

**UNIVERSIDAD POLÍTECNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL

**“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE
LARVAS DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*) CULTIVADAS EN LABORATORIO”**

AUTORA:

ANDREA DANIELA GRANDA CUMBICUS

TUTORA:

INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D.

CUENCA - ECUADOR

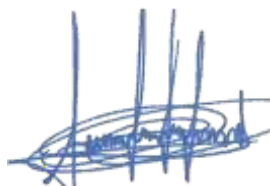
2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Andrea Daniela Granda Cumbicus con documento de identificación N° 1105021024, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana, la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE LARVAS DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*) CULTIVADAS EN LABORATORIO”**, mismo que ha sido desarrollado para optar el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, marzo de 2021.



Andrea Daniela Granda Cumbicus

C.I. 1105021024

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE LARVAS DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*) CULTIVADAS EN LABORATORIO”**, realizado por Andrea Daniela Granda Cumbicus, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, marzo de 2021.

A handwritten signature in blue ink that reads "Inés Malo".


Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D.

C.I. 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Andrea Daniela Granda Cumbicus con documento de identificación N° 1105021024, autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE LARVAS DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*), CULTIVADAS EN LABORATORIO”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, marzo de 2021.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several vertical lines and a horizontal scribble at the bottom.

Andrea Daniela Granda Cumbicus

C.I. 1105021024

DEDICATORIA

Esta tesis la dedicada a Dios por haberme permitido iniciar y culminar con mis estudios universitarios dándome la fortaleza y la sabiduría siempre, a mis padres Narcisa y Guillermo quienes, con su amor, paciencia, confianza, esfuerzo y apoyo incondicionalmente me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más; y en especial a mi papi Memo quien me animó con sus palabras a seguir siempre adelante y a no decaer. A mis hermanos y a toda mi familia y amigos porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los directivos de la Universidad Politécnica Salesiana, por haberme permitido ingresar a esta distinguida institución educativa de manera muy especial a la Carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales, a nuestros docentes que a más de ser nuestras orientadores se convirtieron en amigos y que con su intelecto y su vasta experiencia científica, paciencia impartieron sus conocimientos, así mismo de manera muy especial a la Dra. Inés Malo quien orientó cada etapa y desarrollo de mi trabajo de tesis. Agradecemos a las distintas camaroneras en la provincia de El Oro, que con la colaboración del Ing. Julián Torres, quien facilitó la toma de las muestras respectivas en cada laboratorio pudiendo así llevar este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Antecedentes	3
1.3 Problema de investigación	3
1.4 Formulación del problema o pregunta de investigación	4
1.5 Objetivos	4
1.5.1 General:	4
1.5.2 Específicos:	4
1.6 Hipótesis.....	4
1.7 Justificación.....	4
1.8 Limitaciones	5
 CAPÍTULO 2	 6
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	6
2.1 Estado del Arte	7
2.2 Bases teóricas	8
2.2.1 Industria camaronera.....	8
2.2.2 Camarón blanco del Pacífico, <i>Penaeus vannamei</i>	9
2.2.3 Etapas de vida del camarón <i>Penaeus vannamei</i>	10
2.2.4 Requerimientos ambientales	13

2.2.5 Cultivo de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	13
2.2.5.1 Etapas del cultivo	14
2.2.6 Aplicación de técnicas moleculares en el cultivo de camarón	15
2.2.6.1 Métodos de extracción de ADN para <i>Penaeus vannamei</i>	15
2.2.6.2 Métodos convencionales de extracción de ADN	16
2.2.6.2.1 Método fenol – cloroformo para la extracción de ADN	16
2.2.6.2.2 Kits de extracción de ADN	17
2.2.7 Cuantificación de ADN	18
2.2.7.1 Qubit	18
CAPÍTULO 3	20
MARCO PROCEDIMENTAL	20
3.1 Nivel de investigación	21
3.2 Diseño de investigación	21
3.3 Variables	21
3.4 Población y muestra	21
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	21
3.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	21
3.7 Procedimiento	22
3.7.1 Obtención de la muestra	22
3.7.1.1 Suspensión de muestras en ARNlater	23
3.7.2 Extracción de ADN	24
3.7.2.1 Extracción de ADN con Fenol – Cloroformo	24
3.7.2.1.a Extracción de ADN	25

3.7.2.2 Extracción de ADN con Kit PureLink Tm.....	26
3.7.2.3 Cuantificación de ADN.....	27
3.7.3 Análisis estadístico.....	28
CAPÍTULO 4.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1 Extracción de ADN de larvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	30
4.1.1 Resultados de la cuantificación de ADN.....	30
4.1.2 Análisis estadístico para la concentración de ADN de larvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	33
4.1.2.1 Resultados del estadístico de probabilidad y Anderson – Darling de las concentraciones ADN de larvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i> extraídos por los dos métodos.....	33
CAPÍTULO 5.....	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	38
5.1 Conclusiones.....	39
5.2 Recomendaciones.....	40
BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS.....	41
6.1 Bibliografía.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 De derecha a izquierda; N1: esquema del primer sub estadio naupliar, N2: esquema del segundo sub estadio naupliar, N3: esquema del tercer sub estadio naupliar, N4: esquema del cuarto sub estadio naupliar y N5: esquema del quinto sub estadio naupliar. Fuente: (Asencio, 2020).....	10
Figura 2 De derecha a izquierda; sub estadios protozoeales, Z1: estadio zoea 1, Z2: estadio zoea 2, Z3: estadio zoea 3. Fuente: (Asencio, 2020).	11
Figura 3 Esquema de los sub estadios larvales en etapa de Mysis; A: Mysis 1, B: Mysis 2 y C: Mysis 3. Fuente: (Fenucci, 2016).	11
Figura 4 Ciclo de vida del camarón <i>Penaeus vannamei</i> . Fuente :(Moreno, 1995).....	12
Figura 5 Mapa del cultivo de camarón <i>Penaeus vannamei</i> a lo largo de América Latina. Fuente:(Gobierno Mexicano, 2018).....	14
Figura 6 Recolección de larvas del estanque de cultivo	22
Figura 7 Técnica de recolección por cuadrantes al azar	23
Figura 8 Suspensión de las muestras de larvas en RNAlater	23
Figura 9 Maceración de la muestra con TEN	24
Figura 10 Proceso de limpieza de inhibidores para lograr un ADN limpio, mediante fenol cloroformo.....	25
Figura 11 Finalización de la extracción de ADN mediante el protocolo del kit comercial PureLink Tm	26
Figura 12 Quibit, lectura de ADN con un stock de 10 uL visualizado en la pantalla del equipo.	27
Figura 15 Recolección de larvas de los estanques de cultivo en el laboratorio Reina del Cisne	51

Figura 16 Maceración de las larvas de camarón	52
Figura 17 Maceración de las larvas de camarón para ser suspendidas en RNAlater (reactivo de transporte)	53
Figura 18 Aplicación del método de recolección de muestras al azar por cuadrantes.....	54
Figura 19 Método de cuadrantes para la recolección de la muestra, se repitió tres veces	55
Figura 20 Suspensión de las muestras de larvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i> en RNAlater	56
Figura 21 Material esterilizado antes de la preparación de la muestra para el transporte a los laboratorios en Cuenca.....	57
Figura 22 Muestra de larvas de camarón más reactivo TEN siendo macerado	58
Figura 23 Muestra en el vortex siendo homogenizada	58
Figura 24 Centrifuga configurada a 10 minutos por 10 rg.....	59
Figura 25 Extracción del sobrenadante y traspaso a un tubo nuevo	59
Figura 26 SDS siendo añadido a los tubos.....	60
Figura 27 RNAsa ocupada	60
Figura 28 Muestras a una temperatura de -20 °C durante una hora.....	61
Figura 29 Muestras suspendidas durante toda la noche.....	62
Figura 30 ADN obtenido	62
Figura 31 reactivo Lysis buffer	63
Figura 32 Muestras en el vórtex para dispersar la muestra.....	63
Figura 33 Reactivo Lysis enhancer	64
Figura 34 Incubadora configurada en 65 °C	64
Figura 35 Vórtex acompañado de su adaptador para agitar las muestras	65
Figura 36 Colocación del reactivo Cleanup buffer	65
Figura 37 Reactivo cleanup buffer.....	66

Figura 38 Eliminación del precipitado.....	66
Figura 39 Tubo adherido a una spin colum	67
Figura 40 Reactivo binding buffer	67
Figura 41 Spin colum incorporada a un nuevo tubo	68
Figura 42 Reactivo wash buffer	68
Figura 43 Incorporación del reactivo elution buffer	69
Figura 44 Reactivo Elution buffer	69

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Primera extracción: Concentración promedio de ADN de larvas de camarón	31
Gráfica 2 Segunda extracción: concentración promedio de ADN de larvas de camarón	32
Gráfica 3 Prueba de probabilidad y Anderson - Darling de las concentraciones de ADN de larvas de camarón	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica del camarón blanco del Pacífico <i>Penaeus vannamei</i>	10
Tabla 2 Características del ciclo de vida larval del camarón <i>Penaeus vannamei</i>	12
Tabla 3 Métodos convencionales de extracción de ADN más utilizados	16
Tabla 4 Descripción de los componentes que intervienen en la extracción de los ácidos nucleicos en del método convencional fenol - cloroformo	17
Tabla 5 Descripción de los compuestos utilizados en el kit PureLink Tm microbiome para la extracción de ADN	18
Tabla 6 Resultados de la primera extracción de ADN, por los dos métodos: Fenol - Cloroformo y PureLink Tm	31
Tabla 7 Resultados de la segunda extracción de ADN, por los dos métodos: Fenol - Cloroformo y PureLink Tm	32
Tabla 8 Planteamiento de hipótesis.....	34
Tabla 9 Análisis de varianza	34
Tabla 10 Comparación en parejas de Tuckey	35

RESUMEN

La presente investigación detalla el estudio de dos métodos para extracción de ADN de larvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) cultivadas en laboratorio, los procedimientos ocupados fueron: un método convencional modificado que se eligió por ser amplio en su elección de muestras y un kit comercial por poseer triple lisis. El objetivo de este proyecto fue determinar cuál de los dos métodos es el mejor en términos de eficiencia y costos. Los métodos obtuvieron como resultados una similitud en las concentraciones de ADN, infiriendo que los resultados se debieron a los inhibidores que se encontraban en las muestras recolectadas. Los promedios de las concentraciones de ADN resultantes por el método convencional modificado y el kit comercial de extracción fueron de, 176.165 ng/mL y de 180.6985 ng/mL respectivamente, se concluyó que tanto el método convencional por fenol cloroformo como el kit de extracción comercial PureLink Tm, tienen la misma eficiencia en términos de calidad como de cantidad para este tipo de muestras en donde existe una gran cantidad de inhibidores, como son, los ácidos grasos y biliares componentes principales del camarón, futuras investigaciones podrían incrementar columnas de filtración y lavados a los protocolos de extracción.

Palabras claves: Concentración de ADN, PureLink TM, Fenol – Cloroformo.

ABSTRACT

This research details the study of two methods for DNA extraction from white shrimp (*Penaeus vannamei*) larvae grown in the laboratory, the methods used were a modified conventional method that was chosen for being broad in its choice of samples and a commercial kit for having triple lysis. The objective of this project was to determine which of the two methods the best in terms of efficiency and costs is. The methods obtained a similarity in DNA concentrations, inferring that the results were due to the inhibitors found in the collected samples. The averages of the DNA concentrations resulting from the modified conventional method and the commercial extraction kit were 176,165 ng / mL and 180,6985 ng / mL respectively, it was concluded that both the conventional phenol chloroform method and the commercial extraction kit PureLink Tm, have the same efficiency in terms of quality and quantity for this type of samples where there is a large amount of inhibitors, such as fatty and bile acids, the main components of shrimp, future research could increase filtration columns and washes to the extraction protocols.

Keywords: DNA concentration, PureLink TM, Phenol - Chloroform.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Ecuador genera mucho beneficio económico satisfaciendo las necesidades de mercado de camarón blanco *Penaeus vannamei* en varias partes del mundo, principalmente en Estados Unidos, Canadá y en muchos países europeos, posicionándose así, entre los primeros puestos en el ranking de exportaciones de camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei*, contribuyendo, al desarrollo y la estabilidad económica productiva del país, la acuicultura representa un importante sector productivo, especialmente con su producto estrella, el camarón blanco, produce varias fuentes de ingreso y muchas familias se dedican a este labor (Moyano, 2015); (Mendoza, 2017).

Al aumentar las densidades de cultivo de camarón, por ser un producto de gran interés, su supervivencia se ha vuelto uno de los principales objetivos dentro de este cultivo, ya que es una especie constantemente amenazada por diferentes patologías desde sus etapas larvales hasta su adultez (Gómez & Roque, 2018). En Ecuador en la actualidad son más los laboratorios de cultivos de larvas que implementan el uso de técnicas moleculares, esto ha representado positivamente al cultivo de camarón *Penaeus vannamei*, obteniendo beneficios como: detecciones tempranas de microorganismos que generan patologías, variabilidad genética y el mejoramiento entre cruce de líneas para volver las especies más resistentes a enfermedades o condiciones climáticas, análisis de aguas e incluso dentro de la propia dieta de las larvas o el camarón adulto ya que la alimentación posee proteínas obtenidas de microorganismos benéficos mediante la biotecnología (Rodríguez & Hernández, 2006).

En este proyecto de investigación se busca identificar entre dos métodos de extracción de ADN, un protocolo comercial y un convencional, cual es el que mejores resultados presentarán, teniendo como objetivos un método reproducible, que contenga ADN de buena calidad y cantidad.

1.2 Antecedentes

El cultivo de larvas de camarón mejor conocido como larvicultura, se intensificó en el Ecuador a gran escala a partir de los años 80, especialmente en las provincias de El Oro y Santa Elena, estandarizándose la producción de larvas a gran escala dentro de laboratorios que igualaban el ambiente natural del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Y es hasta después del año 2000, luego de la llegada del síndrome de la mancha blanca, con resultados de mortalidad al 100% de larvas en estuarios (Miller *et al.*, 1974), que despertó el interés por estudiar y mejorar las líneas genéticas de camarón, buscando larvas más resistentes a diferentes patologías, incluida la presencia de la mancha blanca o actualmente la patología que más ataca, el síndrome de la mortalidad temprana o científicamente conocido como la necrosis hepatopancreática aguda (Rodríguez, 2017). Los estudios moleculares en *Penaeus vannamei* con caracterizaciones genéticas en poblaciones reportan bajos niveles de diversidad entre Ecuador y México (Varela, Peña, & Fernando, 2017).

1.3 Problema de investigación

En el presente estudio de investigación se evaluarán dos métodos de extracción de ADN, para identificar cuál de los dos protocolos, garantiza el aislamiento de ADN con buena calidad y cantidad de ADN de larvas de camarón, teniendo presente que (*Penaeus vannamei*) es el principal producto acuícola de exportación nacional según la Cámara Ecuatoriana de Acuicultura (2018). Se han elegido dos procedimientos para el aislamiento del ADN; primero un kit de extracción comercial, confrontado a un método tradicional de extracción de material nuclear; mismos que serán sometidos a comparación comprobando que el kit de extracción acorta la duración del estudio, es supremamente importante considerar que no existe un protocolo estandarizado que aislé el ADN de larvas de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) cultivadas en laboratorio, el ácido nucleico que se extraerá servirá de insumo para estudios metagenómicos a futuro.

1.4 Formulación del problema o pregunta de investigación

¿Podría un kit comercial de extracción de ADN igualar en términos de eficiencia, a un método de extracción de ADN convencional, para la extracción de ADN de larvas de camarón (*Penaeus vannamei*)?

1.5 Objetivos

1.5.1 General:

- Evaluar dos métodos de extracción de ADN de larvas de camarón (*Penaeus vannamei*) cultivadas en laboratorio, para potencial uso en metagenómica.

1.5.2 Específicos:

- Evaluar la calidad y rendimiento de ADN extraído de larvas de camarón (*Penaeus vannamei*) cultivadas, utilizando métodos de laboratorio.
- Evaluar la cantidad y pureza de ADN extraído de larvas de camarón (*Penaeus vannamei*) cultivadas, utilizando métodos de laboratorio,
- Comparar los resultados obtenidos, a través de análisis estadísticos, determinando la factibilidad de uso del protocolo modificado para fines metagenómicos.
- Elaborar una propuesta de artículo científico respetando los formatos internacionales para la posible divulgación de los resultados obtenidos.

1.6 Hipótesis

El protocolo convencional de extracción de ADN posee eficiencia similar al kit comercial.

1.7 Justificación

Ecuador es el mayor productor de camarón en estado de cautiverio en Occidente y el segundo productor a escala mundial, después de Asia; el 96% de la producción proviene del cultivo tecnificado y el 4% de la pesca artesanal (Andriantahina, 2013).

Es de gran importancia estudiar las características que otorguen beneficios a la hora del cultivo de larvas de camarón blanco *Penaeus vannamei*, una de las estrategias son los estudios moleculares, con el ADN como material de partida inicial, para esto se evaluaron dos métodos de extracción de ADN, un protocolo convencional y un protocolo comercial. Con los resultados se verificará, cual es el protocolo con mejores resultados en ADN de calidad y cantidad, de esta manera a futuro se podrá realizar estudios metagenómicos que ayuden a mejorar los cultivos de larvas en laboratorios.

1.8 Limitaciones

La presente investigación se llevará a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, la obtención de larvas de camarón blanco del Pacífico se obtendrán de diferentes camaroneras del sur del Ecuador, en las provincias de El Oro, durante el lapso de cuatro meses; debido a esto los limitantes serán: el tiempo, el uso de laboratorio por terceros y los traslados de las muestras de larvas de *Penaeus vannamei* desde los laboratorios de larvicultura.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Estado del Arte

El camarón (*Penaeus vannamei*), inició su producción a gran escala alrededor de los años ochenta, en diversos países a lo largo de las costas del Pacífico y el Atlántico, generando millones de toneladas métricas de cultivo de *Penaeus vannamei* anualmente (García, 2017). Sin embargo, hasta la fecha se han presentado diversos problemas patológicos en las diferentes etapas del cultivo, siendo la fase larvaria la más atacada (Peña & Varela, 2016). El año 2009 fue el año que más pérdidas económicas presentó, por la presencia de una nueva patología, la mortalidad del estadio larvario llegó a su totalidad en países como China, México y Ecuador (Godínez, Chávez, & Gómez, 2011); (Han *et al.*, 2015).

Desde entonces, surgió la necesidad de identificar tempranamente todo tipo de patología que pueda ser perjudicial para el cultivo de *Penaeus vannamei*, en cualquiera de sus etapas (Medina, 2018), principalmente en su fase larvaria (Ratón, 2004). Con el tiempo se han diseñado nuevas técnicas moleculares que ayudan a solventar todos estos problemas y mencionados, siendo uno de ellos la extracción de los ácidos nucleicos, para luego someterlos a una reacción en cadena de la polimerasa e identificar regiones específicas que son de interés clínico (Aspiazu, Granda, & Mosquera, 2017)

Para especies de crustáceos aún no se encuentran estandarizados métodos de extracción de ADN, para lo cual se utilizan técnicas generales y kits comerciales (Quinga, 2012). Con el pasar del tiempo y las diferentes necesidades, se han adecuado diferentes métodos de extracción de ADN de camarón *P. vannamei*, un reciente estudio evaluó un método convencional modificado por fenol cloroformo y un kit de extracción comercial Pure Link Tm microbiome, el estudio presentó en promedio 518.96 ng/mL de ADN para intestino y 496.4 ng/mL de ADN para hepatopáncreas, con el fin en uso metagenómico (Cisneros & Feijóo, 2020).

Otra evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN se realizó con una especie de la misma rama filogenética del camarón, el *Macrobracium carcinus L*, aquí se adecuaron métodos para la extracción del ADN de intestino, estómago y hepatopáncreas, el ADN se extrajo a partir de una metodología que involucraba una lisis enzimática, física, mecánica y química, aunque, luego de varias extracciones se llegó a la conclusión de que suprimiendo la lisis enzimática se obtenía un ADN de mejor calidad y cantidad (Sriket, Benjakul, & Visessanguan, 2011).

Ambos estudios demostraron que, el hepatopáncreas necesitaba mayor digestión de sus moléculas, para lo cual, se modificaron sus protocolos, eliminando la fase grasa encontrada de manera manual o incorporando choques térmicos de temperatura, eso dio apertura a una mayor extracción de los ácidos nucleicos en las muestras (Lander *et al.*, 2011).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Industria camaronera

El cultivo de camarón *Penaeus vannamei* comienza a finales de los años 60, se tiene un registro de 17 países de América, entre ellos Estados Unidos, Brasil y Ecuador que cultivan camarón (*Penaeus vannamei*) en laboratorios a gran escala, además de países asiáticos como: Tailandia y China (Moreno, 2010), los cuales intervienen en el mercado internacional de camarón, dando como resultado, variaciones en su precio (Ordoñez, 2010).

La industria camaronera cuenta una historia de un desarrollo importante en el Ecuador, sus inicios se registran entre, 1979 y 1984, teniendo un aumento dramático en el año 1983, año en donde se registró la mayor producción y ventas de camarón *Penaeus vannamei* en el Ecuador (I. Fraga & Ceballos, 2011); (McPadden, 1985), alcanzando 36.6 miles de toneladas métricas de cultivo y 183 millones de dólares en exportación, es en el año 2000 que baja su producción al 30% por la llegada del virus de la mancha blanca (Chipantiza Fanny, 2015).

La enfermedad de la mancha blanca atacó al camarón (*Penaeus vannamei*) en todo el mundo, el cultivo enfrentó problemas como; afección tanto al cuerpo como a la piel del crustáceo, ocasionando que los productores inviertan recursos e insumos para lograr recuperar las condiciones óptimas para conseguir con un producto de buena calidad (Ordoñez, 2010), luego de la mancha blanca, solo 1200 fincas continuaron con la actividad productiva, 15 años después, la recuperación es notable, tanto que, las fincas de producción se duplicaron, teniendo como consideración, que no corresponde al aumento de tierra de cultivo sino, al cambio de estrategias que mejoraron el cultivo de camarón (Argandona, 2016).

El sector camaronero contribuye en la economía nacional en un alto porcentaje, siendo la actividad productora en encabezar las listas de productos exportados no petroleros, aporta aproximadamente 180 000 plazas de trabajo directo e indirecto, con lo cual el comercio resulta más dinámico (CNA, 2016); (CNA, 2018).

2.2.2 Camarón blanco del Pacífico: *Penaeus vannamei*

Esta especie de la familia de los *Penaeidos*, ver clasificación taxonómica en la tabla 1, es reconocida como uno de los productos más cultivados por sus altos rendimientos, su producción tiene un costo elevado en sus diferentes etapas de cultivo, postlarva, juvenil y pre adulta, sean cultivados en estuarios, lagunas costeras y manglares, (Cobo & Pérez, 2018). El camarón *Penaeus vannamei*, en machos alcanza su madurez sexual a partir de los 20 g de cultivo, y las hembras desde los 28 g y a partir de los 30 g hasta los 45 g son capaces de liberar entre 100 000 y 250 000 huevos de 0.22 mm de diámetro, la incubación dura alrededor de 16 a 18 horas después de la fertilización y desove (Cobo & Pérez, 2018), (Briggs *et al.*, 2012)

Las primeras semillas de camarón *Penaeus vannamei* fueron silvestres, se introdujeron al Ecuador, para luego, empezar con los programas de domesticación y el cultivo fuera de los estuarios naturales, también surgió la selección genética, lo que permitió que las larvas a cultivar sean de alta calidad y resistencia (FAO, 2014).

Tabla 1 Clasificación taxonómica del camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*

Orden	Decapoda
Familia	Penaeidae
Especie	<i>Penaeus vannamei</i>
Nombre común	Camarón blanco

Fuente: (Ardila, Navas, & Reyes, 2002); (Fernández, 2015).

2.2.3 Etapas de vida del camarón *Penaeus vannamei*

El ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico, comienza con un primer estadio en larva, llamada nauplio, el mismo que cuenta con cinco sub estadios larvales, ver figura 1, su característica principal es ser fototáctica positiva, no requieren alimentación porque se alimentan y nutren de una reserva propia denominada vitelina, la temperatura óptima de cultivo es de 31 °C y un pH entre 7.5 y 7.7, el estadio naupliar dura 48 horas (Garnica, 2016).

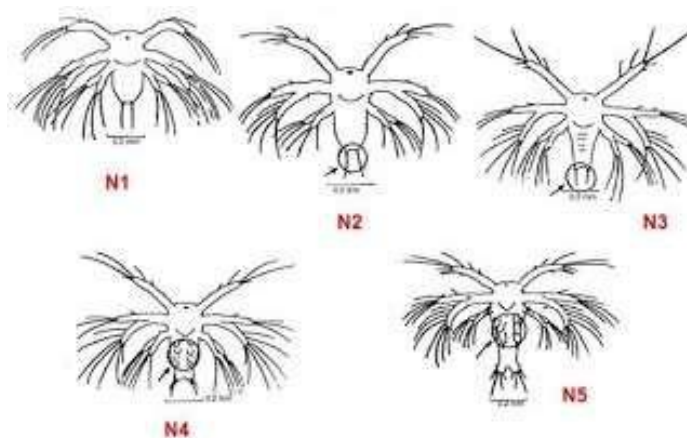


Figura 1 De derecha a izquierda; N1: esquema del primer sub estadio naupliar, N2: esquema del segundo sub estadio naupliar, N3: esquema del tercer sub estadio naupliar, N4: esquema del cuarto sub estadio naupliar y N5: esquema del quinto sub estadio naupliar. Fuente: (Asencio, 2020).

Al finalizar el quinto sub estadio naupliar, la larva continua con su etapa denominada protozoal, esta etapa tiene una duración de cinco días, el movimiento natatorio se realiza con ayudade las antenas y un indicador de una zoea saludable, es la búsqueda inmediata de la luz, en estaetapa se encuentran tres sub estadios protozoales, ver figura 2, (Asencio, 2020).

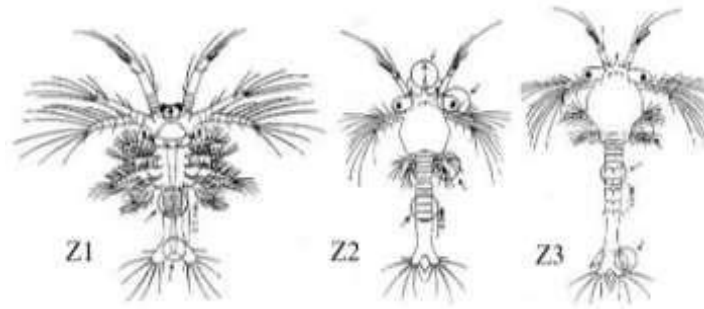


Figura 2 De derecha a izquierda; sub estadios protozoales, Z1: estadio zoea 1, Z2: estadio zoea 2, Z3: estadio zoea 3. Fuente: (Asencio, 2020).

La etapa larval siguiente se denominada Mysis, tiene tres sub estadios larvales, con una duración de tres días, sus antenas se reducen y existe menos tendencia a la búsqueda inmediata de luz, ver figura 3, (Ordoñez, 2017).

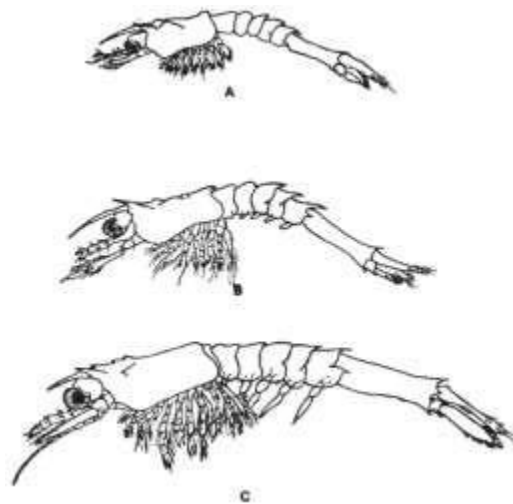


Figura 3 Esquema de los sub estadios larvales en etapa de Mysis; A: Mysis 1, B: Mysis 2 y C: Mysis 3. Fuente: (Fenucci, 2016).

Su última etapa larvaria es la postlarva, en donde se alimentan por fitoplancton y zooplancton, aquí el camarón crece hasta alcanzar un peso comercial entre 18 g a 25 g o también se conoce una identificación por números según los días avanzados, hasta llegar a PL12 o PL 14, para ser trasladadas a sus piscinas de cultivo correspondientes en donde se empezaran a alimentar y nutrir con gusanos, bivalvos y crustáceos, hasta alcanzar el gramaje deseado, cada metamorfosis conlleva un cambio de hábitos de planctónicos a betónicos (Briggset *al.*, 2012).

En general se podría decir que el ciclo larval del camarón *Penaeus vannamei* consta de tres etapas principales; zoea, mysis y post larva, a continuación, en la tabla 2, se describe el tipo de alimentación, duración y los parámetros óptimos ya estandarizados para el cultivo dentro de los laboratorios de larvicultura, ver figura 5.

Tabla 2 Características del ciclo de vida larval del camarón *Penaeus vannamei*

Etapa	Alimentación	Duración	Parámetros óptimos
Nauplio	Reservas propias	48 horas	T: 31 °C, pH: 7.5 - 7.7
Zoea	Fitoplancton	5 días	T: 28.5 °C, pH: 7.5 - 7.7
Mysis	Zooplancton	3 días	T: 28.5 °C, pH: 7.5 - 7.7
Post larva	Zooplancton	12 – 14 días	T: 28.5 °C, pH: 7.5 - 7.7

Fuente: (Garnica, 2016)

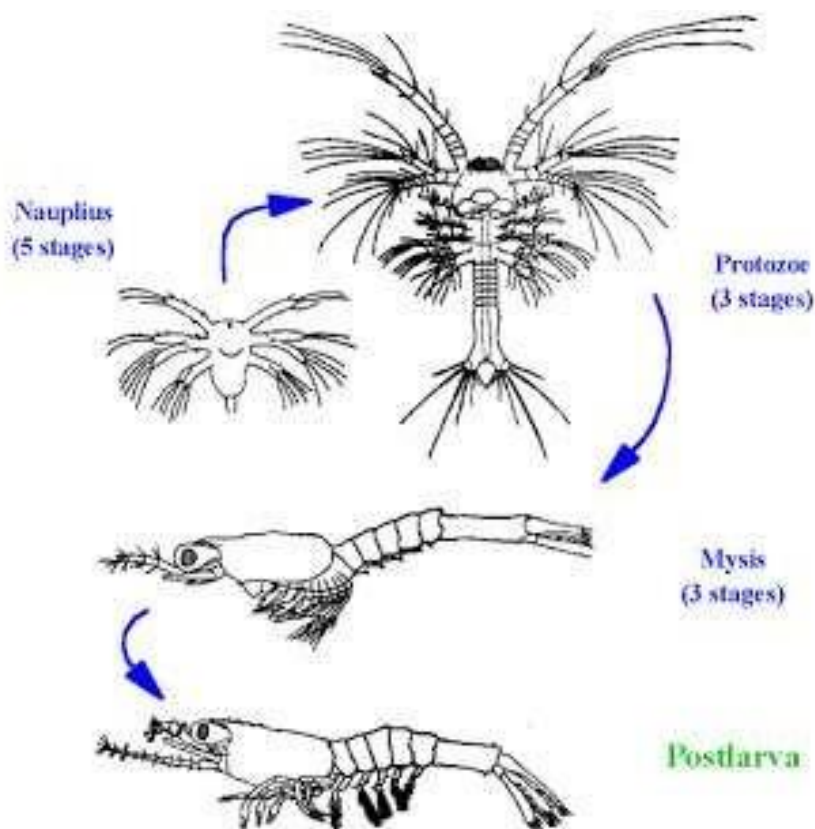


Figura 4 Ciclo de vida del camarón *Penaeus vannamei*. Fuente: (Moreno, 1995).

2.2.4 Requerimientos ambientales

Los factores más importantes en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei* y su supervivencia son; salinidad, potencial de hidrógeno, temperatura y oxígeno disuelto, en el cuerpo de agua del cultivo (Gobierno Mexicano, 2018). Una pequeña variación de cualquiera de estos factores daría como resultado, estrés en todo el cultivo, afectando sobre todo a las primeras etapas de su ciclo de vida, alterando la capacidad de adaptación al momento de ser trasladados en su estadio post larvario (Rojas, Haws, & Cabanillas, 2005); (Artiles *et al.*, 2011).

En los primeros estadios del camarón *Penaeus vannamei*, en las piscinas de cultivo, se mantiene una temperatura entre 28 °C y 31 °C, salinidades de entre 28 y 35 ppt (partes por tonelada), un pH de 7 a 8.5 y un DO que varía entre 100 y 135 cc/kg/hora, este último factor demostró que, si los valores no se encuentran dentro del rango óptimo, pueden ocasionar alta mortandad cuando supera los límites, y cuando disminuye provoca el enterramiento del camarón *Penaeus vannamei* en el sedimento. El OD se encuentra ligado estrechamente a la temperatura, demostrado un aumento de peso, cuando la temperatura es más alta (Egusa, 1990). Siendo la primera etapa de cultivo de *Penaeus vannamei* la fase larvaria más costosa, ya que intervienen muchos más insumos para lograr su supervivencia y adaptación en la hora del transporte (Rojas *et al.*, 2005).

2.2.5 Cultivo de camarón *Penaeus vannamei*

El cultivo de *Penaeus vannamei*, contribuye a un 55% de la producción mundial dentro de la industria pesquera o acuicultura, se cosechan aproximadamente 3 millones de toneladas métricas al año (FAO, 2014), de todas las especies cultivadas de camarón, el 71,8% corresponde a camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*, principalmente en regiones de América Latina y el Caribe, en el puesto principal de productores en esta zona se mantiene Ecuador con 194 628 toneladas, ver figura 5, (Borrell *et al.*, 2006).



Figura 5 Mapa del cultivo de camarón *Penaeus vannamei* a lo largo de América Latina.
Fuente:(Gobierno Mexicano, 2018).

2.2.5.1 Etapas del cultivo

Existen cinco etapas claves para una buena producción dentro del cultivo de camarón *Penaeus vannamei*, en la primera etapa se encuentra el cultivo de larvas, se da principalmente en sistemas especializados con control en sus requerimientos ambientales, son elaborados con fibra, vidrio o plástico (Plaza & Nuñez, 2016). La segunda etapa corresponde a los sistemas de cultivo, estos pueden clasificarse en extensivo, intensivo, semi intensivo y súper intensivo, en Ecuador el sistema más ocupado es el semi intensivo (Arevalo, 2014). Para la tercera etapa se considera la siembra en el estanque de cultivo, para esto los operarios deben comprobar que el agua de los estanques que recibirán a las larvas estén en máximas condiciones, por lo general el agua del estanque se trata con fertilizantes, melaza y probióticos (Cuéllar *et al.*, 2010).

La cuarta etapa considera las afecciones, que con mayor relevancia puedan atacar al cultivo, aquí se describen como las más importantes y que daños han causado la mancha blanca y la necrosis hepatopancreática aguda, estas enfermedades pueden atacar a la larva o camarón adulto, causando la mortalidad completa del estanque (Parker *et al.*, 1974); (Rojas, Haws, & Cabanillas, 2015); (Peña & Varela, 2016).

La última y quinta etapa del cultivo, es la cosecha final, se debe mantener una buena práctica de manufactura, para asegurar el producto se maneja de manera rápida, se congela estando vivo para evitar cualquier daño, siguiendo las normas oficiales de sanidad acuícola (*Rojas et al.*, 2015).

2.2.6 Aplicación de técnicas moleculares en el cultivo de camarón

En el cultivo de camarón *Penaeus vannamei* ha llamado la atención la genética para mejorar el cultivo de estos organismos, buscando aumentar la supervivencia, introduciendo variaciones en la población, aumentando la variabilidad genética con especies de alta heterocigosidad (Cobo & Pérez, 2018). Incrementar la calidad del agua de los estanques, diagnosticando tempranamente las enfermedades que se puedan dar durante el proceso, disminuir costos y cuidando el ambiente (Borrell et al., 2006).

De las principales enfermedades que se busca erradicar con el uso de técnicas moleculares son White Spot Syndrome Virus (WSSV), o mejor conocido como el síndrome de la mancha blanca (Sánchez, 2010), y la ocasionada por el *Vibrio parahaemolyticus*, llamada necrosis hepatopancreática aguda (Letchumanan, Chan, & Lee, 2014). No existen tratamientos estandarizados para eliminar esta enfermedad en los tanques de cultivo de larvas, ambas enfermedades ocasionan estrés crónico, limitando e inhibiendo la alimentación continua de las larvas, volviéndolas blancas y deformes, ocasionando su muerte (De la Rosa, 2016).

2.2.6.1 Métodos de extracción de ADN para *Penaeus vannamei*

Los métodos de extracción de ADN constan de tres fases: lisis celular, liberación del material genético y la liberación del ADN de los componentes celulares (Orfao & Morent, 2015). Existen varios métodos comunes que aplican solventes orgánicos (Lander et al., 2011), y actualmente se han desarrollado métodos estandarizados como los kits comerciales (Bustamante, Astudillo, Pazos, & Bravo, 2011); (Sandoval & Armendáriz, 2016).

2.2.6.2 Métodos convencionales de extracción de ADN

Los métodos convencionales utilizan solventes orgánicos en el proceso de extracción, el método más utilizado es el de fenol cloroformo, se registra una eficacia ante cualquier muestra para la extracción de su ADN (Chomzynki, 1987), a continuación, en la tabla 3, se describen los cinco métodos convencionales para extracción de ADN mayormente conocidos.

Tabla 3 Métodos convencionales de extracción de ADN más utilizados

Método de extracción de ADN	Tiempo
Método fenol – cloroformo	19 horas
Método acetato de potasio	4 horas
Método acetato de potasio modificado	4 horas
Método CTAB	4 horas
Método de calentamiento	30 minutos

Nota: El método convencional de extracción de ADN con mayor tiempo de duración en su protocolo es el método fenol – cloroformo y el método de menor tiempo de extracción el método por calentamiento, aunque, el tiempo de extracción no está ligado a la eficacia de los resultados en cuanto a cantidad de ADN extraído, el método fenol cloroformo es el que más eficacia ha mostrado en estudios de origen vegetal y animal (Fraga *et al.*, 2014).

2.2.6.2.1 Método fenol – cloroformo para la extracción de ADN

El método convencional modificado para desarrollar este trabajo de investigación fue el método convencional por fenol – cloroformo, con una modificación para extracción de ADN en crustáceos, este método es una técnica orgánica, que refleja en sus resultados un ADN de buena calidad, es decir con un peso molecular alto y de gran cantidad en su fase acuosa, además de ser un método que ha demostrado ser reproducible con cualquier muestra sea de origen vegetal o animal, los compuestos que intervienen en el protocolo se describen en la tabla 4 (López *et al.*, 2014).

Tabla 4 Descripción de los componentes que intervienen en la extracción de los ácidos nucleicos en el método convencional fenol - cloroformo

Reactivo	Descripción
Tris hidroximetil aminometano	Actividad tamponante
Ácido etilendiaminotetracético	Agente quelante
Detergente dodecilsulfato sódico	Tensoactivo aniónico
ARNasa	Inhibición de la hidrólisis del ARN
Cloroformo	Separación de fases (acuosa – orgánica)

Nota: Los componentes descritos intervienen en el aislamiento del ADN de muestras de cualquier origen, vegetal o animal. Fuente:(Crouch, 2009); (Cutipa, Quispe, & Sumiri, 2015).

2.2.6.2.2 Kits de extracción de ADN

El uso de kits comerciales para el aislamiento de ácidos nucleicos, se ha vuelto la opción más práctica, por su reproducibilidad y además por reducir tiempos durante el proceso de extracción, minimizan la contaminación cruzada y también, demuestran un ADN con mayor grado de pureza (Dewan *et al.*, 2017), un ejemplo de kit comercial es el PureLink TM, método escogido para la extracción de ADN en este proyecto de investigación.

El principio del kit de extracción, es la unión selectiva que tiene la membrana de sílice con el ADN, proporcionando una triple lisis en lugar de una sola, eliminando inhibidores de la extracción de inmediato, generando una limpieza completa, incluso teniendo varias muestras, los resultados son ADN de alta calidad (Fiedorová *et al.*, 2019).

A diferencia de los métodos convencionales para la extracción de ADN, los kits no utilizan componentes orgánicos como el fenol o el cloroformo, que están catalogados como peligrosos para el operario, a continuación, en la tabla 5 se describen los componentes intervinientes.

Tabla 5 Descripción de los compuestos utilizados en el kit PureLink Tm microbiome para la extracción de ADN

Compuesto	Finalidad
Lysis buffer (Tampón de lisis)	Ruptura de las células
Lysis enhancer (Potenciador de lisis)	Tampón durante la lisis celular
Clean up buffer (Buffer de limpieza)	Eliminador de contaminantes
Binding buffer (Tampón de unión)	Sales reguladoras de pH
Wash buffer	Eliminador de detergentes
Elution buffer	Separa el ADN de la pared de sílice.

Fuente: (Scientific, 2015).

2.2.7 Cuantificación de ADN

El ADN resultante contenido en una muestra es analizado luego de la extracción, primero para verificar cuánto ADN se extrajo, dando como resultados un valor numérico (Ríos *et al.*, 2016), de los métodos más comunes para realizar esto se encuentra el uso de fluorómetros que permitan medir concentraciones exactas de ADN, son de alta sensibilidad y tienen un rango de efectividad específica de 1 a 10 ug (Monroy *et al.*, 2014), a pesar de que como resultado se obtenga gran cantidad de ADN, no siempre la cantidad está relacionada con la pureza contenida en la muestra (Alliance, 2009).

2.2.7.1 Qubit

El fluorómetro Qubit, mide con precisión la cantidad de ADN, ARN y proteínas que se encuentra en una muestra, mediante una fluorescencia que emiten señales, cuantificando rápidamente y de manera precisa en menos de tres segundos la cantidad de material genético contenida en una muestra, tiene altos niveles de precisión utilizando de 1 a 20 uL de muestra, incluso si las muestras son muy diluidas, este equipo puede almacenar resultados hasta de 1000 muestras, su tecnología abarca una pantalla táctil para fácil navegación (Kumar *et al.*, 2020).

Medir la pureza del ADN, es sencillo si se utilizan métodos como el uso de espectrofotómetros, estos métodos utilizan diferentes longitudes de onda, los rangos óptimos a determinar en una muestra contenida con ADN son de 1.8 a 2.0, entre índices de longitud de onda de A 260/280 y A 260/230 (Desjardins & Conklin, 2010).

CAPÍTULO 3

MARCO PROCEDIMENTAL

3.1 Nivel de investigación

El trabajo de investigación es de nivel descriptivo, se estudiaron de forma autónoma dos variables independientes, las variables son dos métodos de extracción de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei*, cada variable tendrá como determinantes la calidad y la cantidad de ADN que se obtenga con sus respectivas extracciones (Arias, 2012).

3.2 Diseño de investigación

El presente trabajo de tesis, contiene un diseño de investigación, experimental, la variable dependiente, que en este caso resultaron ser las larvas de camarón estuvieron expuestas a las dos variables independientes, los métodos de extracción de ADN (Arias, 2012).

3.3 Variables

Variable independiente: métodos de extracción de ADN. Variable dependiente: larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Variables intervinientes: heterogeneidad de las muestras

3.4 Población y muestra

La población se obtuvo de la zona sur del Ecuador, en las provincias de El Oro, se seleccionaron tres laboratorios de larvas en la provincia de El Oro y de cada laboratorio se recolectaron por triplicado muestras de tres piscinas de cultivo, teniendo como resultado finito 12 muestras.

3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se realizó una investigación bibliográfica, en libros, revistas científicas, publicaciones web, fotografías seguimientos con bitácoras.

3.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se realizaron técnicas de muestreo por cuadrantes y luego se aplicó un diseño experimental completamente al azar, para determinar cuál de los dos métodos evaluados es el más eficiente.

3.7 Procedimiento

3.7.1 Obtención de la muestra

Como primera etapa del proyecto de investigación se realiza la visita a los diferentes laboratorios de larvicultura ubicados en la provincia de El Oro para la recuperación de las muestras, se recolectaron larvas de tres diferentes laboratorios que se describen a continuación; Reina del Cisne, Excelaqua Bajo Alto y Excelaqua Barbones. Las larvas recolectadas se encontraban en estanques con capacidad de 35 toneladas de agua con una salinidad de 25 ppm, cada uno de los estanques contenía alrededor de 3 millones de larvas. Las larvas se recolectaron en un estadio de post larva número 7 (Pl 7), esto quiere decir que tenían 7 días desde su último cambio de estadio de zoea a larva.

La técnica de recolección de larvas que se usó, es la ocupada normalmente por los operarios de los laboratorios de larvicultura, la técnica consiste en sumergir una bandeja hasta el fondo del estanque y retirar la bandeja lo más suave posible para recolectar las larvas de una manera uniforme, ver imagen 6, luego se procede a cernir las larvas con la ayuda de un cedazo, separando las larvas por completo de su medio. La recolección de las muestras se realizó de la misma manera en los tres distintos laboratorios de larvicultura, visualizar Anexo 1.



Figura 6 Recolección de larvas del estanque de cultivo. Fuente: Autor

Las larvas recolectadas se maceraron y para que la muestra sea aleatoria se procedió a utilizar la técnica de muestreo al azar por cuadrantes, se colocaron las larvas maceradas o pool en una caja Petri, se dividió en cuadrantes y se eligió una parte al azar que luego se volvió a colocar en una caja Petri, para dividirlo en cuadrantes para escoger una parte al azar para que la muestra final sea completamente aleatoria y heterogénea, se puede observar el procedimiento en la imagen 7.



Figura 7 Técnica de recolección por cuadrantes al azar. Fuente: Autor

3.7.1.1 Suspensión de muestras en RNAlater

Se procedió a colocar 1 mL de muestra aleatoria más 1 mL de reactivo de transporte (RNAlater) que tiene como objetivo inhibir la degradación del ADN (Schulz *et al.*, 2017), en un tubo cónico, ver imagen 8, para luego transportarlo a la ciudad de Cuenca para la respectiva extracción.



Figura 8 Suspensión de las muestras de larvas en RNAlater. Fuente: Autor

Se recolectaron tres muestras de larvas por cada laboratorio, teniendo un total de 12 muestras.

Las muestras se describen en la tabla 6 a continuación:

Provincia: El Oro	Muestra de larvas
Reina del Cisne	3 muestras suspendidas en RNAlater
Excelaqua bajo alto	3 muestras suspendidas en RNAlater
Excelaqua barbones	3 muestras suspendidas en RNAlater

Fuente: Autor

3.7.2 Extracción de ADN

La segunda parte de este proyecto de investigación, consta de las extracciones de ADN con dos distintos métodos, uno mediante el protocolo de fenol – cloroformo y otro mediante el kit comercial de extracción Pure Link Tm.

3.7.2.1 Extracción de ADN, método con Fenol – Cloroformo

Para iniciar la extracción utilizando el método con fenol cloroformo se realiza en primera instancia la preparación de la muestra, que consiste en eliminar el líquido de transporte (RNAlater) de la muestra contenida en el tubo cónico, para luego agregar TEN y macerar hasta homogenizar la muestra de larvas por completo, ver figura 9.

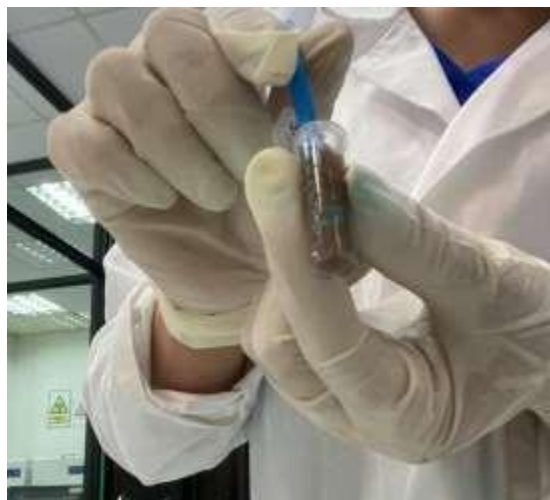


Figura 9 Maceración de la muestra con TEN. Fuente: Autor

Luego, de la maceración se procedió a incubar los tubos a 65 °C, se centrifugaron y enfriaron a -20 °C, el sobrenadante encontrado fue trasferido a nuevos tubos. Quedando las muestras listas para proceder con la extracción de ADN.

3.7.2.1.1 Extracción de ADN

Para la extracción se añade SDS y ARNasa a los tubos cónicos y se incubaron a 37 °C para añadir luego fenol con un pH exacto de 6.6 y llevarlo al vórtex homogenizando antes de centrifugar y finalmente transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Siguiendo, se añadió cloroformo y fenol con una proporción 1:1, se agitó y se procedió a centrifugar, se repitió el proceso una vez más para asegurar una limpieza del material genético, quedando como resultado un sobrenadante que se dividió en dos partes iguales en nuevos tubos cónicos y finalmente se añadió etanol absoluto y acetato sódico para almacenarlo durante una hora a -20 °C.



Figura 10 Proceso de limpieza de inhibidores para lograr un ADN limpio, mediante fenol cloroformo. Fuente: Autor

Se procedió a centrifugar y se eliminó el sobrenadante resultante, se añadió etanol y se volvió a centrifugar. Los tubos se dejaron secar con la tapa abierta dentro de una cámara de flujo laminar durante una hora y para finalizar la extracción se procedió a añadir TE, se dejó re suspender a una temperatura de 4 °C durante toda la noche. Se puede revisar el protocolo detallado en el anexo 2.

3.7.2.2 Extracción de ADN con Kit PureLink Tm

El protocolo de extracción utilizado fue el descrito por el fabricante, el protocolo detallado se encuentra establecido en el anexo 3. El proceso de extracción se preparó las muestras de larvas, se eliminó el líquido de transporte (RNAlater) de los tubos cónicos y luego se pesaron 0.2 g de muestra en un tubo denominado *bead tube*. Seguido, se añadió el reactivo *Lysis Buffer* y se agitó hasta dispersar completamente el contenido de los tubos, luego, se añadió el reactivo *Lysis Enhancer* y se volvió agitar.

Los tubos se incubaron a 65 °C, para seguido centrifugar los tubos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadió el reactivo *Cleanup Buffer* y se agitó para lograr una dispersión completa y así eliminar la mayoría de inhibidores, se realizó una nueva centrifugación y se volvió a transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadió el ADN resultante a una *Spin Colum*, colocamos el reactivo *Binding Buffer*, se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso.

La *Spin Colum* se colocó en un nuevo tubo y para lavar el ADN se agregó el reactivo *Wash Buffer*, se procedió a centrifugar y se eliminó el líquido por completo, la *Spin Colum* se colocó en un nuevo tubo y se agregó *Elution Buffer*, se centrifugaron los tubos y se transfirió el eludido que contenía ADN sobre la *spin común* y se repitió la elución para obtener una mayor concentración de ADN y para finalizar la extracción se descartó la columna.



Figura 11 Finalización de la extracción de ADN mediante el protocolo del kit comercial PureLink Tm. Fuente: Autor

3.7.2.3 Cuantificación de ADN

El ADN de larvas de camarón resultante de las extracciones se cuantificó con un fluorómetro, el equipo comercial Qubit, ver figura 12, para proceder con la cuantificación de las muestras, inicialmente se calibró el equipo con la ayuda de los estándares 1 y 2 proporcionados por el fabricante. El equipo posee un sistema que ofrece la lectura de ADN, ARN y proteínas, en este caso se seleccionó la lectura de ADN doble cadena. En un tubo cónico se añadió 10 uL de muestra de ADN obtenido mediante las extracciones de ADN con los dos métodos, más 190 uL de la solución de trabajo, preparada con anterioridad siguiendo lo descrito por el fabricante con los reactivos proporcionados por el mismo, el volumen final del tubo cónico fue de 200 uL.

Se prepararon las muestras para la lectura con cada ADN extraído, se dejó reposar un minuto para continuar con las lecturas, los tubos se colocaron en la cámara de muestras del equipo y las lecturas se visualizaron en la pantalla táctil del Qubit, los resultados obtenidos con un stock de 10 uL fueron mayores a 100 ng/mL.



Figura 12 Qubit, lectura de ADN con un stock de 10 uL visualizado en la pantalla del equipo. Fuente: Autor

3.7.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab 20, en donde se escogió la técnica más óptima para encontrar si existía una diferencia entre los métodos de extracción de ADN utilizados, los métodos seleccionados fueron:

- Un estadístico Anderson - Darling
- Un análisis estadístico ANOVA de un solo factor
- Estadístico Tuckey para la comparación de los métodos de extracción

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei*

Para la extracción del ADN de camarón se utilizaron dos métodos diferentes, un método convencional con fenol cloroformo utilizando el protocolo descrito en el proyecto de investigación de Sánchez y colaboradores (2016), con el aumento de dos lavados en proporción 1:1 de fenol y cloroformo y mediante un kit comercial denominado PureLink Tm, en el cual se utilizó el protocolo de extracción descrito por el fabricante, se realizaron dos extracciones con cada método para asegurar los resultados, en total se obtuvieron 12 muestras de ADN de larvas de *Penaeus vannamei* mediante el método convencional modificado y seis muestras de ADN de larvas de *Penaeus vannamei* mediante la extracción por kit comercial.

4.1.1 Resultados de la cuantificación de ADN

Las concentraciones de ADN obtenidas de la primera extracción realizada por los dos métodos se describen en la tabla 7 y los resultados de la segunda extracción se describen en la tabla 8, mediante el método convencional modificado se obtuvieron dos alícuotas por cada muestra de larvas de *Penaeus vannamei* y mediante el kit comercial PureLink Tm una sola alícuota de ADN.

El promedio de las concentraciones de ADN de larvas de *Penaeus vannamei* obtenidas en la primera extracción mediante el método convencional por fenol cloroformo fue de 184 ng/mL y la concentración promedio de ADN de larvas de camarón mediante el método por Kit comercial PureLink Tm fue de 208.33 ng/mL, ver gráfica 1. Se pudo observar que la extracción mediante el kit comercial fue el que mejor resultado presentó en sus extracciones, siendo partidarias de las mismas muestras de larvas provenientes de cada laboratorio de larvicultura.

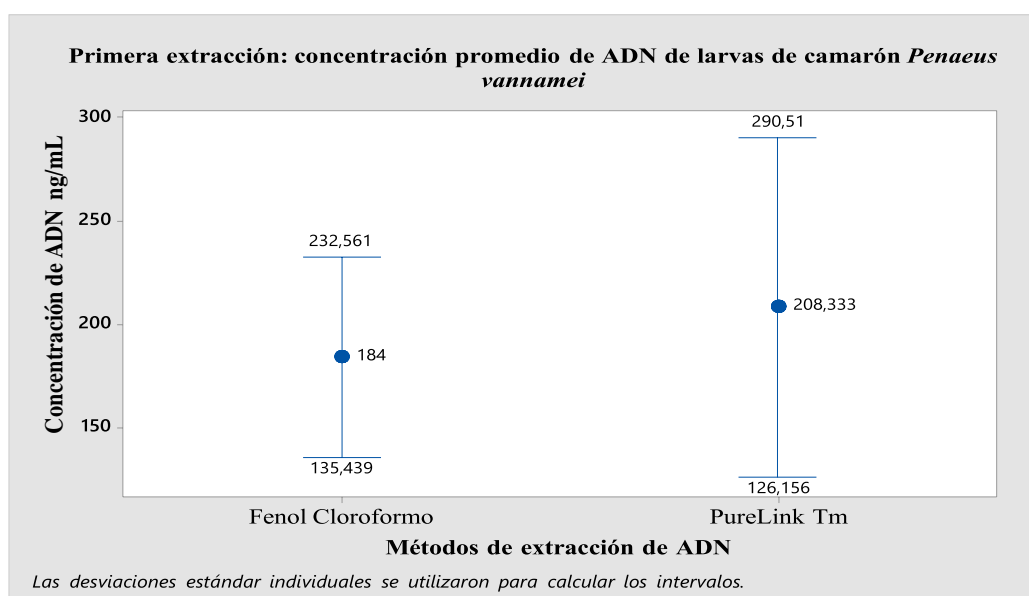
Y para la segunda extracción las concentraciones promedio de ADN fueron 168.33 ng/mL para el método convencional modificado y de 153.067 ng/mL para las concentraciones de ADN extraídos mediante el kit comercial PureLink Tm, ver gráfica 2, los resultados en la segunda

extracción pueden inferirse a el aumento de lavados con fenol cloroformo que se utilizarpin en la segunda extracción.

Tabla 6 Resultados de la primera extracción de ADN, por los dos métodos: Fenol - Cloroformo y PureLink Tm

Laboratorios de larvicultura	Método convencional	Método Kit PureLink TM
	modificado por fenol cloroformo ADN ng/mL	ADN ng/mL
Reina del Cisne	A: 234 ng/mL B: 224 ng/mL	184 ng/mL
Exelaqua bajo alto	A: 148 ng/mL B: 163 ng/mL	246 ng/mL
Exelaqua Barbones	A: 214 ng/mL B: 121 ng/mL	195 ng/mL
Promedio	184 ng/mL	208.33 ng/mL

Fuente: Autor

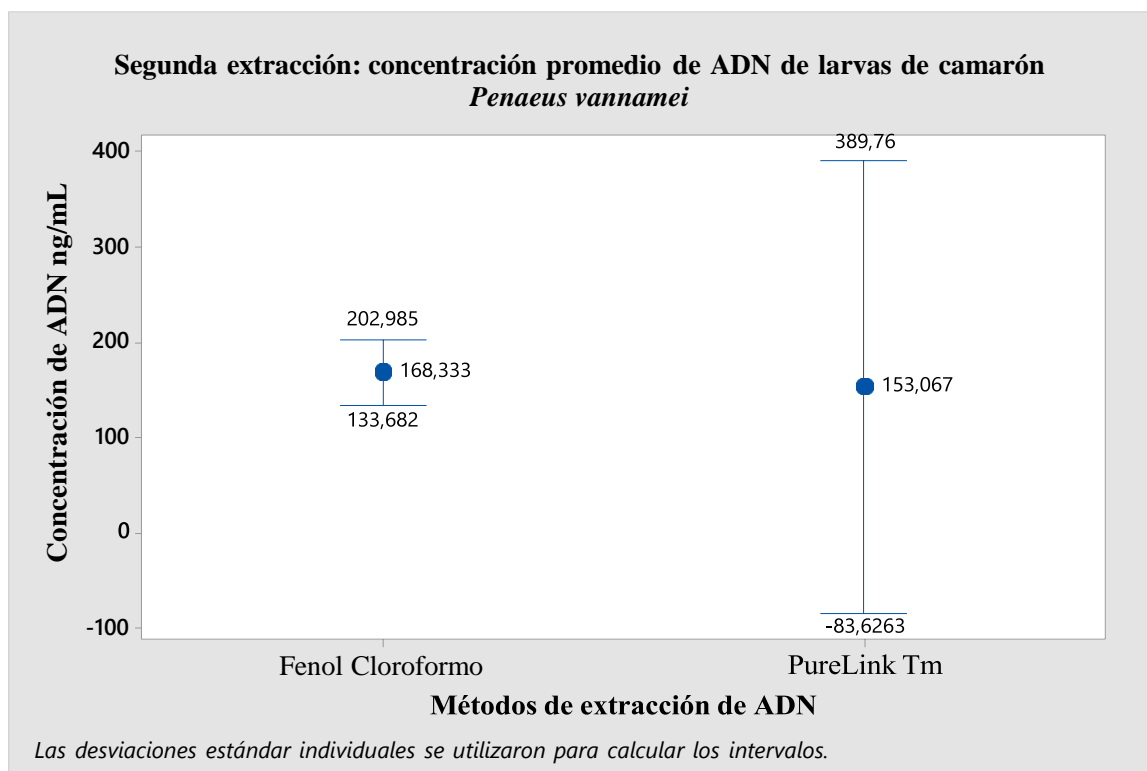


Gráfica 1 Primera extracción: Concentración promedio de ADN de larvas de camarón. Fuente: Autor

Tabla 7 Resultados de la segunda extracción de ADN, por los dos métodos: Fenol - Cloroformo y PureLink Tm

Laboratorios de larvicultura	Método convencional	Método Kit PureLink TM ADN ng/mL
	modificado por fenol cloroformo ADN ng/mL	
Reina del Cisne	A: 118 ng/mL	240 ng/mL
	B: 186 ng/mL	
Exelaqua bajo alto	A: 160 ng/mL	168 ng/mL
	B: 218 ng/mL	
Exelaqua Barbones	A: 160 ng/mL	51.2 ng/mL
	B: 168 ng/mL	
Promedio	168.33 ng/mL	153.067 ng/mL

Fuente: Autor



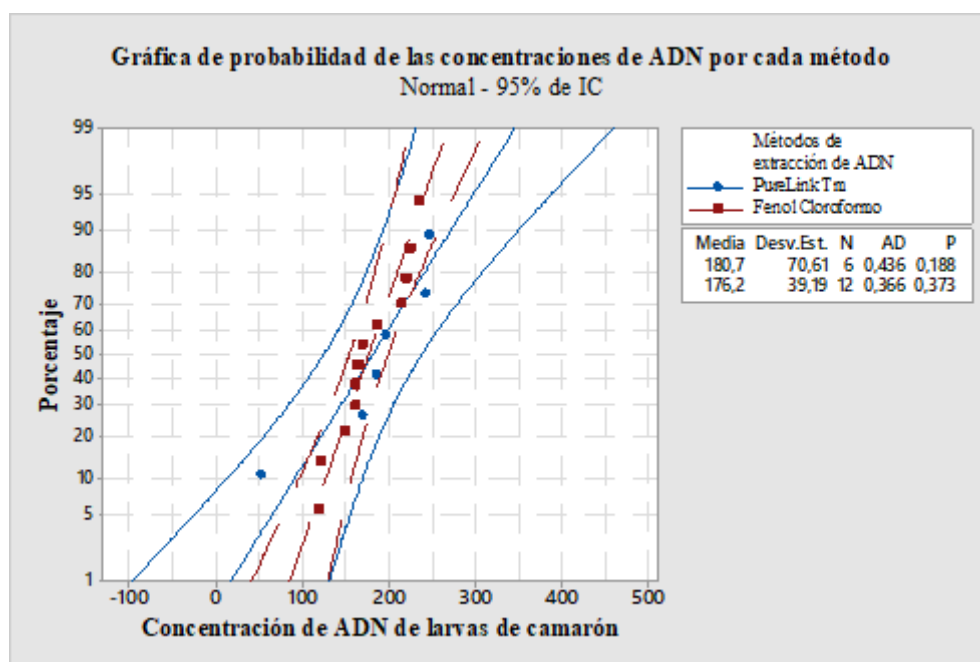
Gráfica 2 Segunda extracción: concentración promedio de ADN de larvas de camarón. Fuente: Autor

4.1.3 Análisis estadístico para la concentración de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei*

Los métodos de extracción de ADN, método convencional y kit comercial de extracción, se compararon con relación a las concentraciones obtenidas, primero se realizó una prueba de normalidad y seguido de un estadístico de Anderson – Darling, para verificar si los datos siguen una distribución específica. Las pruebas se realizaron para cada conjunto de datos obtenidos de los distintos métodos de extracción ocupados, tanto para la primera extracción como para la segunda.

4.1.3.1 Resultados del estadístico de probabilidad y Anderson – Darling de las concentraciones ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei* extraídos por los dos métodos

La prueba probabilidad y de Anderson Darling, ver gráfica 3, para las concentraciones de ADN extraídos obtuvo un valor de P de 0.188, para el kit de extracción PureLink Tm y el valor de P para el método convencional modificado fue de 0.373, los valores resultantes fueron mayores al del nivel de significancia de 0.05, con lo que se comprueban datos normales.



Gráfica 3 Prueba de probabilidad y Anderson - Darling de las concentraciones de ADN de larvas de camarón. Fuente: Autor

Una vez comprobado que los valores de las concentraciones sean datos normales se procedió a plantear las hipótesis alternativa y nula, para poder desarrollar el estadístico ANOVA, la hipótesis se detalla en la tabla 10 a continuación.

Tabla 8 Planteamiento de hipótesis

Nivel de confianza	Significancia	H. Nula	H. Alternativa
95%	$\alpha = 0.05$	Las medias son iguales	Las medias son diferentes

Fuente: Autor

Seguido, se realizó el análisis de la varianza, con datos separados para niveles de factor individuales, tomando en consideración que se están comparando distintos métodos con tamaños de muestra diferentes. Se realizó el estadístico ANOVA, para los datos de las concentraciones de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei*, el análisis se detalla en la tabla 11.

Tabla 9 Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
Factor	1	82.2	82.20	0.03	0.861
Error	16	41821.2	2613.82		
Total	17	41903.4			

Fuente: Autor

El análisis de varianza para las concentraciones de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei* obtuvo como resultado un valor de p de 0.861, valor mayor al del nivel de significancia de 0.05, con lo cual se aceptó la hipótesis nula y se rechazó la hipótesis alternativa, demostrando que las medias no son distintas.

A continuación, se realizó el estadístico de Tuckey, para confirmar lo establecido anteriormente en el análisis de varianza, en la prueba se identificaron como resultados, una similitud en las letras de las agrupaciones, esto demostró que los métodos ocupados para la extracción de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei* no son significativamente diferentes, a continuación, en la tabla 12 se describe el análisis.

Tabla 10 Comparación en parejas de Tuckey

Factor	N	Media	Agrupación
Método PureLink			
Tm	6	180.7	A
Método			
convencional Fenol - Cloroformo	12	176.2	A

Nota: Las medias que no comparten la misma letra, son significativamente diferentes.

Fuente: Autor

El estadístico de Tuckey comprueba el estadístico de ANOVA realizado, demostrando que los métodos ocupados para las extracciones de ADN de larvas de camarón no son significativamente diferentes, esto quiere decir que tanto el método convencional mediante fenol – cloroformo resultó ser similar en cuanto a resultados de concentraciones de ADN al Kit de extracción comercial PureLink Tm.

4.2 Discusión

Los métodos para la extracción de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei* ocupados en este proyecto de investigación no son específicamente estandarizados para este tipo de muestras, los métodos se eligieron luego de un estudio bibliográfico, comprendiendo que el método convencional mediante fenol cloroformo ha demostrado buenos resultados con

cualquier tipo de muestra (Lopera *et al.*, 2008) y el kit comercial PureLink Tm por su triple lisis a la hora de extraer el material genético, además por ser específico para muestras con gran cantidad de bacterias (Scientific, 2015), tal como son las muestras de larvas de camarón (Garibay *et al.*, 2020).

Luego de la comparación de la efectividad en cuanto a calidad y cantidad de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei* extraído mediante ambos métodos se pudo observar que los resultados fueron similares, en la cuantificación y en la cualificación del ADN. Trabajos parecidos se han presentado con diferentes crustáceos, Rodríguez (2017), lo menciona en su estudio de extracción de ADN de *M. carcinus*, en donde se utilizó un método convencional con fenol cloroformo y un kit comercial ENZA, en donde los dos métodos obtuvieron la misma eficiencia. Las medias de las concentraciones de ADN de larvas de camarón obtenidas en este estudio mediante el método convencional modificado en las dos extracciones fueron de 176.165 ng/mL, y la concentración media obtenida mediante el kit comercial PureLink Tm fue de 180.6985 ng/mL, se observó que no existió gran diferencia entre ambos métodos.

En la cualificación se pudo observar mediante electroforesis que las bandas generadas no fueron claras y los tamaños de fragmentos en la mayoría de las concentraciones fue de 100 pares de bases, esto demostró que no existió diferencia entre el método convencional modificado y el kit de extracción comercial en cuanto a la calidad de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei* obtenidas.

Los resultados se pueden inferir por la gran presencia de inhibidores que existe en la muestra, las larvas recolectadas en un estadio de PL 7 tienen su morfología totalmente desarrollada, en donde el hepatopáncreas y el intestino del camarón *Penaeus vannamei* se componen de una gran cantidad de ácidos nucleicos, fosfolípidos y triglicéridos (Carrillo &

González, 2000), factores que en la etapa de lisis dentro de extracción pudieron haber interferido para la completa purificación del material genético.

Gonzales (2011), recomienda doble preparación previa de la muestra antes de la extracción sobre todo muestras que contengan ácidos biliares y grasos, que en este caso se contenían en el intestino de las larvas de camarón *Penaeus vannamei*, la preparación de las muestras consisten romper las cadenas saturadas, ocupando calor mezclado con métodos químicos y físicos.

Para la segunda extracción realizada en este proyecto se siguió la recomendación de Salazar y colaboradores (2015), que mencionaba un aumento de lavados con fenol cloroformo en el método de extracción de ADN convencional para eliminar inhibidores como ARN y proteínas, mostrando en los segundos resultados un leve aumento en las concentraciones de ADN obtenidas mediante la lectura con el equipo Qubit.

Los resultados obtenidos servirán para estudios posteriores como estudios de metagenómica y secuenciación ya que se cumple con la concentración mínima necesaria para estos estudios que es de 100 ng/mL (Necochea & Canul, 2004).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Culminadas las extracciones realizadas de ADN de larvas de camarón *Penaeus vannamei*, se puede concluir que los dos métodos analizados, el método convencional mediante fenol cloroformo y el kit comercial PureLink Tm, resultaron ser sencillos en sus procedimientos, obteniendo una mayor concentración de ADN con el kit comercial PureLink Tm en la primera extracción y en la segunda extracción resultados con mayor concentración de ADN con el método mediante fenol cloroformo, debido al aumento de lavados con compuestos orgánicos en el protocolo.

En relación a lo expuesto se puede indicar qué, en la primera extracción el kit comercial PureLink Tm obtuvo mayor concentración de ADN de larvas de camarón, gracias a sus características de triple lisis y su membrana de sílice que ayuda a eliminar la mayoría de inhibidores que impiden la liberación del material genético, siendo la razón por la cual se decidió incorporar más lavados en el método convencional por fenol – cloroformo en la segunda extracción realizada, superando al kit comercial incrementando la concentración de ADN de larvas de camarón mediante el método convencional de extracción.

Por último, tras los análisis estadísticos aplicados en esta investigación se demostró que no existe una diferencia significativa entre los métodos de extracción ocupados para muestras de larvas de camarón *Penaeus vannamei*, si bien existe una diferencia en las concentraciones de ADN obtenidas, la evidencia no es suficiente para indicar que alguno de los dos métodos obtuvo mayor rendimiento frente al otro método de extracción de ADN, si bien el kit comercial PureLink Tm es más sencillo y más rápido de utilizar que el método convencional mediante fenol cloroformo, en relación costo beneficio se elegiría el método convencional modificado.

5.2 Recomendaciones

Con respecto a la recolección de muestras de larvas de camarón *Penaeus vannamei* se recomienda utilizar un mismo estadio de larvas, es decir larvas con el mismo gramaje, para poder realizar un correcto pool (macerado de la muestra) y obtener heterogeneidad en la muestra de la que se va a extraer el ADN.

Los métodos de extracción de ADN que se van a ocupar deben ser previamente estudiados y analizados para poder agregar o disminuir pasos dentro del protocolo a utilizar, modificando métodos según la muestra a estudiar, ya que no existen métodos estandarizados, como en este caso para larvas de camarón *Penaeus vannamei*.

En caso de utilizar el método convencional modificado mediante fenol cloroformo, se recomienda aumentar lavados con una proporción 1:1 de fenol cloroformo para poder obtener una mayor concentración de ADN.

Y la última recomendación que se realiza en este estudio es la motivación que deben tener los estudiantes para salir de su zona de confort y realizar estudios diferentes, proyectos dirigidos a líneas de investigación que no se están explotando, son muy pocos los análisis genéticos que se han realizado y mucho menos de especies que son de gran interés como el camarón blanco del Pacífico, considerado como producto estrella del Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1 Bibliografía

- Ali, I., Alharbi, O. M. L., & Marsin Sanagi, M. (2016). Nano-capillary electrophoresis for environmental analysis. *Environmental Chemistry Letters*, *14*(1), 79–98. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0547-x>
- Alicia, C., Peña, P., Dapena, J. D., Galisteo, E. M., Antonio, J., Ruiz, B., & Alfonso, G. (2015). *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. Rabanales.
- Alliance, G. (2009). INFORMACIÓN GENÉTICA BÁSICA. *Mid Atlantic*.
- Andriantahina, F. (2013, August). Current Status of Genetics and Genomics of Reared Penaeid Shrimp: Information Relevant to Access and Benefit Sharing. *Marine Biotechnology*, Vol. 15, pp. 399–412. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9500-9>
- Ardila, N. E., Navas, G. R., & Reyes, J. O. (2002). Libro rojo de invertebrados marinos de Colombia. *Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia*, (June), 177.
- Arevalo, N. (2014). *Diagnóstico del sector camaronero en el cantón el Guabo 2013*. Universidad Técnica de Machala, Machala.
- Argandona, L. (2016). Sector Camaronero: Evolución y proyección a corto plazo. *Fcshopina*, *87*(0). Retrieved from <http://www.test.revistas.espol.edu.ec/index.php/fenopina/article/view/100/107>
- Arias, F. G. (2012). El Proyecto de Investigación - Introducción a la metodología científica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). Editorial Episteme.
- Artiles, A., Rodríguez, I., Pérez, L., & Espinosa, G. (2011). Limitada variabilidad genética de la quinta introducción en Cuba de *Litopenaeus vannamei* estimada con el uso de marcadores microsatélites. Universidad de La Habana, UH, La Habana.

- Asencio, J. (2020). *CARACTERISTICAS GENERALES PARA EL CULTIVO DE CAMARON Y SU BIOLIGIA: MODULO DE TECNICAS DE CULTIVO DE CRUSTACEOS* . Guayaquil.
- Aspiazu, E., Granda, Y., & Mosquera, C. (2017). Ciencias Industriales. *Dominio de Las Ciencias*, 3(4), 369–380. <https://doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.4.jul>
- Ávila, J., Cutipa, B., Quispe, Z., & Sumiri, R. (2015). *Edta conceptos-basicos*. Universidad Andina.
- Borrell, Y. J., Espinosa, G., Vázquez, E., Sánchez, J. A., & Blanco, G. (2006). Variabilidad Genética de Loci Microsatélites en los Primeros Lotes de *Litopenaeus vannamei* Introducidos en Cuba para la Acuicultura. *Rev. Invest. Mar*, 27(3), 237–244.
- Briggs, M., Funge, S., Subashige, R., & Phillips, M. (2012). *Introducciones y movimiento de dos especies de peneidos en Asia y el pacífico*. Roma.
- Bustamante, J., Astudillo, M., Pazos, A., & Bravo, L. (2011). Evaluation of Two Methods DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues on Non-Optimal Conditions. *Biológica de Colombia*.
- Carrillo, F. O., & González, R. (2000). *Control de la digestión en camarones*. La Habana.
- Chomzynki, P. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Cisneros, A., & Feijóo, K. (2020). *Evaluación de dos métodos para la extracción de ADN de hepatopáncreas e intestino de camarón (P. vannamei) provenientes de piscinas camaroneras de la zona sur del país*. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca.
- CNA. (2016). Estadísticas – Cámara Nacional de Acuicultura.

- CNA. (2018). Nueva inversión para el sector camaronero – Cámara Nacional de Acuicultura. Retrieved November 5, 2019, from Camara Nacional de Acuicultura website: <https://www.cna-ecuador.com/nueva-inversion-para-el-sector-camaronero/>
- Cobo, R., & Pérez, L. (2018). Aspectos generales del cultivo y la genética del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Investigaciones Pesqueras*, 35, 1–6.
- Crouch, R. J. (2009). Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes. *FEBS Journal*, 276(6), 1494–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06908.x>
- Cuéllar, J., Lara, C., Morales, V., De, A., Oscar, G., Suárez, G., ... Panamá, S. (2010). *MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO PARA EL CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO Penaeus vannamei* *MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO PARA EL CULTIVO DEL CAMARÓN BLANCO Penaeus vannamei* ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA OIRSA ORGANIZACIÓN DEL SECTOR PESQUERO Y ACUÍCOLA DEL ISTMO CENTROAMERICANO (OSPESCA) PARTE DEL SISTEMA DE LA INTEGRACIÓN CENTROAMERICANA (SICA) Autores.
- De la Rosa, J. (2016). Detección molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo del camarón. *Scielo*, 16(3).
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, (45). <https://doi.org/10.3791/2565>
- Dewan, K. K., Taylor-Mulneix, D. L., Hilburger, L. J., Rivera, I., Preston, A., & Harvill, E. T. (2017). An Extracellular Polysaccharide Locus Required for Transmission of *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Infectious Diseases*, 216(7), 899–906. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix251>

- Direkel, Ş., Çopur Çiçek, A., Karagöz, A., Aydoğan Ejder, N., Oktay, E., Deualioğlu, N., ... Durmaz, R. (2016). Bir Üniversite Hastanesinde izole Edilen çok ilaca Dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılığı ve Moleküller Karakterizasyonu. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 50(4), 522–534. <https://doi.org/10.5578/mb.34158>
- Egusa, S. (1990). *Advances in Marine Biology* (VII). New York: Academic Press Limited.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. In FAO. Roma.
- Fenucci, J. (2016). *MANUAL PARA LA CRIA DE CAMARONES PENEIDOS*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/AB466S/AB466S00.htm>
- Fernández, M. (2015). *VIII REPRODUCCION DE LANGOSTINOS*. México.
- Fiedorová, K., Radvanský, M., Němcová, E., Grombiříková, H., Bosák, J., Černochová, M., ... Freiburger, T. (2019). The impact of DNA extraction methods on stool bacterial and fungal microbiota community recovery. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00821>
- Fraga, I., & Ceballos, B. (2011). Estrategias para optimizar el manejo del alimento en el engorde del camarón blanco del Caribe *Litopenaeus schmitti*. *AquaTic*, 35, 1–15.
- Fraga, N., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández, A. (2014). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Scielo*, 53(3).
- García, E. (2017). *Patología e inocuidad en sistemas acuícolas de camarón*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR.
- Garibay, E., Martínez, M., Calderón, K., Gollas, T., Martínez, L., Vargas, F., & Arvayo, M. (2020). La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva

histórica y estado del arte The gut microbiota of penaeid shrimp: a historical perspective and state of the art. *Biocencia*, 22(1), 6–16.

Garnica, F. (2016). "*Rediseño del Sistema Térmico Para la Producción de Nauplios de Camarón*". ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL, Guayaquil.

Gobierno Mexicano. (2018). Cultivo de camarón en Latinoamérica . *Veterinaria Digital Avicultura, Porcicultura, Rumiantes y Acuicultura*.

Godínez, S., Chávez, M., & Gómez, J. (2011). Acuicultura epicontinental del camarón *Penaeus vannamei*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1), 55–62.

Gómez, G., & Roque, A. (2018). *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Mazatlán.

Grist, S. M., Mourdoukoutas, A. P., & Herr, A. E. (2020). 3D projection electrophoresis for single-cell immunoblotting. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19738-1>

Kumar, A., Haddadi, S., Pourkarimi, M. R., Behera, B. K., & Panigrahi, P. K. (2020). Experimental realization of controlled quantum teleportation of arbitrary qubit states via cluster states. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70446-8>

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... Morgan, M. J. (2011). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>

Letchumanan, V., Chan, K., & Lee, L. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: A review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>

Lopera, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Silva Lopes, T. da. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y

- larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 77–86. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202008000100008>
- López-Hurtado, M., Cuevas-Recillas, K. N., Flores-Salazar, V. R., & Guerra-Infante, F. M. (2015). ADN de *Chlamydia trachomatis* en leucocitos de sangre periférica de neonatos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Monografías*, 33(7), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.019>
- Martos-Moreno, G. A., Sackmann-Sala, L., Berryman, D. E., Blome, D. W., Argente, J., & Kopchick, J. J. (2013). El proteoma del tejido adiposo subcutáneo muestra heterogeneidad anatómica. *Anales de Pediatría*, 78(3), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.10.010>
- McPadden, C. (1985). Breve estudio de la Industria Camaronera en el Ecuador. *Boletín Científico y Técnico*, 1(85), 1–68.
- Medina, D. (2018). *Evaluación de alimento enriquecido con *Dunaliella sp.* para incrementar la resistencia del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), a infecciones experimentales por *Vibrio parahemolyticus**. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C., La Paz.
- Mendoza, M. (2017). El camarón se consolida como el principal producto de exportación. *Líderes*, 1–3.
- Monroy, E., Fernández, C., Díaz, R., Martínez, G., Zaragoza, M., & Perurena, M. (2014). *Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR* (Vol. 23). La Habana.
- Moreno, F. (2010). Industria del camarón: su responsabilidad en la desaparición de los manglares y la contaminación acuática. *REDVET*, 11(5).

- Moyano, E. (2015). *PLAN DE NEGOCIOS* (Vol. 1). Lima: Macro EIRL.
- Necochea, R., & Canul, J. (2004). *Secuenciación de Ácidos Nucleicos*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ordoñez, R. (2010). *Importancia del sector camaronero de la provincia de El Oro en el Ecuador y su aporte a la recaudación total de impuestos, durante el periodo 2010 - 2011*. Univerdidadde Guayaquil, Guayaquil.
- Ordoñez, R. (2017). *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL FACULTAD DE INGENIERÍA MARÍTIMA CIENCIAS BIOLÓGICAS, OCEANOGRÁFICAS Y RECURSOS NATURALES Previa a la obtención del Título de: INGENIERO EN ACUICULTURA*. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil.
- Orfao, A., & Morent, M. (2015). *Red Nacional de Biobancos*. Retrieved from www.redbiobancos.es
- Parker, J. C., Conte, F. S., MacGrath, W. S., & Miller, B. W. (1974). AN INTENSIVE CULTURE SYSTEM FOR PENAEID SHRIMP. *Proceedings of the Annual Meeting - World Mariculture Society*, 5(1-4), 65-79. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1974.tb00179.x>
- Peña, N., & Varela, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Biología Marina y Oceanografía*, 51, 1-12.
- Plaza, M., & Nuñez, A. (2016). *Industria de Pesca ESTUDIOS INDUSTRIALES ORIENTACIÓN ESTRATÉGICA PARA LA TOMA DE DECISIONES*. Guayaquil.
- Quinga, M. (2012). *ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS FECALES DE LOBO DE PÁRAMO (Lycalopex culpaeus)"* .

Escuela Politécnica del Ejército , Sangolquí.

- Ratón, T. O. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. In *Rev Iberoam Micol* (Vol. 21).
- Ríos, E., Calleros, E., Gonzáles, A., Rubio, J., & Martínez, O. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotificación en población mexicana. *SciELO*, 26, 1–10. <https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2006). *Molecular methodology in Food Microbiology diagnostics: trends and current challenges*. <https://doi.org/10.1051/iufost:20060643>
- Rodríguez, J. (2017). Análisis comparativo de tres protocolos de extracción de ADN en cangrejo azul *Cardisoma crassum*, (Smith, 1870) del manglar del Cantón Eloy Alfaro, Esmeraldas-Ecuador, 2016. Retrieved February 20, 2020, from UPSE website: <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4265/1/UPSE-TBM-2017-038.pdf>
- Rojas, Haws, & Cabanillas. (2005). *Buenas Prácticas de Manejo Para el Cultivo de Camarón*. Hilo .
- Rojas, Haws, & Cabanillas. (2015). *Buenas Prácticas de Manejo Para el Cultivo de Camarón*. California.
- Sánchez, P. (2010). White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. *Veterinary Research*, 41(6). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010015>
- Sandoval, S., & Armendáriz, J. (2016). *Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* **BIOLOGÍA MOLECULAR**. Retrieved from www.mhhe.com/med/salazar_bmfa1e
- Schulz, E. C., Seiler, M., Zuliani, C., Voigt, F., Rybin, V., Pogenberg, V., ... Barabas, O. (2017). Intermolecular base stacking mediates RNA-RNA interaction in a crystal structure

of the RNA chaperone Hfq. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10085-8>

Scientific, T. F. (2015). *PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit Purification of high-quality microbial DNA from microbial culture and transport media samples.*

Sriket, C., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2011). Characterisation of proteolytic enzymes from muscle and hepatopancreas of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 52–59. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4145>

Varela, A., Peña, N., & Fernando, L. (2017). Acute hepatopancreatic necrosis: a review of the disease in *Penaeus vannamei*. *Agron. Mesoam*, 28(3), 735–745. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.27788>

6.2 Anexos

ANEXO 1: Visita a los laboratorios de larvicultura en la provincia de El Oro.



Figura 13 Recolección de larvas de los estanques de cultivo en el laboratorio Reina del Cisne. Fuente: Autor



Figura 14 Maceración de las larvas de camarón. Fuente: Autor



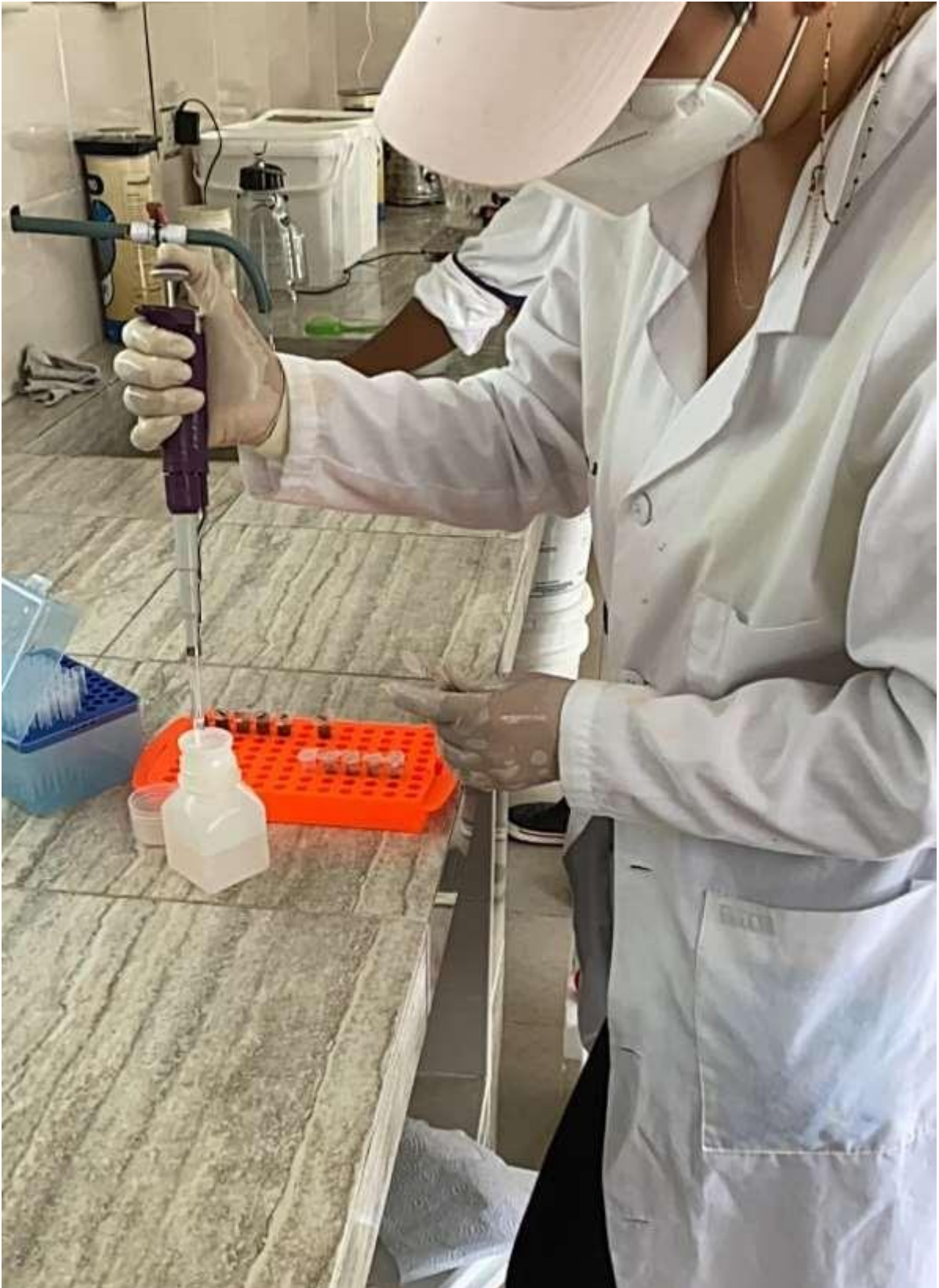
*Figura 15 Maceración de las larvas de camarón para ser suspendidas en RNAlater (reactivo de transporte).
Fuente: Autor*



Figura 16 Aplicación del método de recolección de muestras al azar por cuadrantes. Fuente: Autor



Figura 17 Método de cuadrantes para la recolección de la muestra, se repitió tres veces. Fuente: Autor



*Figura 18 Suspensión de las muestras de larvas de camarón *Penaeus vannamei* en RNAlater. Fuente: Autor*



Figura 19 Material esterilizado antes de la preparación de la muestra para el transporte a los laboratorios en Cuenca. Fuente: Autor

ANEXO 2: Protocolo convencional modificado por fenol cloroformo

a. Preparación de la muestra

1. Muestras de larvas de camarón de aproximadamente 1 g dentro de un tubo cónico de 2 mL, agregar 1 mL de TEN para maceración (mortero/maceradores en tubo).



Figura 20 Muestra de larvas de camarón más reactivo TEN siendo macerado. Fuente: Autor

2. Homogenizar la muestra macerada dentro del tubo agregando 1 mL más de TEN.
3. Llevar al vortex para agitar las muestras por 30 segundos.



Figura 21 Muestra en el vortex siendo homogenizada. Fuente: Autor

4. Incubar a 65 °C por 10 minutos en baño seco.
5. Centrifugar a 10 000 g por 10 minutos a 4 °C.



Figura 22 Centrifuga configurada a 10 minutos por 10 rg. Fuente: Autor

6. Enfriar a -20 °C por 7 minutos.
7. Centrifugar a 10 000 g por 10 minutos a 4°C.
8. Recuperar en otro tubo cónico de 2 mL nuevo, 1 mL del sobrenadante.



Figura 23 Extracción del sobrenadante y traspaso a un tubo nuevo. Fuente: Autor

b. Extracción de ADN

9. Añadir SDS a una concentración final del 1% (100 μ L), RNAsa a una concentración final de 0.1 mg/mL (11 μ L), e incubar a 37 °C durante 5 minutos.



Figura 24 SDS siendo añadido a los tubos. Fuente: Autor



Figura 25 RNAsa ocupada. Fuente: Autor

10. Añadir 1 volumen de fenol (1 mL) (pH 6.6) y agitar en un vortex durante 30 segundos.
11. Centrifugar a 16 000 g durante 5 minutos a 4 °C y transferir el sobrenadante (1 mL) a un tubo cónico de 2 mL nuevo.

12. Añadir un volumen de fenol (500 μ L) (pH 6,6): cloroformo (500 μ L) (1:1) y agitar en unvortex durante 30 segundos.
13. Centrifugar a 16 000 g durante 5 minutos a 4 °C y transferir el sobrenadante (1 mL) a un tubo cónico de 2 mL nuevo.
14. Añadir 1 volumen de cloroformo (1 mL) y agitar en un vortex durante 30 segundos.
15. Centrifugar a 16 000 g durante 5 minutos a 4 °C y transferir el sobrenadante (1 mL) dividido en dos alícuotas de 500 uL a dos tubos cónico de 2 mL nuevos.
16. Añadir a cada tubo 2 volúmenes de etanol absoluto (1 mL) a -20 °C + 1/10 volumen de acetato sódico (40 μ L) 3M (pH 5,2) y guardar a -20 °C durante un tiempo mínimo de 1 hora.



Figura 26 Muestras a una temperatura de -20 °C durante una hora. Fuente: Autor

17. Centrifugar a 16 000 g durante 15 minutos a 4 °C, descartar el sobrenadante, dar un pulso en la centrífuga y retirar lo que quede de sobrenadante con una micropipeta.
18. Añadir 1 mL de etanol 70%.
19. Centrifugar a 16 000 g durante 15 minutos a 4 °C, tirar el sobrenadante, dar un pulso en la centrífuga y retirar lo que quede de sobrenadante con una micropipeta.

20. Secar el precipitado en una campana de extracción durante 40-60 minutos, con la tapa del tubo cónico abierta.

21. Añadir 50 μ L de TE 1/10 (pH 7.5) sobre el precipitado y dejar que se resuspenda a 4 $^{\circ}$ C durante toda la noche.



Figura 27 Muestras suspendidas durante toda la noche. Fuente: Autor



Figura 28 ADN obtenido. Fuente: Autor

Anexo 3: Protocolo del kit de extracción comercial PureLink Tm

1. Añada 0.2 gramos de muestra y 600 uL de Lysis Buffer al Bead Tube.

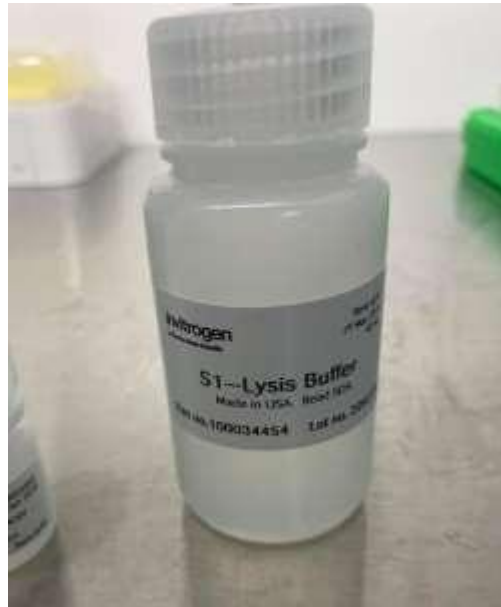


Figura 29 reactivo Lysis buffer. Fuente: Autor

2. Ponga en vortex hasta que la muestra se disperse en el líquido.



Figura 30 Muestras en el vórtex para dispersar la muestra. Fuente: Autor

2. Añada 100 uL de Lysis Enhancer y lleve al vortex brevemente.



Figura 31 Reactivo Lysis enhancer. Fuente: Autor

3. Incube la muestra a 65 °C por 10 minutos.



Figura 32 Incubadora configurada en 65 °C. Fuente: Autor

4. Homogenice la muestra utilizando el adaptador del vortex por 10 minutos a velocidad máxima.



Figura 33 Vórtex acompañado de su adaptador para agitar las muestras. Fuente: Autor

6. Centrifugue a 14 000 g por 5 minutos.
7. Transfiera hasta 400 uL del sobrenadante a un tubo nuevo.
8. Añada 250 uL de Cleanup Buffer y lleve al vortex de manera inmediata para asegurarse dispersión homogénea y eliminación de inhibidores (ácidos biliares, ácidos húmicos, etc.).



Figura 34 Colocación del reactivo Cleanup buffer. Fuente: Autor



Figura 35 Reactivo cleanup buffer. Fuente: Autor

9. Centrifugue a 14 000g por 2 minutos.
10. Transfiera hasta 500 uL del sobrenadante a un tubo nuevo, evite tocar el precipitado y cualquier residuo.



Figura 36 Eliminación del precipitado. Fuente: Autor

11. Ahora unirá el ADN a la columna “spin column”. Primero añada 900 uL de Binding Buffer y lleve al vortex brevemente.



Figura 37 Tubo adherido a una spin colum. Fuente: Autor



Figura 38 Reactivo binding buffer. Fuente: Autor

12. Cargue 700 uL de la mezcla en una columna (spin column) acoplada a un tubo.
13. Centrifugue a 14 000 g por 2 minutos. Descarte el sobrenadante y repita nuevamente.
14. Para lavar el ADN coloque la “spin column” en un tubo nuevo y añádale 500 uL de Wash Buffer.



Figura 39 Spin colum incorporada a un nuevo tubo. Fuente: Autor



Figura 40 Reactivo wash buffer. Fuente: Autor

15. Centrifugue a 14 000 g por 1 minuto.
16. Descarte el líquido y centrifugue nuevamente por 30 segundos a 14 000g para eliminar el Wash Buffer.
17. Coloque la “spin column” en un tubo nuevo y añádale 100 uL de Elution Buffer y deje a temperatura ambiente por 1 minuto.

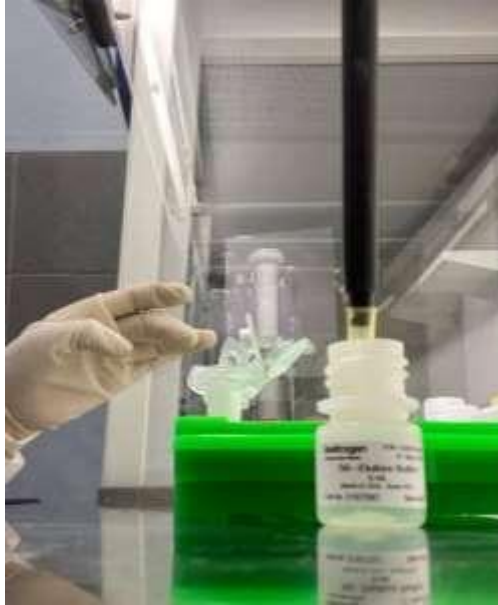


Figura 41 Incorporación del reactivo elution buffer. Fuente: Autor



Figura 42 Reactivo Elution buffer. Fuente: Autor

18. Centrifugue por 1 minuto a 14 000 g y descarte la columna.
19. El ADN purificado se encuentra en el tubo y se encuentra listo para uso o para almacenarlo.