplicones de 398, 614, 668 y 830, respectivamente, y predominó la cepa de 4 UR's (figura 1). Muestras con dos amplicones, indican como causa dos cepas del virus, se han reportado en Tailandia,¹³ aunque podrían ser productos amplificados no específicos.

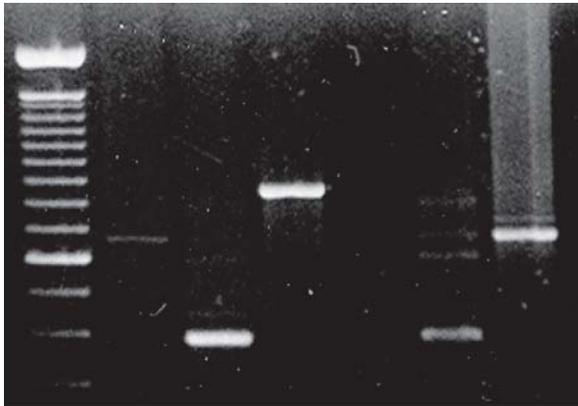


Fig. 1. Amplicones del ORF 94 del genoma viral de WSSV. M: Marcador de pares de bases. Carril 1: muestra del estanque 1 de la granja Remanentes, a 668 pb (9 UR); carril 2: estanque 2 de la Granja Acuaproduktiva, a 398 pb (4 UR); carril 3: ORF 94 del genoma de WSSV en *L. vannamei* de Patague, Culiacán, Sinaloa. Amplicones a 830 pb (12 URs). Carril 4: vacío. Carril 5: muestra de Cruz Blanca, Culiacán, Sinaloa. El aislado más sobresaliente es el de 398 pb, con amplicones más tenues de 614, 668 y 830 pb (8, 9 y 12 UR); Carril 6: muestra de Gez Acuícola con amplicones de 668 pb (uno tenue de 722 pb parece ser un producto inespecífico).

En Sonora, durante el ciclo de cultivo 2005, se identificó una cepa de WSSV con 668 pb en Remanentes, diferente a la de 398 pb (4 UR's) que causó mortalidades masivas en Acuaproduktiva (figuras 1 y 2). Las mortalidades causadas en los estanques de la granja San Ignacio Río Muerto fueron causadas por una cepa de WSSV de 11 UR's con 776 pb (figura 2). Por otra parte, en Gez Acuícola (figuras 1 y 2), se distinguieron dos diferentes tipos de virus, uno de 9 UR's (668 pb) y otro de 8 UR's (614 pb).

En las mortalidades masivas de camarón cultivado en el ciclo de 2000, de Sinaloa, se presentaron infecciones, principalmente, por dos cepas de

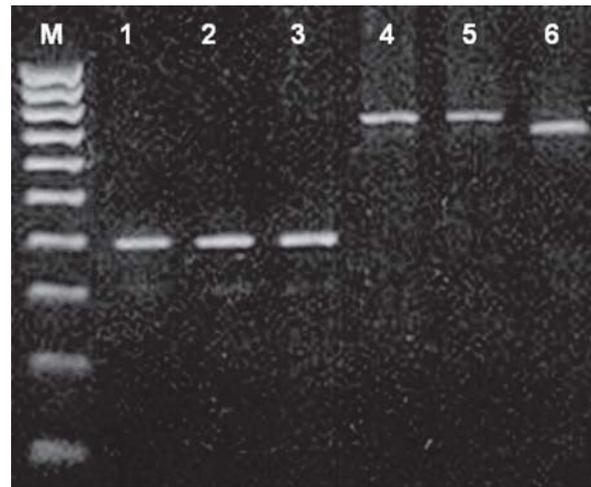


Fig. 2. Amplicones del ORF 94 del genoma viral de WSSV. M: marcador de pares de bases. carriles 1, 2 y 3: muestras de la granja Acuaproduktiva con 398 pb (4 UR); carriles 4, 5 y 6: muestras de la granja San Ignacio Río Muerto con 776 pb (11 UR).

virus, de 12 UR's y 4 UR's, aunque en menor concentración se amplificaron por PCR, cepas de 4, 8 y 9 UR's. En comparación, las cepas que presentan 8 y 9 UR's en el ORF 94 son las que predominaron en Tailandia, en las mortalidades masivas ocurridas entre 2000 y 2002, mientras que el de 12 UR's no fue predominante, y se reportaron cuatro casos de 55 analizados.¹³

Los amplicones de 4 UR's no han sido descritos en la bibliografía, lo cual muestra la capacidad evolutiva y adaptativa del virus, por lo cual se podría pensar que se originó en nuestro país. Recientes análisis genotípicos en Vietnam indican también la presencia de 6-20 UR's.¹⁴ Estudios detallados sobre la variación geográfica, evolutiva y adaptativa del virus WSSV, basados en análisis genómicos del ORF 94, ORF 23/24 y ORF 125, demuestran el uso potencial de marcadores genéticos para estudiar la "epidemiología" del virus WSSV, y para aplicarla como herramienta de control y prevención de epizootias,¹⁴ por ejemplo, el origen y dispersión del virus. Sería aplicable para examinar reproductores portadores del virus y determinar la prevalencia de los tipos diferentes de WSSV que hospeda, y compararla con los tipos

de WSSV encontrados en las mortalidades masivas de las granjas. Incluso sería aplicable para realizar tamizajes en lotes de poslarvas, y conocer el laboratorio donde se originó la infección asociada a epizootias. La amplia variabilidad de las UR's del ORF 94 conduce a preguntarnos si éste produce una proteína funcional¹³, y si ésta se encuentra asociada a la virulencia de las cepas, pues en estudios anteriores^{13,14} sobre este tema, así como el presente, se realizaron en camarones provenientes de epizootias, lo cual podría analizarse en futuros trabajos.

Resumen

El virus del síndrome de la mancha blanca causa serios problemas en cultivos de camarón en México. El objetivo de este estudio fue analizar los minisatelitales del genoma viral, ubicadas en el ORF 94, para su aplicación como marcadores moleculares. En muestras de 2000 se identificaron cuatro diferentes cepas de virus, caracterizadas por 4, 8, 9 y 12 UR's. En 2005, se identificaron cepas de 4, 8 y 9 UR's. Éstas son similares a las cepas de Tailandia, a excepción de la cepa de 4 UR's, que al parecer tuvo su evolución en nuestro país. La asociación de éstas con el grado de virulencia está por definirse.

Palabras clave: Aislados de WSSV, ORF 94, *Litopenaeus*, México.

Abstract

White spot syndrome virus causes the most serious losses to shrimp farmers in Mexico. The objective of this study was to analyze minisatelites located at ORF 94 of the viral genome to apply our results as molecular markers. Four different virus strains, characterized by repeat units (RU's) of 4, 8, 9, and 12 were identified from outbreaks occurred in 2000. Virus strains with 4, 8, and 9 UR's were identified from outbreaks from 2005. Mexican WSSV strains are similar to those iden-

tified in Thailand, with exception of the strain with 4 UR's, which perhaps evolved particularly in our country.

Keywords: WSSV isolates, ORF 94, *Litopenaeus*, México.

Referencias

1. CONAPESCA Producción de camarón, de acuicultura y pesca. Noviembre de 2007.
2. Industria Acuícola, Vol. 4, No. 1.
3. www.industriaacuicola.com
4. Wang Q. B., I. White, R. M. Redman & D V.
5. Lightner. 1999. Per os challenge of *L vannamei* postlarva and *Farfantepenaeus durarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170:179-194.
6. Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by IVTV. *Arch. Virol.* 147: 1655-1663.
7. Galaviz Silva. L., Z.J. Molina Garza, J.M. Alcocer, J.L. Rosales Encinas, J.C. Ibarra G. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*. 242: 53-68.
8. Van Hulten M.C, J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, M. Fiers, H. Sandbrik, R. Klein Lankhorst & J.M. Vlak. 2001. The White spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286:7-22.
9. Yang F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang & X. Xu. 2001. Complete Genome Sequence of Shrimp White Spot Bacaliform Virus. *J. Virology*. 75:11811-11820.
10. Huang, C., X. Xhang, Q. Lin, X. Xu, Z.H. Hu & C.L. Hew. 2002. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Mol. Cell Proteomics*. 1: 223-231.

11. Tsai, M.E.; H.T. Yu, H.F. Tzeng, J-L- Leu, C.M. Chou, C.J. Huang, C.H. Huang, J.Y. Lin, G.H. Kou & C.F. Lo. 2000. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidilate kinase. *Virology*. 277: 100-110.
12. Marks H.; A. Vorst, M.M.L. van Houwelingen, MCW van Hulten & J. M. Vlak. 2005. Geneexpression profiling of White spot syndrome. virus in vivo. *J. General Virology*. 86:2081-2100
13. Wang, Z., Hu, L., Yi, G., Xu, H., Qi, Y. & Yao, L. (2004). ORF390 of white spot syndrome virus genome is identified as a novel antiapoptosis gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 325:899-907.
14. Perdue, M.L.; M. García, Senne E. & M. Fraire. 1997. Virulence associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.*, 49: 173-186.
15. Robles-Sikisaka, R.; K.W. Hasson, D.K. García, K.E., Brovont, K.D. Cleveland, K.R. Klimpel & A.K. Dhar. 2002. Genetic variation and immunohistochemical differences among geographic isolates of Taura syndrome virus of penaeid shrimp. *J. General Virology*. 83: 3123-3130.
16. Wongteerasupaya C., P. Pungchai, B. Withyachumnarnkul, V. Boonsaeng, S. Panyim, T.W. Flegel, P.J. Walker. 2003. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Dis Aquat Org*. 54:253-257
17. Dieu, B.T.M.; H. Marks, J. Siebenga, R.W. Goldbach, D. Zuidema, T. Penco & J.M. Vlak. 2004. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *J. General Virology*. 85: 3607-3618.
18. Sambrook J., Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3 rd edn Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Recibido: 7 de agosto de 2008

Aceptado: 22 de enero de 2009