

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

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

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

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE
HEPATOPÁNCREAS E INTESTINO DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*),
PROVENIENTES DE PISCINAS CAMARONERAS DE LA ZONA SUR DEL PAÍS”**

AUTORAS:

LILIAN ALEJANDRA CISNEROS QUEZADA

KAREN MELANIE FEIJÓO APONTE

TUTORA:

INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD.

CUENCA - ECUADOR

2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras, Lilian Alejandra Cisneros Quezada con documento de identificación N° 010784715 y Karen Melanie Feijóo Aponte con documento de identificación N° 0706559861, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE HEPATOPÁNCREAS E INTESTINO DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*), PROVENIENTES DE PISCINAS CAMARONERAS DE LA ZONA SUR DEL PAÍS”**, mismo que se ha desarrollado para optar el título de: *Ingeniero 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 por la Ley de Prioridad Intelectual, en nuestra condición de autoras, nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril de 2020



Lilian Alejandra Cisneros Quezada

C.I. 0104784715



Karen Melanie Feijóo Aponte

C.I. 0706559861

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE HEPATOPÁNCREAS E INTESTINO DE CAMARÓN (*Penaeus Vannamei*), PROVENIENTES DE PISCINAS CAMARONERAS DE LA ZONA SUR DEL PAÍS”**, realizado por Lilian Alejandra Cisneros Quezada y Karen Melanie Feijóo Aponte, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.



Inés Patricia Malo Cevallos, PhD.

C.I. 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, Lilian Alejandra Cisneros Quezada con documento de identificación N° 010784715 y Karen Melanie Feijóo Aponte con documento de identificación N° 0706559861, autoras del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE HEPATOPÁNCREAS E INTESTINO DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*), PROVENIENTES DE PISCINAS CAMARONERAS DE LA ZONA SUR DEL PAÍS”**, certificamos que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de nuestra exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, abril de 2020



Lilian Alejandra Cisneros Quezada

C.I. 0104784715



Karen Melanie Feijóo Aponte

C.I. 0706559861

DEDICATORIA

Esta tesis, la dedico a Dios por llenarme de paz y alentarme a seguir adelante pese a cualquier adversidad.

A mis ángeles que me cuidan desde la inmensidad por haberme enseñado el verdadero valor de la vida y el amor infinito, Ester y Carlos.

Alejandra

DEDICATORIA

Dedicó esta tesis a mis padres, Fausto Feijóo y Blanca Aponte, por haberme apoyado constantemente de muchas maneras, durante todo mi proceso universitario.

Pero, especialmente este trabajo va dedicado a quien me acompañó por cinco constantes años, que coincidieron con el inicio y final de mi carrera universitaria, me acompañó en mis largos días y largas noches, durante muchas horas de estudio y desvelo, sin importarle nada, ni esperar nada a cambio y hoy ya no me acompaña físicamente, pero siempre está conmigo desde un lugar especial, este trabajo es para ti, Neska.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros educadores, personas sabias que nos han brindado de su intelecto y su valioso tiempo, pero especialmente a la Dra. Inés Malo y a la Dra. Silvia Torres, que nos han apoyado en lo largo de este trabajo de investigación y más que docentes, se han convertido en verdaderas amigas.

A nuestros amigos quienes han sido pilares fundamentales durante nuestra carrera universitaria.

A la Universidad Politécnica Salesiana, por habernos brindado muchas oportunidades, por vernos crecer profesionalmente y ayudarnos a cumplir nuestros sueños.

También agradecemos a las diferentes camarógrafas, que nos brindaron de su apoyo para poder realizar el presente proyecto.

AGRADECIMIENTO

A Dios por siempre guiar mi camino y hacerme entender día a día que todo tiene su razón de ser.

A mis padres Fausto Feijóo y Blanca Aponte que, a pesar de la distancia que siempre nos separó, fueron y siguen siendo mi pilar fundamental, para cumplir mis metas y ser la persona que soy.

A mi padre en especial, que el día que me cambie de Ciudad para cumplir este sueño me dijo “Al destino no se lo forza, se lo forja”, palabras que me han servido en muchos momentos.

A mi madre, que siempre me tuvo presente en sus oraciones para cuidarme y bendecirme en todo momento.

Y por último y no menos importante, a mi fiel compañera de vida, Neska, quien siempre estuvo a mi lado sea cual sea la circunstancia, le agradezco hoy y siempre.

AGRADECIMIENTO

A Dios por no abandonarme y bendecirme siempre.

A mis Padres, Lilian y Rafael, por todo el amor, la paciencia y el esfuerzo de su trabajo, que me han llevado a concluir con mis metas.

A mi hermano, Christian, quien ha estado para mí cuando he necesitado de él.

A mi Abuelita, Margarita, por ser un ejemplo de humildad, superación y sacrificio, enseñándome a valorar todo lo que tengo.

Y a mi mejor amiga, Cookie, por saludarme con su cola llena de emoción y con una adorable sonrisa cuando llego a casa, liberándome de todo el estrés del día.

Alejandra

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT	xxii
CAPITULO 1.....	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
General:	4
Específicos:	4
1.6 Hipótesis.....	4
1.7 Justificación.....	5
1.8 Limitaciones	5
CAPITULO 2.....	6
2.1 Estado del arte	7
2.2 Bases teóricas.....	8
2.2.1 Industria pesquera	8
2.2.2 Acuicultura en Ecuador	9
2.3 El camarón blanco (<i>Penaeus vannamei</i>).....	10
2.3.1 Clasificación taxonómica	12

2.3.2 Ciclo de vida	12
2.3.3 Estadios larvarios	13
2.3.4 Alimentación y comportamiento	16
2.3.5 Ecología.....	16
2.3.6 Requerimientos ambientales	17
2.3.7 Distribución Geográfica	18
2.4 Etapas para el cultivo de camarón.....	18
2.4.1 Cultivo de larvas	18
2.4.2 Sistemas de cultivo.....	19
2.4.3 Siembra del estanque.....	19
2.4.4 Enfermedades en el camarón <i>P. vannamei</i>	19
2.4.5 Cosecha del camarón <i>P. vannamei</i>	21
2.5 Genética en acuicultura	21
2.5.1 Genética del camarón blanco <i>P. vannamei</i>	21
2.6 Extracción de ADN	22
2.6.1 Método de extracción fenol – cloroformo	23
2.6.2 Método de extracción PureLink TM microbiome	24
2.7 Cuantificación de ADN.....	26
2.7.1 Pureza de ácido nucleicos	26
2.7.2 Qubit.....	27
2.7.3 Nanodrop	27

2.7.4 Electroforesis.....	28
CAPITULO 3.....	30
3.1 Nivel de Investigación.....	31
3.2 Diseño de investigación	31
3.3 Variables	31
3.4 Población y muestra	31
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	32
3.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	32
3.7 Procedimiento	32
3.7.1 Fase 1. Obtención de la muestra.....	32
3.7.2 Fase 2. Extracción de ADN.....	36
3.7.3 Fase 3. Análisis estadístico de la extracción de ADN.....	42
CAPITULO 4.....	43
4.1 Extracción de ADN de camarón <i>P. vannamei</i>	44
4.1.1 Resultados de la cuantificación de ADN.....	44
4.1.2 Resultados de la cualificación de ADN.....	47
4.1.3 Análisis estadístico para la concentración de ADN de <i>P. vannamei</i>	50
4.2 Discusión.....	54
CAPITULO 5.....	58
5.1 CONCLUSIONES	59
5.2 RECOMENDACIONES	60

BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de un camarón en vista lateral.....	11
Figura 2 Anatomía de camarón <i>P. vannamei</i> , resaltando el tracto digestivo; estómago, hepatopáncreas e intestino.. ..	12
Figura 3 Ciclo biológico del camarón <i>P. vannamei</i>	13
Figura 4 a. Nauplio en sub estadio I. b. Nauplio en sub estadio V. Se puede observar los cambios producidos en el primer estadio larvario.....	13
Figura 5 c. Protozoa I, d. Protozoa II, e. Protozoa III. Se observan los cambios presentes en los tres sub estadios de zoea.....	14
Figura 6 a. Mysis I, b. Mysis II, c. Mysis III. Se observan los cambios presents en estos tres sub estadios de Mysis.....	15
Figura 7 d. Esquema lateral del estadio de Post larva del camarón <i>P. vannamei</i>	15
Figura 8 Mapa obtenido de Google Earth, muestra la distribución del camarón <i>P. vannamei</i> a lo largo del océano Pacífico.....	18
Figura 9 Esquema del sistema convencional de electroforesis en gel de agarosa, se observa la cámara de electroforesis en forma de rectángulo, se identifica el polo positivo y negativo, el gel en forma cuadrada y sus pocillos	29
Figura 10 Piscina camaronera en Bagén, Provincia de Santa Elena	33
Figura 11 Piscina camaronera en la parroquia Hualtaco, ciudad de Huaquillas en la Provincia de El Oro.....	33
Figura 12 Macerado y toma de muestra aleatoria de la mezcla de hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i>	34
Figura 13 Macerado y toma de muestra aleatoria de la mezcla de intestino de <i>P. vannamei</i> ..	34
Figura 14 Muestra de hepatopáncreas suspendida en RNA later.....	35
Figura 15 Muestra de Intestino suspendida en RNA later	35

<i>Figura 16 Maceración de la muestra de intestino junto con el reactivo TEN.....</i>	<i>37</i>
Figura 17 Fase grasa generada en la muestra de hepatopáncreas.	37
Figura 18 Bead tubes con 0.2g de la muestra de camarón <i>P. vannamei</i> más 600 uL de lysis buffer.....	38
Figura 19 Equipo Qubit utilizado para la lectura de cantidad de ADN	40
Figura 20 Equipo Qubit, destacando la pantalla táctil donde se reflejan los resultados.	40
Figura 21 Se observa la cámara de electroforesis con el gel cargado de muestras de ADN ...	41
Figura 22 Fotodocumentador E-Gel Imager, junto al software Ligh Blue Base	41
Figura 23 Primera electroforesis.....	48
Figura 24 Segunda electroforesis.....	48
Figura 25 Tercera Electroforesis.....	49
Figura 26 Cuarta electroforesis.....	50
Figura 27 Camaronera Valeria, en la provincia de El Oro, en Huaquillas.	70
Figura 28 Camaronera Valeria, piscina 1, coordenadas: 3°22'57" S, 80°7'39" O.....	70
Figura 29 Camaronera Valeria, piscina 2, coordenadas: 3°23'1" S, 80°7'37" O.....	71
Figura 30 Camaronera Valeria, piscina 3, coordenadas: 3°22'57" S, 80°7'41" O.....	71
Figura 31 Camaronera Rodríguez en la provincia de El Oro en Arenillas.	72
Figura 32 Camaronera Rodríguez: piscina 1, coordenadas 3°30'35" S, 80°11'30" O.....	72
Figura 33 Camaronera Rodríguez, piscina 2, coordenadas: 3°30'36" S, 80°11'29" O.....	73
Figura 34 Camaronera Rodríguez, piscina 3, coordenadas: 3°30'34" S, 80°11'23" O.....	73
Figura 35 Camaronera Camarosa de la provincia de El Oro, en Machala, piscina 1.	74
Figura 36 Camaronera Camarosa, piscina 2.	74
Figura 37 Camaronera Camarosa, piscina 3.	75
Figura 38 Camaronera en Chanduy, Provincia de Santa Elena, piscina 1.	75
Figura 39 Camaronera en Chanduy, piscina 2.	76

Figura 40 Camaronera en Chanduy, piscina 3.	76
Figura 41 Camaronera Bagen, piscina 1. En esta camaronera debido a sus restricciones no se pudieron capturar más fotografías.....	77
Figura 42 Recolección de camarones, en la provincia de Santa Elena.	78
Figura 43 Recoleccion de camarones, en la provincia de El Oro.	78
Figura 44 Macerado de la muestra mezclada con TEN	79
Figura 45 Muestra macerada con 2 mL de TEN.....	79
Figura 46 Agitado de las muestras en vórtex para mejorar la homogenización	80
Figura 47 Incubadora con las muestras de ADN en su interior	80
Figura 48 Centrifuga configurada para el proceso.....	81
Figura 49 Muestras almacenadas a -20° C.....	81
Figura 50 Extracción de la primera capa que contiene alta cantidad de grasa.....	82
Figura 51 Traspaso del sobrenadante a tubos cónicos nuevos	82
Figura 52 Muestra con SDS y RNAsa lista para proceder a incubar	83
Figura 53 Muestra con fenol para luego agitar en el vórtex	83
Figura 54 Sobrenadante transferido a un tubo cónico nuevo	84
Figura 55 Fenol utilizado en el proceso con un pH de 6,6.....	84
Figura 56 Centrifuga configurada a 5 minutos para obtener el nuevo sobrenadante.....	85
Figura 57 Vórtex listo para la agitación.....	85
Figura 58 Tubos de 1,5 mL con la muestra dividida en alícuotas de 500 µL	86
Figura 59 Todas las muestras divididas en las dos alícuotas de 500 µL cada una	86
Figura 60 Sobrenadante desechado con cuidado, para la obtención del pellet	87
Figura 61 Etanol siendo agregado a las muestras en una cámara de extracción.....	87
Figura 62 Interior de centrifuga donde las muestras son colocadas de manera que no se ocasione un desequilibrio.....	88

Figura 63 Retirado del sobrenadante con con la ayuda de una micropipeta	88
Figura 64 Tubos cónicos con tapas abiertas dentro de una campana de extracción para secado del precipitado.....	89
Figura 65 Muestra luego de una hora en la campana de extracción	89
Figura 66 Muestras con TE (pH:7,5)	90
Figura 67 Solución S1: Lysis Buffer.....	91
Figura 68 Pesado de muestra dentro de cada bead tube.....	91
Figura 69 Muestras en los bead tubes más lysis Buffer antes de ir al vórtex	92
Figura 70 Solución S2: Lysis Enhancer	92
Figura 71 Muestras sometidas a 65° C	93
Figura 72 Las muestras nuevamente sometidas a agitación en el vórtex.....	93
Figura 73 Centrifuga programada a 5 minutos	94
Figura 74 Transferencia del sobrenadante con ayuda de una micropipeta	94
Figura 75 Sobrenadante en un nuevo tubo	95
Figura 76 Solución S3: Cleanup Buffer	95
Figura 77 Reactivo colocado en cada muestra con una micropipeta	96
Figura 78 Centrifuga configurada a 2 minutos	96
Figura 79 Transferencia del sobrenadante a otro tubo	97
Figura 80 Solución S4: Binding Buffer	97
Figura 81 Reactivo siendo agregado a los tubos con columnas adaptadas	98
Figura 82 Tubos con columnas para el proceso.....	98
Figura 83 Centrifuga programada para el proceso.....	99
Figura 84 Solución S5: Wash Buffer	99
Figura 85 Muestras en centrifuga programada para el proceso	100
Figura 86 Reactivo wash buffer agregado a las muestras	100

Figura 87 Solución S6: Elution Buffer	101
Figura 88 Aplicación de la segunda elución	101
Figura 89 Muestras colocadas en la centrifuga	102
Figura 90 Columna desechada para obtener el ADN.....	102
Figura 91 Tubos rotulados con el ADN obtenido3	103

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Intervalos con una confianza del 95% y promedio de la concentración de ADN de intestino de <i>P. vannamei</i> , extraído mediante dos protocolos.	46
Gráfica 2 Intervalos con una confianza del 95% y promedio de la concentración de ADN de hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> , extraído mediante dos protocolos.	46
Gráfica 3 Probabilidad para datos de las concentraciones de ADN de intestino, extraídos por ambos métodos.....	51
Gráfica 4 Probabilidad para datos de las concentraciones de ADN de hepatopáncreas, extraídos por ambos métodos	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica del camarón blanco (<i>Penaeus vannamei</i>).....	12
Tabla 2 Alimentación y comportamiento de los estadios del camarón P. vannamei.	16
Tabla 3 Enfermedades más relevantes que atacan al cultivo de camarón P. vannamei.....	20
Tabla 4 Soluciones que provee el Kit PureLink TM Microbiome y sus funciones	25
Tabla 5 Provincias y camaroneras de donde se recolectaron las muestras y su cantidad	36
Tabla 6 Datos de las concentraciones de ADN (ng/mL), del intestino y hepatopáncreas del camarón <i>Penaeus vannamei</i>	45
Tabla 7 Planteamiento de Hipótesis.....	52
Tabla 8 Análisis de varianza para las concentraciones de ADN de intestino	52
Tabla 9 Análisis de varianza para las concentraciones de ADN de hepatopáncreas	53
Tabla 10 Detalles del método Tuckey para concentraciones de ADN de intestino, con una confianza de 95%	53
Tabla 11 Detalles del método Tuckey para concentraciones de ADN de hepatopancreas, con una confianza de 95%	54

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se caracterizaron dos métodos para la extracción del ADN de intestino y hepatopáncreas de camarón (*Penaeus vannamei*), se seleccionó un kit comercial de extracción “PureLink™ microbiome” y un método convencional modificado por fenol cloroformo. Los dos métodos demostraron una efectividad y similitud en cuanto a sus protocolos para la obtención del ADN de intestino, mientras que, para el ADN de hepatopáncreas, se presentó complejidad con el kit comercial y una diferencia significativa entre los protocolos, debido a la presencia de inhibidores en la muestra. Los promedios de las concentraciones de ADN obtenidos fueron, por el método convencional modificado; para intestino 518.96 ng/mL y para hepatopáncreas 496.4 ng/mL y con el kit comercial los promedios de las concentraciones de ADN fueron; para intestino 111.5 ng/mL y para hepatopáncreas 67.76 ng/mL. En cuanto a la pureza del ADN, se observó mayor entereza en los resultados electroforéticos por parte del kit comercial, sin embargo, se concluyó que el método convencional modificado es más aceptable y eficiente por los resultados presentes en sus concentraciones de ADN y además, se podría alcanzar mayor pureza, incrementando lavados con cloroformo o incorporando columnas de filtración en el protocolo de extracción.

ABSTRACT

In the present research study, two methods for DNA extraction from the intestine and hepatopáncreas of shrimp (*Penaeus vannamei*) were characterized, a commercial extraction kit “PureLink™ microbiome” and a conventional method modified by phenol chloroform were selected. The two methods presented an effectiveness and similarity in terms of their protocols for obtaining DNA from the intestine, while for hepatopáncreas DNA complexity with the commercial kit and a significant difference between the protocols, due to the presence of inhibitors in the sample. The averages of the DNA concentrations obtained were, by the modified conventional method; for intestine 518.96 ng/mL and for hepatopáncreas 496.4 ng/mL and with the commercial kit the average of the DNA concentrations were; for the intestine 111.5 ng/mL and for the hepatopáncreas 67.76 ng/mL. Regarding DNA purity, greater integrity was observed in the electrophoretic results by the commercial kit, however, it was concluded that the modified conventional method is more acceptable and efficient because of the results present in its DNA concentrations and because, it could achieve greater purity, increasing washes with chloroform or incorporating filtration columns in the extraction protocol.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

El camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*), es nativo de la costa oriental del océano Pacífico desde el estado de Zamora México, hasta el noroeste del Perú (FAO, 2016). La industria camaronera empieza en el Ecuador a finales de la década de los sesenta, la explotación inicia en pampas salinas o salitrales y por su rentabilidad, se extiende a tierras agrícolas y manglares.

En los ochenta, esta actividad crece un 600 %, posicionando al Ecuador a nivel mundial entre los primeros exportadores de camarón (*Penaeus vannamei*), alcanzando gran importancia económica en el país hasta el momento (Machado, 2013).

Los estudios genéticos emergen siendo parte fundamental de la biotecnología, revolucionando los estudios de diversidad de especies y metagenómica, sin embargo, el protocolo de aislamiento del ácido nucleico es uno de los puntos más críticos en este tipo de investigaciones debido a la heterogeneidad de las muestras (González, 2011).

Para eliminar estas interferencias se recurre al uso de kits de extracción comerciales para la obtención del ADN, en distintas especies de crustáceos se han utilizado kits basados en lisis celular y precipitación del ADN, no obstante, se sabe que el uso de kits puede interferir en la interpretación de los resultados (Carrigg, 2009). Esto lleva a la necesidad de evaluar nuevas técnicas de extracción de ADN que aseguren el éxito de los resultados para posteriores estudios.

La obtención de ADN de buena calidad y en cantidad adecuada, es un aspecto fundamental para el éxito de cualquier iniciativa que apunte a un estudio genético. La finalidad de este estudio es evaluar dos métodos de extracción de ADN, un kit de extracción (PureLink™) frente a un método convencional modificado, y luego identificar entre los dos métodos cual es mejor en términos de eficiencia y costos.

1.2 Antecedentes

La importancia del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) radica en su demanda para consumo humano a nivel mundial. Aunado a ello, la acuicultura de camarón se ha convertido en una excelente actividad que garantiza y repercute económica y socialmente en Ecuador. En este sector, de acuerdo con datos proporcionados por la Cámara Nacional de Acuicultura, se registran 187 empresas, las cuales en la actualidad reportan alrededor de unas 210 000 hectáreas dedicadas al cultivo de camarón (Argandona, 2016). De acuerdo con Sotelo, (2019), los nuevos estudios genéticos hasta el momento han contribuido a la identificación de novedosos componentes de la respuesta innata e inmune del camarón. De igual manera se buscan soluciones para la acuicultura ecuatoriana, según Hendrix Genetics, en sociedad con Nutreco y Ecuacultivos, se invertirá en Ecuador para establecer un laboratorio de camarones de última generación y se centrará en proporcionar tecnología genética para reproducción avanzada. Antonio Camposano, presidente de la Cámara Nacional de Acuicultura, informo que para la industria camaronera es una excelente noticia, ya que, esta actividad de inversión beneficiará en la competitividad de la producción. (CNA, 2018).

1.3 Problema de Investigación

El camarón blanco del Pacífico es el producto de mayor exportación en el Ecuador según la Cámara Nacional de Acuicultura, encontrar un protocolo estandarizado de aislamiento de ácido nucleico de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) que sea económico y eficiente, es el reto de más dificultad en este estudio, debido a la heterogeneidad de las muestras en intestino y hepatopáncreas del crustáceo, por un lado el método convencional para la extracción de ADN es un método económico a comparación del kit de extracción (PureLink™), sin embargo, la eficiencia del kit de extracción es mayor, principalmente por ser un método que se realiza en menor tiempo acortando la duración del estudio.

1.4 Formulación del problema o pregunta de investigación

¿Para qué se evalúa el método convencional modificado de extracción de ADN genómico en camarón frente al Kit de extracción PureLink TM?

1.5 Objetivos

General:

- Caracterizar dos tipos de métodos de extracción de ADN en camarón (*Penaeus vannamei*) mediante el análisis de resultados entre PureLink TM y método convencional modificado, para uso en metagenómica.

Específicos:

- Realizar toma de muestras de diferentes sitios del sur del Ecuador, efectuando visitas a camaroneras obteniendo variabilidad en la extracción de material genético, mediante los diferentes métodos.
- Confrontar los dos métodos de extracción de ADN en hepatopáncreas e intestino de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), obteniendo resultados en muestras de los diferentes sitios, determinando el método que aporte con una excelente calidad, así como cantidad de ADN.
- Comparar mediante un análisis estadístico cuál de los dos métodos es el mejor en obtención ADN para su posterior uso en matagenómica.

1.6 Hipótesis

El método convencional modificado para extracción de ADN genómico de camarón, podrá sustituir al Kit de extracción PureLink TM en términos de eficiencia y costos.

1.7 Justificación

Según Andriantahina, (2013), el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) contribuye al 95% de la producción de cultivo a lo largo del mundo, lo cual ha incrementado el interés en los estudios genéticos referentes a esta especie. Obtener un ADN de buena calidad y cantidad es el principal objetivo para cualquier estudio genético, se puede obtener mediante métodos convencionales que son largos pero económicos o con kits de extracción que por otro lado son más costosos, según cotizaciones realizadas por un comercializador de reactivos y equipos para biotecnología un kit de extracción PureLink TM para cincuenta muestras tiene un costo cercano a los 400 dólares y además puede presentar dificultades por la heterogeneidad de las muestras (Than, 2016). Para eliminar estas complicaciones se busca nuevos métodos convencionales modificados que sean simples, reproducibles, y económicos.

1.8 Limitaciones

La presente investigación se lleva a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca y en diferentes camaroneras del sur del Ecuador, ubicadas en las provincias de Santa Elena y El Oro, durante el lapso de seis meses. Debido a esto los limitantes serán: el tiempo de vida del camarón fuera de las piscinas de cultivo, traslados a diferentes camaroneras, permisos de acceso a las camaroneras, costos de reactivos de transporte para las muestras y además se toma en consideración el clima en las distintas provincias.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Estado del arte

En estudios genéticos es necesario contar con protocolos de extracción de ADN que sean eficaces, reproducibles y económicos, para especies específicas como los crustáceos, es por ello que se han empezado a adecuar protocolos de extracción de ADN ya existentes. Es el caso de la extracción de ADN para el langostino (*Macrobrachium carcinus*), en donde se adecuó la metodología de extracción de ADN bacteriano de suelos y sedimentos de (Rojas *et al.*, 2008), metodología que comprende la lisis enzimática, física, mecánica y química. Luego de una serie de ensayos Gonzales de la Cruz y colaboradores (2011), suprimió la lisis enzimática, también recalcó que el éxito de la extracción se debió a la preparación de las muestras, principalmente en el hepatopáncreas, en donde es necesario eliminar la fase grasa. La calidad de ADN se verificó con electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. A su vez con finalidad de establecer la metodología óptima para extraer el ADN del cangrejo azul (*Cardisoma crassum*), se analizaron tres protocolos diferentes, el Kit ENZA tissue DNA, Xiao o Fenol Cloroformo y Salino, seguido de análisis cualitativos (electroforesis en gel de agarosa) y cuantitativos en concentración y pureza (Nanodrop 2000). Las concentraciones obtenidas fueron sometidas a un análisis estadístico dando como resultado, una similitud significativa entre dos métodos; el kit comercial ENZA y el método con fenol cloroformo. En cuanto a concentración de ADN y a absorbancia se encontró similitud entre el Kit ENZA y el método Salino (Rodríguez, 2017).

Otros de los aspectos fundamentales para escoger un protocolo viable de extracción es que sean simples y no contaminantes, en el trabajo de comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larvas de peces de (Lopera-Barrero *et al.*, 2008), se comparó un protocolo modificado de extracción con sal común (NaCl) y un protocolo modificado con fenol cloroformo, dando como resultado ADN de buena calidad (relación DNA/RNA 1.8-2.2), mostrando la misma efectividad, el protocolo modificado con sal común constituye una alternativa y un remplazo eficaz para el protocolo modificado con fenol cloroformo.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Industria pesquera

La industria pesquera engloba al conjunto de actividades económicas que se dedican a la captura, extracción y la recolección de diferentes organismos acuáticos, entre los más importantes y explotados: peces, crustáceos y moluscos (Plaza & Nuñez, 2016).

En la pesca se utilizan dos tipos de artes, el directo o artesanal que son realizados por pescadores individuales o de manera grupal, realizando su actividad en embarcaciones limitadas, por otro lado, el procesamiento industrial en el que sus embarcaciones son de gran tamaño que incluyen refrigeración y usualmente pertenecen a compañías reconocidas, las mismas que pueden ser procesadoras de alimentos, debido a su amplio número de especies (atunes, pelágicos, anchoveta, pargo, corvina, camarón, etc.) que son capturadas (Plaza & Nuñez, 2016).

El cultivo de organismos acuáticos o acuicultura se da potencialmente en zonas costeras, implica intervención de operarios en el proceso de cría y así aumentar la producción. Es de los sectores más importantes de la producción alimentaria mundial, constituye una relevante fuente de empleo e ingresos por la producción de proteína que es sustento para gran parte de la población mundial (FAO, 2017).

Los recursos acuáticos que son capturados son recursos de acceso abierto, a diferencia de la acuicultura como tal que cuenta con los derechos de exportación. La pesca es una actividad productiva muy antigua, actividad que fue recurrida por la población en general con la única finalidad de obtener alimentos. Actualmente las producciones de alimentos con origen acuático se han visto en ascendencia, por ello el cultivo en ambientes controlados de gran cantidad de especies (Plaza & Nuñez, 2016).

Según la FAO, en Ecuador se cuenta con un aproximado de mil kilómetros de costas y derechos de los espacios marítimos que nos lleva a 1.3 millones de km^2 de mar que está ubicado frente a las costas continentales y alrededor de las islas Galápagos. Se registra un crecimiento anual de la producción pesquera de 1.4%, hasta el 2014 alcanzando 93.4 millones de toneladas métricas (TM).

2.2.2 Acuicultura en Ecuador

El origen de la acuicultura en el Ecuador empieza alrededor del año 1932, cuando en la Sierra ecuatoriana se introduce la trucha (*Salmo gairdneri*) para aumentar la población de lagos, lagunas y ríos. En los últimos años, esta actividad ha recibido un impacto relevante, se han dictado Decretos, Acuerdos y Resoluciones con fines de salvaguardar y armonizar los intereses del sector pesquero, entre los que se encuentra, El Reglamento para la Cría y Cultivo de Especies Bio acuáticas (Galvez, 2018).

En la actualidad la producción de camarón *P. vannamei* se considera como un destacado producto, debido a sus importantes características que tiene en su proceso de siembra, crecimiento y cosecha. Influyen mucho, los climas y ubicación geográfica que están relacionados con el crecimiento, calidad y trazabilidad del mismo. Es esta la razón por la que el Ecuador obtiene el segundo lugar a nivel mundial como productor y exportador del camarón *P. vannamei* (Plaza & Nuñez, 2016).

El camarón es un producto de alto valor que se produce principalmente en Asia y América Latina, fundamentalmente para su exportación (FAO, 2017). Es importante el proceso que ha tenido el sector camaronero, que se inició como un sistema de producción. Sin embargo, se estima una pérdida del 25% de la producción de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), debido al síndrome de muerte temprana, esta enfermedad afectó a todos los países de producción incluido Ecuador (Argandona, 2016).

En esta industria existen dos categorías que son; la producción y la exportación, según la Cámara Nacional de Acuicultura se registran 187 empresas que se dedican a las categorías antes mencionadas, teniendo 210 000 hectáreas que se dedican a la industria del camarón, la mayor parte de estas se encuentran en la provincia del Guayas (Argandona, 2016).

2.3 El camarón blanco (*Penaeus vannamei*)

Es una especie de camarón de la familia *Penaeidae*, se caracteriza por poseer un caparazón delgado y liso, también, segmentos abdominales con dientes, surcos y muescas dorsales (Fischer *et al.*, 1995). Tiene un rostro con nueve dientes superiores y dos inferiores al diente epigástrico. Una carina corta y surco también, terminados a nivel epigástrico y el caparazón sin carina en el resto dorsal. El macho tiene un órgano genital sin proyecciones distales en forma de elipse, y la hembra un órgano genital abierto, sin placas ni receptáculo seminal, ver figura 1 (Herrnkind & Lipcius, 2013).

El tracto digestivo del camarón *P. vannamei*, está compuesto por un intestino proximal, donde se encuentra el estómago y ocurre la masticación, el intestino medio o hepatopáncreas secreta enzimas digestivas y absorbe nutrientes, realiza metabolismo de lípidos y carbohidratos. Por último, el intestino distal, conformado por una estructura tubular, empezando en la parte dorsal del camarón y terminando en el ano, ver figura 2 (NRC, 2011).

El estómago de *P. vannamei* representa una actividad enzimática proveniente del hepatopáncreas o de otras fuentes, haciendo que el proceso digestivo se realice antes de que el alimento llegue al intestino. Durante este proceso los camarones poseen la capacidad de hidrolizar una gran variedad de oligosacáridos y polisacáridos (NRC, 2011). El tamaño de los camarones influye directamente en la actividad enzimática llevada a cabo por el hepatopáncreas que es la fuente principal de proteína en su dieta y así el nivel de proteína está directamente vinculada con el crecimiento del camarón (Carrillo & González, 2000).

Se conoce que las bacterias del tracto digestivo presentan una relación con el desarrollo en el crecimiento del hospedero (Nayak, 2010). El crecimiento y funcionamiento fisiológico y biológico del camarón está determinado por la presencia de bacterias en su tracto digestivo. Se pueden intuir sus funciones pero la mayoría de estas están pocamente exploradas y no demostradas (Garibay *et al.*, 2020).

La microbiota, la cual es compuesta por microorganismos asociados a animales y vegetales, es indispensable en el ciclo biológico del *P. vannamei* (Bordenstein & Theis, 2015). Las bacterias presentes en el tracto digestivo se asocian con procesos fisiológicos de fundamental importancia (Sommer & Bäckhed, 2013). Para el camarón *P. vannamei* estudios recientes han encontrado taxones vinculados con ambientes terrestres y marinos (Rungrassamee *et al.*, 2014). Lo que lleva a creer que la microbiota de la familia de los peneidos de igual manera está estrechamente ligada a su tracto digestivo y funciones biológicas (Garibay *et al.*, 2020).

Las bacterias presentes en el intestino de camarón se identificaron mediante características fenotípicas, que se encontraron en medios de cultivo, como por ejemplo, morfología, desarrollo y también respuestas metabólicas y bioquímicas (Bou *et al.*, 2011).

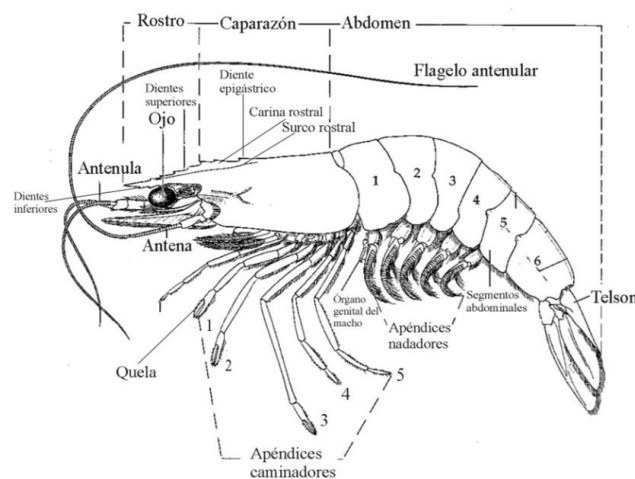


Figura 1 Esquema de un camarón en vista lateral. Fuente: (Ardila, Navas, & Reyes, 2002)

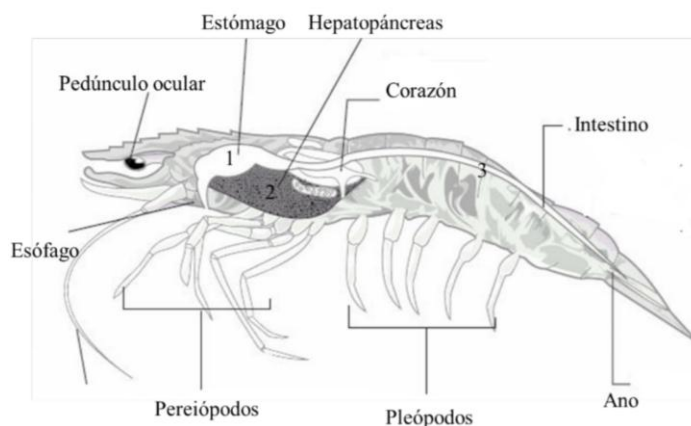


Figura 2 Anatomía de camarón *P. vannamei*, resaltando el tracto digestivo; estómago, hepatopáncreas e intestino. Fuente: (Bonda *et al.*, 2001).

2.3.1 Clasificación taxonómica

La siguiente tabla muestra la clasificación taxonómica del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*).

Tabla 1 Clasificación taxonómica del camarón blanco (*Penaeus vannamei*)

Orden	<i>Decapoda</i> - Latreille, 1803
Familia	<i>Penaeidae</i> – Rafinesque – Schmaltz, 1815
Especie	<i>Penaeus vannamei</i> (Boone, 1931)
Nombre común	Camarón patiblanco del Pacífico

Fuente: (Ardila *et al.*, 2002).

2.3.2 Ciclo de vida

La vida del camarón *P. vannamei* comienza cuando el macho deposita en la hembra un paquete de esperma, los huevos se maduran y pasan por varios estadios larvales. Empieza con nauplio, seguido de zoea y mysis, hasta alcanzar el estadio de post larva, ver imagen 3. Después de varias mudas se transforman en adultos donde su crecimiento es más rápido. Los machos por naturaleza se desarrollan antes que las hembras, la hembra espera la muda para realizar el apareamiento y con el carapacho o exoesqueleto blando, mientras que el macho debe tener su exoesqueleto duro. El número de desove fluctúa entre los 200 000 y 500 000 (Morales, 1990).

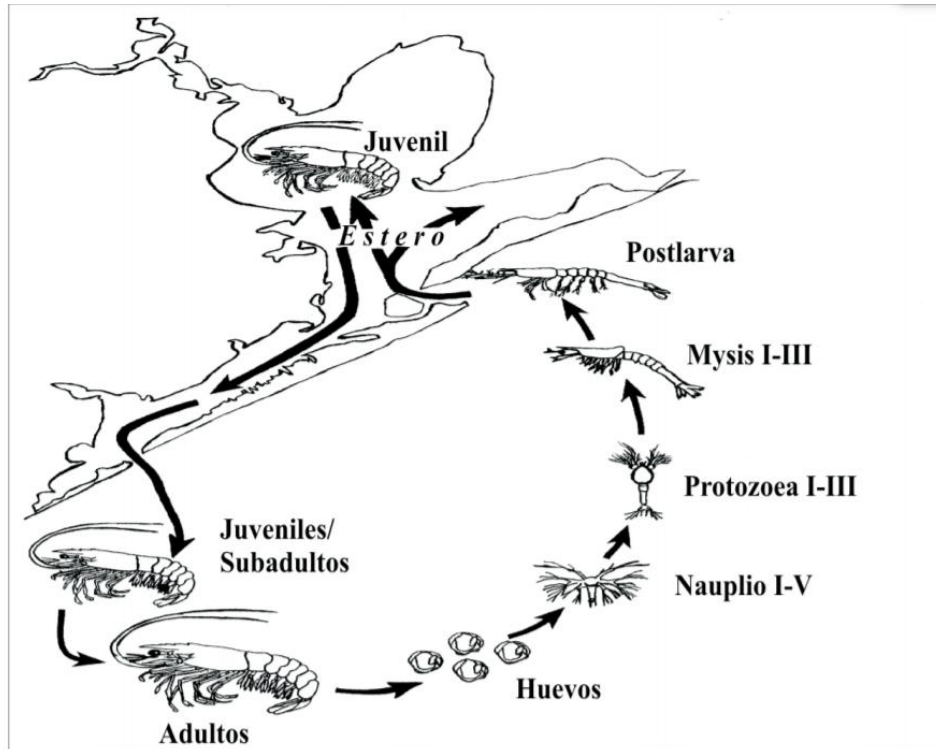


Figura 3 Ciclo biológico del camarón *P. vannamei*. Fuente: (López, 2010).

2.3.3 Estadios larvarios

Después de la fertilización, el huevo dura entre catorce a dieciséis horas para eclosionar, el siguiente estadio larvario se llama nauplio, en donde existen cinco sub estadios naupliares que duran entre cuarenta y cincuenta horas (Morales, 1990), con forma periforme, furca caudal, antena, anténula y mandíbula, a lo largo que va creciendo presenta variaciones en la antena y la furca caudal con el agregado de espinas (Fenucci, 2016).



Figura 4 a. Nauplio en sub estadio I. b. Nauplio en sub estadio V. Se puede observar los cambios producidos en el primer estadio larvario. Fuente: (Fenucci, 2016).

El estadio zoea es la primera muda que realiza el camarón, la cual se caracteriza por la diferenciación del cefalotórax con el abdomen y comienza a nadar hacia adelante. Se encuentran tres subestadios de protozoea (Cahuana, 2014); protozoea I, tiene caparazón sin espinas, abdomen no segmentado, telson bilobulado, ojo naupliar presente, protozoea II, caparazón con espina rostral, ojos compuestos y el tercer sub estadio, protozoea III, tiene el caparazón con espina rostral, ojos compuestos pedunculados, ver imagen 5 (Fenucci, 2016).

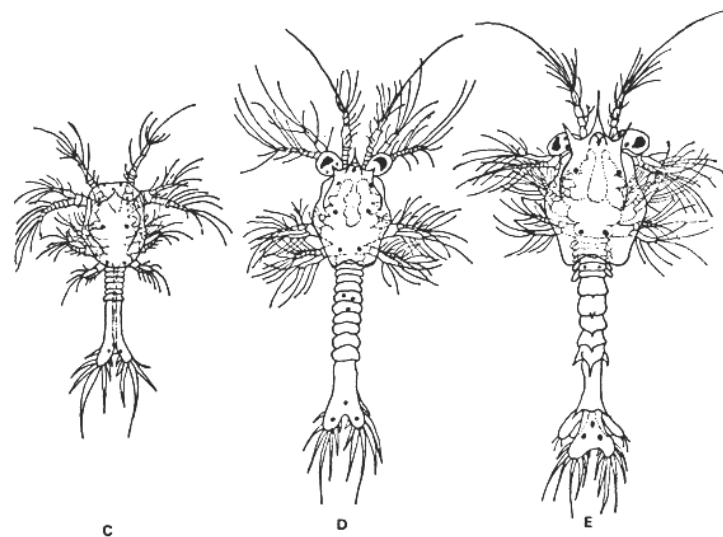


Figura 5 c. Protozoea I, d. Protozoea II, e. Protozoea III. Se observan los cambios presentes en los tres sub estadios de zoea. Fuente: (Fenucci, 1988).

El tercer estadio larvario del camarón *P. vannamei*, es mysis, los primeros cambios observables son el cuerpo encorvado en la región abdominal y nado mediante contracciones abdominales, en esta etapa se adaptan más fácilmente a cambios externos en el ambiente como la temperatura del agua y la salinidad (Ordoñez, 2017). Tiene tres sub estadios; mysis I, en donde el cuerpo ya se parece a un camarón, pereiópodos bien desarrollados y funcionales del primero al tercero con quela rudimentaria, pleón sin pleópodos, mysis II, sus pereiópodos del primero al tercero con quelas desarrolladas, pleópodos más desarrollados y bien articulados y mysis III, sus antenas con flagelos que sobrepasan o alcanza la escama, pleópodos más desarrollados y articulados, ver imagen 6 (Fenucci, 2016).

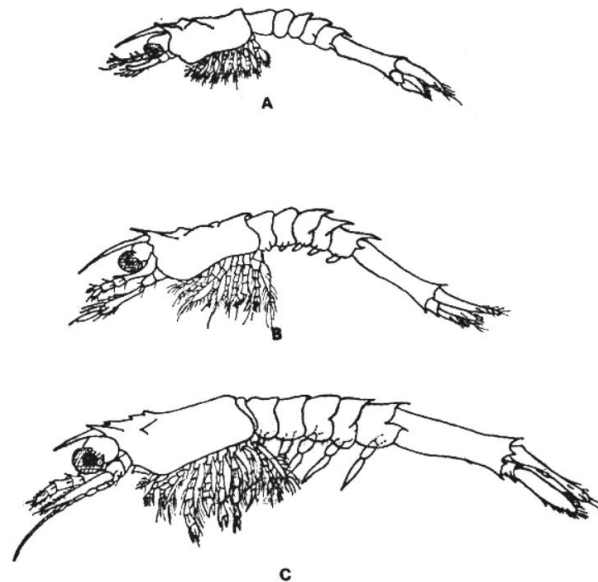


Figura 6 a. Mysis I, b. Mysis II, c. Mysis III. Se observan los cambios presentes en estos tres sub estadios de Mysis. Fuente: (Fenucci, 2016).

Luego de mysis, sigue el estadio de post larva, ver imagen 7, su rostro se vuelve más ancho y largo. La anténula va a presentar tres artejos basales y dos flagelos segmentados con cuatro sedas terminales. Los pleópodos sufren cambios significativos y presentan diez patas nadadoras articuladas. El primer par de pleópodos casi no se ven y tienen función secundaria sexual, el telson con forma rectangular y los urópodos se desarrollan completamente en forma de una aleta caudal. El caparazón se ajusta totalmente al cefalotórax y muestra una espina hepática bien definida (Cahuana, 2014).

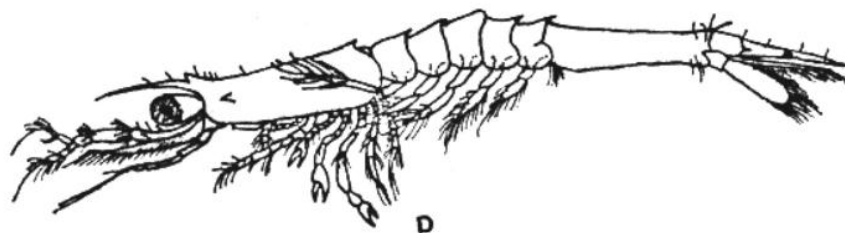


Figura 7 d. Esquema lateral del estadio de Post larva del camarón *P. vannamei*. Fuente: (Fenucci, 2016).

2.3.4 Alimentación y comportamiento

La siguiente tabla muestra los diferentes estadios larvales del camarón *P. vannamei*, con su respectiva forma alimentación y comportamiento.

Tabla 2 Alimentación y comportamiento de los estadios del camarón P. vannamei.

Estadio	Alimentación principal	Comportamiento
Huevo		Flota, tiene tendencia a depositarse en el fondo.
Nauplio	Sus propias reservas	Locomoción por antenas y son planctónicas.
Protozoa	Fitoplancton	Planctónicas, natación por apéndices cefálicos.
Mysis	Zooplancton	Planctónicas, natación por apéndices del tórax.
Post larva	Zooplancton	Los primeros estadios son planctónicos, luego de hábitos bentónicos, natación por pleópodos.

Fuente: (Fenucci, 2016).

2.3.5 Ecología

Es una especie característica de los fondos lodosos, entre 5 y 72 metros de profundidad (Herrnkind & Lipcius, 2013), lodos constituidos por porciones de arena, limo y arcilla, esta especie tiende a enterrarse (Fenucci, 2016). Los adultos se encuentran en ambientes netamente marinos, mientras que la cría y levante se desarrollan en los estuarios y lagunas salobres hasta alcanzar la fase adulta (Moreno, 2007).

2.3.6 Requerimientos ambientales

Según menciona Kumlu *et al.*, (2000), los factores abióticos más relevantes que influyen en la supervivencia del camarón *P. vannamei* son, la temperatura y la salinidad, debido a que la variación de estos parámetros los llevan a estresarse y afectan su capacidad de adaptarse a cambios ambientales en su estadio post larvario (Ordoñez, 2017).

Por lo general cada estadio conlleva un rango óptimo de temperatura y salinidad para su desarrollo normal. Las larvas se desarrollan en temperaturas entre veinticinco y treinta grados Celsius (°C), con salinidades entre veintiocho y treintaicinco partes por tonelada (ppt). En cuanto a post larvas se observa una tolerancia en los cambios de estas variables. Según Bray & Lawrence (1994), los juveniles y adultos que se encuentran en estuarios, manglares y lagunas, son los que mejor se adaptan y soportan las condiciones abióticas.

La concentración de oxígeno disuelto –OD- en el agua es vital, se ha comprobado que produce alta mortalidad cuando supera las dos partes por millón (ppm), y cuando la concentración del oxígeno disuelto disminuye provoca enterramiento. Este parámetro varía según la temperatura y el peso del camarón, se ha registrado que para animales entre tres gramos y dieciséis gramos, a una temperatura de veintitrés grados Celsius varía entre 135 y 77 cc/kg/hora, mostrando un mayor consumo en los animales de mayor peso (Egusa, 1990).

Para el potencial de hidrógeno, pH, según la FAO (2006), la concentración óptima se encuentra entre 7 y 8.5. El aumento o la disminución de este factor puede producir daños y efectos letales para el camarón *P. vannamei*. La concentración de amonio al igual que el pH es un parámetro interviniente dentro de los requerimientos ambientales del ciclo biológico de esta especie, los valores de amonio aumentan según la carga bacteriana o el exceso de materia orgánica, en post larvas este valor no debe ser mayor a 2 miligramos sobre litro (Ordoñez, 2017).

2.3.7 Distribución geográfica

Se distribuye a lo largo de toda la costa americana del océano Pacífico, desde el golfo de California, hasta el Ecuador (Herrnkind & Lipcius, 2013), en aguas cuya temperatura es normalmente superior a veinte grados Celcius (°C), durante todo el año. El camarón *P. vannamei* se encuentra en ambientes tropicales.

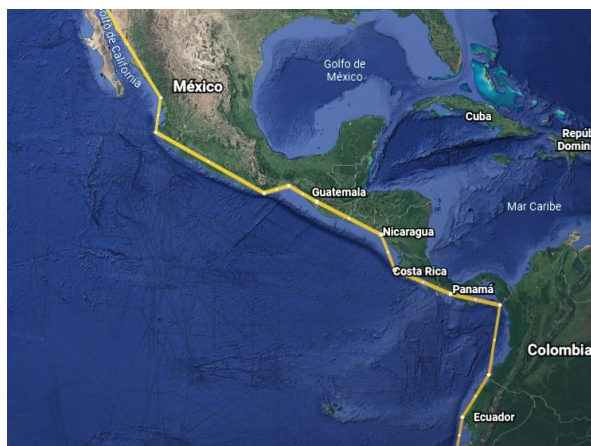


Figura 8 Mapa obtenido de Google Earth, muestra la distribución del camarón P. vannamei a lo largo del océano Pacífico.

2.4 Etapas para el cultivo de camarón

Para el cultivo de camarón se debe seguir un proceso arduo, desde la obra de mano hasta la tecnología utilizada. Hay cinco puntos claves para una buena producción, que se presenta a continuación.

2.4.1 Cultivo de larvas

La producción de larvas se puede dar en diferentes sistemas, un sistema especializado con controles ambientales y coordinados, o pequeños no sofisticados. Los estanques se construyen con concreto, fibra de vidrio o recubiertos con materiales plásticos. Las larvas se crían hasta PL 10 o 12 (Briggs & Phillips, 2004). La alimentación en esta fase se basa en la combinación de algas monoespecíficas, artemia y alimento artificial. El técnico decide la dosis según su criterio y experiencia para que la larva tenga una dieta completa y balanceada (Calderón, 1993).

2.4.2 Sistemas de cultivo

Se pueden clasificar en cuatro; extensivo, semi intensivo, intensivo y súper intensivo. En Ecuador la producción camaronera es semi intensiva, para pequeños y grandes productores, este tipo de sistema no genera un gran impacto al ambiente (Arevalo Talledo, 2014).

Los estanques de cultivo semi intensivos miden de una a cinco hectáreas de largo y uno o dos metros de alto, se siembran semillas que son producidas en incubadoras, el camarón se alimenta de productos naturales de dos a cuatro veces al día (FAO, 2006).

2.4.3 Siembra del estanque

El éxito del cultivo se basa en la siembra y para esto se deben realizar monitoreos consecutivos al estanque, verificar parámetros físico químicos y biológicos para asegurar que el agua este aceptable para recibir a las post larvas, también, se suele realizar tratamientos al agua del estanque con fertilizaciones, aplicaciones de melaza y con pro bióticos (Cuéllar *et al.*, 2010).

Se siembran de diez a treinta post larvas por metro cuadrado (FAO, 2006). Para determinar la densidad de siembra se consideran la talla y la edad proyectada para cosechar, la calidad del agua y el diseño del estanque (Cuéllar *et al.*, 2010).

2.4.4 Enfermedades en el camarón *P. vannamei*

El aspecto de mayor importancia en el cultivo de camarón *P. vannamei* se relaciona con la salud del camarón, la falta de evaluaciones periódicas de enfermedades que produce que se diseminen con mayor facilidad y en cortos tiempos a todo el estanque, produciendo alta mortalidad, incluso hasta la desaparición total de la población del estanque (Cuéllar *et al.*, 2010). En la siguiente tabla se describen las enfermedades con mayor relevancia en el cultivo de camarón *P. vannamei*.

Tabla 3 Enfermedades más relevantes que atacan al cultivo de camarón *P. vannamei*

Enfermedad	Agente	Tipo	Síndrome	Medidas
Mancha Blanca	WSSV	Virus	El camarón	Desinfectar los
	White Spot Syndrome Virus		infectado manifiesta reducción en el consumo de alimentos, letargo y alta mortalidad.	nauplios con formalina y aislar los productores. Mantener la temperatura a 30 °C. Evitar el estrés y usar alimento fresco.
Necrosis hepatopancreática aguda	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	Bacteria	Menor alimentación y alta mortalidad. Decoloración roja del camarón y necrosis interna.	Desinfectar las instalaciones y utilizar alimentos vivos.

Fuente: (Parker, Conte, MacGrath, & Miller, 1974; Varela, Peña, & Fernando, 2017)

Las enfermedades son principalmente introducidas a través del camarón adulto importado, pájaros y por humanos visitantes de otros estanques. También se toma en consideración el estrés y los problemas crónicos de la calidad del agua, como nivel bajo de oxígeno disuelto, concentraciones altas de amonio, desajustes de pH y temperaturas extremas (Haws, Boyd, & Green, 2001).

2.4.5 Cosecha del camarón *P. vannamei*

Un buen manejo de la cosecha asegura una buena calidad del producto y con ello evita pérdidas económicas para la empresa, se debe asegurar un buen abastecimiento de agua, y contar con todo el material y equipo desinfectado cerca del lugar de cosecha (Rojas, Haws, & Cabanillas, 2015).

El camarón cosechado se maneja de manera rápida y eficiente, debe ser congelado estando vivo para evitar su deterioro. Los camarones en sospecha de contaminación se desinfectan con cloro, siguiendo las normas oficiales establecidas por la sanidad acuícola. La concentración usada para desinfección es de 10 ppm, el camarón se coloca en el recipiente con agua, cloro y hielo para darle un baño de inmersión. Durante la cosecha se evita por completo animales domésticos y operarios que presenten alguna enfermedad o heridas (Rojas *et al.*, 2015).

2.5 Genética en acuicultura

La mejoría en la calidad del agua de cultivo de camarón, así como, el diagnóstico temprano de enfermedades es gracias al progreso genético (Andriantahina *et al.*, 2013) La genética en el cultivo de organismos acuáticos influye directamente en la supervivencia, en el uso adecuado de recursos, en una protección ambiental y consigo disminuye los costos (Borrell *et al.*, 2006).

2.5.1 Genética del camarón blanco *P. vannamei*

La genética es una herramienta necesaria para la sostenibilidad y el crecimiento de la acuicultura como industria. Las técnicas de análisis moleculares han beneficiado y potenciado a los programas de selección de especies, con el objetivo aumentar la variabilidad genética es necesario establecer blancos reproductores con niveles altos de heterocigosidad, estudios realizados en Cuba han llevado a cabo la caracterización genética de poblaciones de especies de camarones, se han producido cinco introducciones del camarón *P. vannamei* (Cobo & Pérez, 2018).

2.6 Extracción de ADN

El punto de partida para un estudio genético es la obtención del ácido desoxirribonucleico pudiendo ser de dos grandes grupos; el ADN plasmídico y el ADN cromosómico, aún obteniendo pequeñas cantidades es posible amplificar genes específicos (Gonzales & Luis, 2003). Las moléculas de ADN están construidas por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice, los nucleótidos comprenden un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada; adenina, guanina, timina y citosina (Patricia *et al.*, 2015).

La extracción se basa en el aislamiento y purificación del ADN, el procedimiento consta de tres etapas consecutivas, primero una lisis celular o disgregación de los tejidos o células, aquí se procede a destruir las estructuras formadas por lípidos y proteínas permitiendo la liberación del ADN, seguido, una inactivación de las nucleasas intracelulares y finalmente la separación del ADN de los demás componentes celulares (Orfao & Morent, 2015).

Se necesitan seguir criterios primordiales para la elección de métodos de extracción como el tipo de ácido nucleico que se va a extraer; ácido desoxirribonucleico cadena sencilla, ácido desoxirribonucleico doble cadena o ácido ribonucleico mensajero, tomar en consideración la muestra de la que proviene el ácido nucleico, mamífero, planta, procariota o virus y la fuente que puede ser; tejido, sangre, cultivo celular y por último la técnica que se utilizará según los futuros tratamientos que vayan a aplicarse al ácido nucleico, que requerimientos necesita el estudio, pureza, tiempo de extracción y rendimiento (Sandoval & Armendáriz, 2016).

Se han diseñado métodos de extracción con el objetivo de eliminar potenciales riesgos para sus posteriores tratamientos. Existen métodos tradicionales que emplean solventes orgánicos para realizar soluciones y el protocolo dura algunas horas o hasta varios días. Comprende de cinco etapas; homogenización, lisis celular, separación de proteínas, precipitación y redisolución de ADN (Patricia *et al.*, 2015).

Con el pasar de los años se han incluido kits comerciales que ayudan a la extracción de ADN, evitan contaminaciones por manipulación ya que reducen el tiempo de extracción, sin embargo, los kits comerciales son mucho más costosos que los métodos tradicionales pero aseguran resultados de un ADN íntegro y puro (Patricia *et al.*, 2015).

2.6.1 Método de extracción fenol – cloroformo

Es generalmente el más utilizado y conlleva buenos resultados (Lopera-Barrero *et al.*, 2008). Es un método relativamente sencillo, eficaz para muestras de cualquier origen y de bajo costo, sin embargo, se utilizan sustancias tóxicas que pueden ser peligrosas si no se siguen los procedimientos adecuados por el investigador (Sánchez *et al.*, 2016).

Varios compuestos intervienen en el protocolo de extracción, uno de ellos es el compuesto orgánico tris hidroximetil aminometano, con un pH entre siete y nueve aporta capacidad tamponante efectiva, se utiliza para preparar disoluciones tampón (Markofsky, 2000). Otro compuesto es, el ácido etilendiaminotetracético o EDTA, se utiliza como agente quelante ya que tiene la capacidad de formar ligandos para crear compuestos metálicos más estables, estos complejos se usan para formar disoluciones como; TAE, TEN y TE (Ávila, Cutipa, Quispe, & Sumiri, 2015).

En la extracción y purificación del ADN para desestabilizar las membranas celulares, se ocupa un detergente, dodecilsulfato sódico o mejor conocido como SDS, un tensoactivo aniónico con alta concentración de sales (Biddle *et al.*, 2006) y al igual que el fenol ayudan a desnaturalizar las proteínas que contaminan la muestra (Hu *et al.*, 2020). Luego actúa la RNasa una enzima que inhibe la hidrólisis del ARN (Cerritelli & Crouch, 2009). y la adición de cloroformo permite la separación de dos fases, una acuosa que contiene el ácido nucleico y una orgánica que contiene proteínas y otros contaminantes disueltos, los ácidos nucleicos se precipitan usando etanol o isopropanol (Orfao & Morent, 2015).

En el protocolo es necesario añadir pasos adicionales como, realizar varios lavados con fenol cloroformo o filtraciones con columnas específicas, también puede contener inhibidores que intervienen en la reacción de PCR, como el fenol o el cloroformo (Salazar *et al.*, 2015)

2.6.2 Método de extracción PureLink™ microbiome

Es uno de los kits comerciales que ofrecen una purificación de ácido nucleico microbiano de manera rápida y eficiente. Este método está diseñado para el aislamiento y purificación de ADN a partir de una gran variedad de muestras, incluyendo muestras difíciles de trabajar como tierra y heces, el kit cuenta con la tecnología de una columna giratoria que permite obtener un ADN robusto y purificado que está listo para tratamientos siguientes como PCR o secuenciación (Yoshikawa *et al.*, 2011).

El principio del kit se basa en la selectiva unión que tiene el ADN con la membrana que está hecha a base de sílice en presencia de sales caotrópicas, procede con una lisis triple que hace que sea altamente eficiente, elimina rápidamente los inhibidores y es apto para investigaciones con microbiomas debido a su versatilidad, también puede detectar eficientemente bacterias patógenas a partir de un muestreo variado (Scientific, 2015).

Las características del kit de extracción incluyen; una limpieza completa de inhibidores gracias a su precipitación con tampón de limpieza, una lisis eficiente para microorganismos, el desarrollo del protocolo de extracción se realiza en tiempos cortos incluso trabajando con varias muestras a la vez y se obtiene un ADN de alta pureza, las muestras que son eficientes para el kit de extracción PureLink™ son; heces, orina, suelo, hisopos, medios de transporte, medios de crecimiento y saliva, el kit proporciona seis reactivos, ver tabla 4 (Scientific, 2015).

Tabla 4 Soluciones que provee el Kit PureLink TM Microbiome y sus funciones

N.-	Nombre	Contenido	Función
S1	Lysis Buffer	40 mL	Provoca ruptura de células, extrae las proteínas solubles a partir de un tejido fresco o congelado. Mejora y estabiliza las proteínas usando un detergente no iónico que se puede mezclar con agentes o inhibidores.
S2	Lysis Enhancer	5 mL	Suplemento agregado al tampón lisis para la producción de la mezcla de lisis celular, se aplica a células o tejidos.
S3	Cleanup Buffer	12,5 mL	Elimina los contaminantes en el proceso de extracción de ácidos nucleicos. Se eliminan los contaminantes dejando una muestra más limpia.
S4	Binding Buffer	45 mL	Provee un pH y concentraciones de sales adecuadas para que absorba el ADN.
S5	Wash Buffer Concentrate	13 mL	Elimina detergentes, enzimas, aceites, que se adhieren a las membranas de sílice en tratamientos anteriores, dejando la muestra más limpia.
S6	Elution Buffer	5 mL	Se encarga de eluir la muestra, despegando el ADN de la membrana de sílice.

Fuente: (Scientific, 2015).

2.7 Cuantificación de ADN

La cuantificación brinda valores en forma numérica sobre la autenticidad e información precisa de la concentración de ácido nucleico que existe en una muestra, también verifica si un método de extracción de ADN es el correctamente usado (Ríos *et al.*, 2016), ya que, en este proceso el ADN puede sufrir daños (Pérez *et al.*, 2016). Existen varios métodos de cuantificación que ayudan a determinar la concentración y cantidad de ácidos nucleicos contenidos en una muestra (Monroy *et al.*, 2014).

La principal característica que tiene el ADN es que presenta un pico de absorción en presencia de radiación que se debe a la presencia de bases púricas y pirimídicas, tanto del ADN de cadena doble como el de cadena simple presentan absorciones diferentes, la absorción de la luz ultravioleta del ADN doble cadena es menor al ADN simple cadena por el emparejamiento de bases. La absorbancia de 260 nm es específica para el ADN debido a los contaminantes que se encuentran en la muestra como las proteínas o el fenol restante que pueden ser causantes de falsos positivos, como es el caso de la cuantificación por espectrofotometría (Valle, 2002).

2.7.1 Pureza de ácido nucleicos

Para determinar la pureza interviene como base fundamental la espectrofotometría en distintas longitudes de onda; 230 nm, 260 nm y 280 nm, y consecuentemente permite identificar su concentración en términos de ng/uL. La lectura de la absorbancia a las distintas longitudes de onda en índices de A_{260/280} y A_{260/230} se utilizan para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos, los rangos óptimos se obtienen al conseguir valores entre 1.8 a 2.0 en índice A_{260/280} y valores de 1.5 en índice A_{260/230} (Wilfinger, Mackey, & Chomczynski, 1997).

2.7.2 Qubit

El fluorómetro “Qubit” permite medir concentraciones de ADN, ARN y de proteínas, posee una alta sensibilidad y precisión, funciona utilizando fluoróforos que se intercalan entre las moléculas de interés de una manera específica, por lo que, reduce los efectos a causa de contaminantes, tiene un rango de efectividad de 10 pg a 1 ug, precisión que tiene a pesar de que existan bajas concentraciones en la muestra, es una herramienta muy útil para procesos de PCR incluso para secuenciación masiva (Perez, 2018).

El Qubit brinda una medición rápida y fácil de las muestras, dando como resultado una lectura directamente en la pantalla del equipo Qubit, las gráficas de curvas o cálculos no son necesarios gracias al *software* que contiene, de esta manera asegura resultados para las aplicaciones de tratamientos futuros que tengan las muestras (Invitrogen, 2007).

2.7.3 Nanodrop

Es un equipo de cuantificación y análisis de soluciones, a diferencia de otros equipos, el Nanodrop no necesita realizar diluciones, así como también es rápido, demora menos de cinco segundos por cada muestra. El modelo desarrollado para su proceso se basa en el pipeteo de micro-volúmenes que se colocan directamente en el pedestal plano que contiene la fibra receptora, obteniendo resultados fácilmente (Bustos *et al.*, 2011).

La tensión superficial es aprovechada por el sistema de retención y forma un puente de líquidos entre los dos pedestales, superior e inferior, en el pedestal superior se encuentra fibra óptica que conectada a una fuente de emisión de xenón, da un paso óptico para que la longitud de onda sea encontrada, esto varía según la concentración de la muestra (Bustos *et al.*, 2011). La pureza es determinada mediante la relación de las lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm, las soluciones puras de ADN tienen una relación de DO 260/280 de 1.8 a 2.0 (Corrales & Sambache, 2018).

2.7.4 Electroforesis

Este tratamiento de cualificación se utiliza para analizar, caracterizar y purificar el ADN procedente de distintas muestras (Alicia *et al.*, 2005). En este método las moléculas son separadas por su tamaño con la ayuda de una fuente de poder que provee una carga eléctrica necesaria para fragmentar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño, ver figura 9 (Walter, Morán, & Asesor, 2020). Se puede visualizar mediante tinciones sencillas y así identificar el contenido de ácidos nucleicos en una muestra, obteniendo una estimación de su concentración y grado de entereza (Fierro, 2011).

Su principio es basado en la combinación de fuerzas eléctricas, fenómenos de fricción y difusión que permiten el desplazamiento y separación de las moléculas por tipo o tamaño (Salazar, Niño, & Díaz, 2017), sometidos a una carga eléctrica, migrando desde un polo negativo por la carga de los grupos fosfato en los ácidos nucleicos, a un polo positivo, a través de un gel formado por un polímero como la agarosa y soluciones buffers, haciendo que las moléculas de menor tamaño migren con mayor velocidad a comparación de las moléculas de mayor tamaño, agrupándolas y separándolas en función de su masa y tamaño (Fierro, 2011).

El gel de agarosa un producto natural no tóxico, puede ser manejado sencillamente, es extraído de las algas marinas productoras de agar, compuesto principal de poder gelificante, presenta característica de histéresis, una diferencia entre temperaturas de fusión y gelificación, característica que vuelve a este gel idóneo para electroforesis (Carvajal *et al.*, 2013). La agarosa tiene un límite superior de cuarenta a cincuenta kilo bases en el tamaño de moléculas de ADN que puede separar y es influido por la concentración del gel, que va de 0.2% a 3%, no separa productos de digestiones y mucho menos puede separar cromosomas, estos geles son difíciles de manipular y muy frágiles (Fierro, 2011).

Los fragmentos de ADN se marcan radiactivamente o se visualizan con compuestos fluorescentes como el bromuro de etidio que intercala las bases de los ácidos nucleicos y emite fluorescencia cuando se ilumina con rayos ultravioleta, una alternativa de tinción menos peligrosa a estos compuestos, es una tinción con SybrSafe DNA, altamente sensible para visualizar el ADN con luz azul (Carvajal *et al.*, 2013).

El tamaño de los fragmentos que migran en el gel se diferencian fácilmente gracias a la adición de un marcador de peso molecular como el Trackit DNA Ladder, que contiene fragmentos de repeticiones de cien pares de bases, en su fórmula contiene dos tintes de seguimiento, xileno cianol y tartrazina, juntos permiten rastrear visualmente la migración de los ácidos nucleicos mediante la electroforesis y al finalizar los marcadores moleculares también colocados en el gel se utilizan para determinar el tamaño de las moléculas por comparación, los marcadores son una mezcla de moléculas de ADN o proteínas de tamaño conocido (Acuña, Ramírez, & Umaña, 2019).

La foto documentación se realiza a través de un generador de imágenes “E-Gel Imager”, es sencillo de usar para geles teñidos que incorporan manchas fluorescentes, está equipado con cámaras digitales de alta resolución y el sistema incluye un *software* intuitivo para bandas y su análisis (Villalobos *et al.*, 2006).

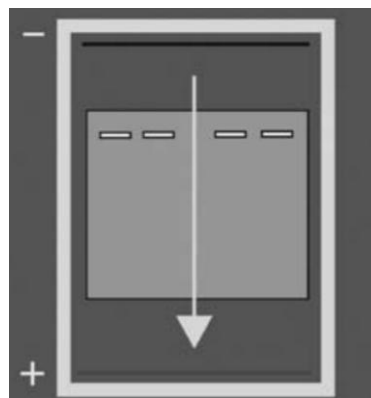


Figura 9 Esquema del sistema convencional de electroforesis en gel de agarosa, se observa la cámara de electroforesis en forma de rectángulo, se identifica el polo positivo y negativo, el gel en forma cuadrada y sus pocillos. Fuente: (Fierro, 2011).

CAPÍTULO 3
MARCO METODOLÓGICO

3.1 Nivel de Investigación

El presente trabajo tiene un nivel descriptivo, ya que se estudiaron las variables independientes de forma autónoma, las cuales son, dos métodos diferentes de extracción de ADN, se observaron los resultados y se caracterizaron en términos cuantificables y cualificales respecto a la calidad y cantidad que se obtuvo de ADN con cada método ocupado (Arias, 2012).

3.2 Diseño de investigación

El diseño de investigación que ocupa el presente trabajo es experimental, debido a que se sometió al camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) (variable dependiente), a dos métodos de extracción de ADN (variables independientes), así mismo se controlaron los factores de población, obteniendo heterogeneidad en las muestras, al final se observaron y analizaron los resultados de los efectos producidos por los dos métodos (Arias, 2012).

3.3 Variables

Las variables independientes son: los métodos de extracción de ADN. La variable dependiente: el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) y las variables intervinientes: el tiempo de vida del camarón blanco fuera de las piscinas de cultivo, la temperatura en las diferentes provincias y la variedad de líneas de camarón producidas en las distintas camaroneras.

3.4 Población y muestra

Se obtuvo una población finita de dos diferentes provincias del Ecuador; Santa Elena y El Oro, se seleccionó como muestra, cinco camaroneras en total, dos y tres respectivamente, se seleccionaron tres piscinas de cultivo en cada camaronera y se recolectó cuarenta camarones de cada piscina con la finalidad de obtener una heterogeneidad para el desarrollo de la investigación.

3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizaron varias técnicas e instrumentación como: tesis, libros, artículos científicos, publicaciones en revistas de alto y bajo impacto, fotografías y seguimientos operarios o bitácoras.

3.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se desarrolló un análisis estadístico, mediante un diseño completamente al azar, se evaluó los dos métodos de extracción de ADN genómico de camarón, en términos de eficiencia.

3.7 Procedimiento

3.7.1 Fase 1. Obtención de la muestra

En la primera fase, se establece el protocolo necesario para el desarrollo del primer objetivo específico, el cual, se refiere a la visita en territorio a las diferentes camaroneras para obtener variabilidad en la extracción del material genético.

3.7.1.1 Visita a camaroneras para adquisición de muestras

Las muestras de camarón se obtuvieron visitando dos provincias; El Oro y Santa Elena, en la provincia de El Oro, se recolectaron muestras de tres ciudades; Huaquillas, Arenillas y Santa Rosa y en Santa Elena de dos parroquias; Bajén y Chanduy.

La autorización de acceso fue otorgada por los dueños de cada camaronera y en el caso de las camaroneras de Santa Elena, el permiso correspondiente se obtuvo gracias al gerente de la industria pesquera Santa Priscila. En cada camaronera se seleccionaron aleatoriamente distintas piscinas de cultivo y se recolectaron 30 camarones siguiendo la técnica de recolección al azar por cuadrantes, las camaroneras y sus coordenadas de ubicación, se pueden visualizar en el anexo 1 y 2.



Figura 10 Piscina camaronera en Bagén, Provincia de Santa Elena



Figura 11 Piscina camaronera en la parroquia Hualtaco, ciudad de Huaquillas en la Provincia de El Oro.

3.7.1.2 Disección y extracción de hepatopáncreas e intestino del camarón *P. vannamei*

La disección se realizó seguido de la recolección en cada camaronera, con el camarón aún con vida para no alterar el material genético, con ayuda de un bisturí estéril, pinzas estériles y conociendo la anatomía del camarón *P. vannamei*, según Bonda y colaboradores (2001), se obtuvo el hepatopáncreas e intestino de cada camarón.

Los órganos obtenidos fueron separados, en un recipiente todos los hepatopáncreas y en otro todos los intestinos, luego se procedió a realizar un pool, el cual corresponde a una maceración de cada grupo de órganos, con la ayuda de un mortero hasta que se obtuvieron dos mezclas bien homogéneas.

3.7.1.3 Suspensión de muestras en RNAlater™

Las mezclas de hepatopáncreas e intestino, se sometieron a una técnica de muestreo al azar, en una caja Petri se colocó la mezcla de hepatopáncreas, ver figura 12, y en otra la mezcla de intestinos, ver figura 13, se separó en cuadrantes y se recolectó una parte de cada cuadrante. Se colocó nuevamente en una caja Petri y se repitió la técnica.



Figura 12 Macerado y toma de muestra aleatoria de la mezcla de hepatopáncreas de P. vannamei



Figura 13 Macerado y toma de muestra aleatoria de la mezcla de intestino de P. vannamei.

Se recolectó aproximadamente 0.5 mL de hepatopáncreas e intestino en cada tubo, ver figuras 14 y 15, los cuales contenían 1mL de RNAlater™, reactivo de almacenamiento de tejido que inhibe la degradación del material genético (Forster *et al.*, 2008), que facilitó el transporte de las muestras, sin sufrir daño alguno hasta el laboratorio, para su extracción.



Figura 14 Muestra de hepatopáncreas suspendida en RNAlater™



Figura 15 Muestra de Intestino suspendida en RNAlater™

Tabla 5 Provincias y camarónicas de donde se recolectaron las muestras y su cantidad

EL ORO	HEPATOPÁNCREAS	INTESTINO
HUAQUILLAS	2 muestras suspendidas en	2 muestras suspendidas en
3 Piscinas	<i>RNAlater</i> TM	<i>RNAlater</i> TM
ARENILLAS	2 muestras suspendidas en	2 muestras suspendidas en
3 Piscinas	<i>RNAlater</i> TM	<i>RNAlater</i> TM
SANTA ROSA	2 muestras suspendidas en	2 muestras suspendidas en
3 Piscinas	<i>RNAlater</i> TM	<i>RNAlater</i> TM
SANTA ELENA	HEPATOPÁNCREAS	INTESTINO
CHANDUY	2 muestras suspendidas en	2 muestras suspendidas en
3 Piscinas	<i>RNAlater</i> TM	<i>RNAlater</i> TM
BAJEN	2 muestras suspendidas en	2 muestras suspendida en
3 Piscinas	<i>RNAlater</i> TM	<i>RNAlater</i> TM

Fuente: Autor

3.7.2 Fase 2. Extracción de ADN

En la segunda fase se establece el protocolo necesario para el desarrollo del segundo objetivo específico, el cual, refiere a la extracción de ADN con un método convencional y un kit comercial de extracción, seguido de la cuantificación y cualificación del ADN obtenido.

3.7.2.1 Extracción con método convencional fenol cloroformo

El protocolo de extracción se encuentra detallado paso a paso en el Anexo 3.

3.7.2.1.a Preparación de la muestra

Las muestras obtenidas de hepatopáncreas e intestino de camarón *P. vannamei* se transfirieron a nuevos tubos cónicos sin la solución estabilizadora (*RNAlater* TM), se agregó TEN y se maceró hasta homogenizar la muestra, ver figura 16.

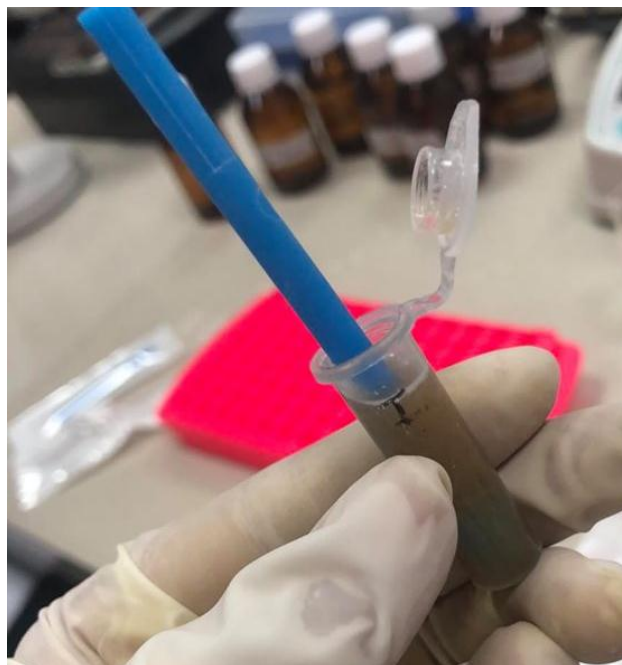


Figura 16 Maceración de la muestra de intestino junto con el reactivo TEN

Los tubos se incubaron a 65 °C, se centrifugaron y dejaron enfriar a -20 °C

. Luego el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos cónicos. En la muestra de hepatopáncreas, ver figura 17, se forman tres fases, en la parte superior se encontró una fase grasa que fue eliminada.



Figura 17 Fase grasa generada en la muestra de hepatopáncreas.

3.7.2.1.b Extracción de ADN

Para el proceso de extracción se añadió SDS y ARNasa [0.1 mg/mL] a los tubos, se incubaron a 37 °C, seguido, se añadió fenol a un pH de 6.6 y se agitó. Los tubos se centrifugaron y finalmente el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico nuevo.

Una vez trasferido el sobrenadante, se añadió cloroformo y fenol (pH: 6.6) a proporción de 1:1, con ayuda de un vórtex se agitó, seguido, se centrifugó y luego, el sobrenadante se dividió en dos alícuotas en tubos nuevos. Por último, se añadió etanol absoluto y acetato sódico 3M, para ser almacenados a -20 °C durante una hora.

Después, se centrifugó y se desechó totalmente el sobrenadante de los tubos, seguido, se añadió etanol al 70% y se repitió el paso anterior. Los tubos se dejaron secar con la tapa abierta en una campana de extracción por una hora y para finalizar la extracción, se añadió TE (pH: 7.5) a cada tubo y se dejó re suspender a 4 °C durante toda la noche.

3.7.2.2 Extracción con kit comercial PureLink™ TM

Se utilizó el protocolo descrito por el fabricante, ver Anexo 4 (Scientific, 2015). Para empezar, se pesó 0.2 g de muestra en un *bead tube* y se añadió *lysis buffer*, ver figura 18. Luego, se agitó hasta que la muestra quedó dispersada totalmente en el líquido, finalmente, se agregó *lysis enhancer* y se agitó nuevamente.



Figura 18 *Bead tubes* con 0.2g de la muestra de camarón *P. vannamei* más 600 uL de *lysis buffer*

Las muestras se colocaron en una incubadora a 65 °C, e inmediatamente se agitaron. Luego se centrifugaron y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo para agregar *cleanup buffer* agitando enseguida para una dispersión completa eliminando inhibidores.

Terminados los pasos anteriores, se centrifugaron los tubos y se volvió a transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, seguido, se unió el ADN a la *spin column*, añadiendo primero *binding buffer*. La mezcla de la *spin column* se volvió a centrifugar y al finalizar, se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso.

Para lavar el ADN, se colocó el *spin column* en un tubo nuevo, en donde se agregó *wash buffer*, se centrifugó, se descartó el líquido para eliminar completamente el *wash buffer*. La *spin column* se transfirió a un tubo nuevo y se añadió *elution buffer*, los tubos se colocaron en la centrifuga hasta situar nuevamente el eluido que contiene el ADN sobre la *spin column*. La elución se repitió y por último se descartó la columna. El ADN purificado quedó en el tubo.

3.7.2.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN de camarón *P. vannamei* se determinó con la ayuda de una fluorómetro, en este caso el equipo Qubit, ver figura 19, como lo realiza Perez (2018) en su estudio. Antes de realizar las lecturas se calibró el equipo con los estándares proporcionados por el equipo y siguiendo el manual del fabricante (Invitrogen, 2007).

El sistema del equipo ofrece la opción de lectura de ADN, para dar lectura a las muestras, en un tubo cónico de 500 uL se añadieron 20 uL de cada muestra de ADN obtenida, más, 180 uL de la solución de trabajo. Los tubos se dejaron reposar por un minuto antes de su lectura. Las soluciones preparadas se colocaron en la cámara de muestra una a una y se procedió a la lectura, los resultados se visualizaron en la pantalla táctil del equipo, ver figura 20. Los resultados en stock de 20 fueron mayores a 100 ng/mL cantidad de ADN estándar para tratamientos de secuenciación para posteriores estudios (Necochea & Canul, 2004).

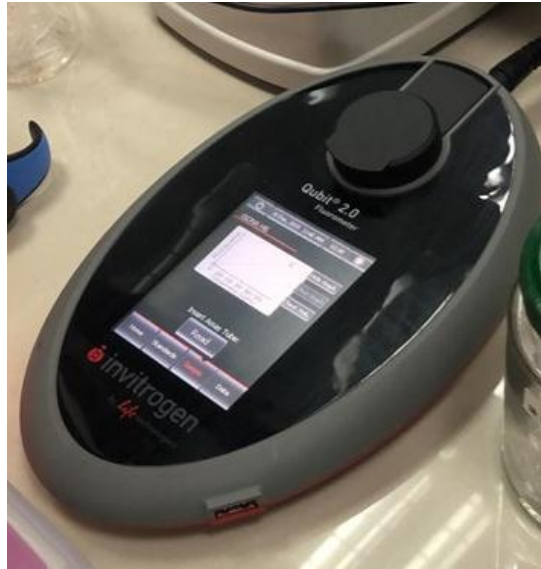


Figura 19 Equipo Qubit utilizado para la lectura de cantidad de ADN



Figura 20 Equipo Qubit, destacando la pantalla táctil donde se reflejan los resultados.

3.7.2.4 Cualificación de ADN

La integridad del ADN de camarón *P. vannamei* extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Las bandas del ADN se visualizaron en un fotodocumentador, E-Gel Imager. El gel se preparó a una concentración de 0.5%, el agar se diluyó con agua destilada y buffer TAE 10X. El gel contenía 3 μ L de Syber Safer DNA solución altamente sensible que permitió la visualización del ADN (Carvajal *et al.*, 2013).

En la cámara de electroforesis, ver figura 21, se colocó el gel con los pocillos en sentido al polo negativo, las muestras se cargaron con la ayuda de una micropipeta en proporción 2:3, Blue Juice y la muestra de ADN respectivamente. Se dejó correr usando buffer TAE 1X a 110 voltios durante 30 minutos, luego, se visualizaron las bandas de ADN en un transiluminador de luz azul. Con el software Light Blue base, ver figura 22, se obtuvieron imágenes del gel con las bandas resultantes.

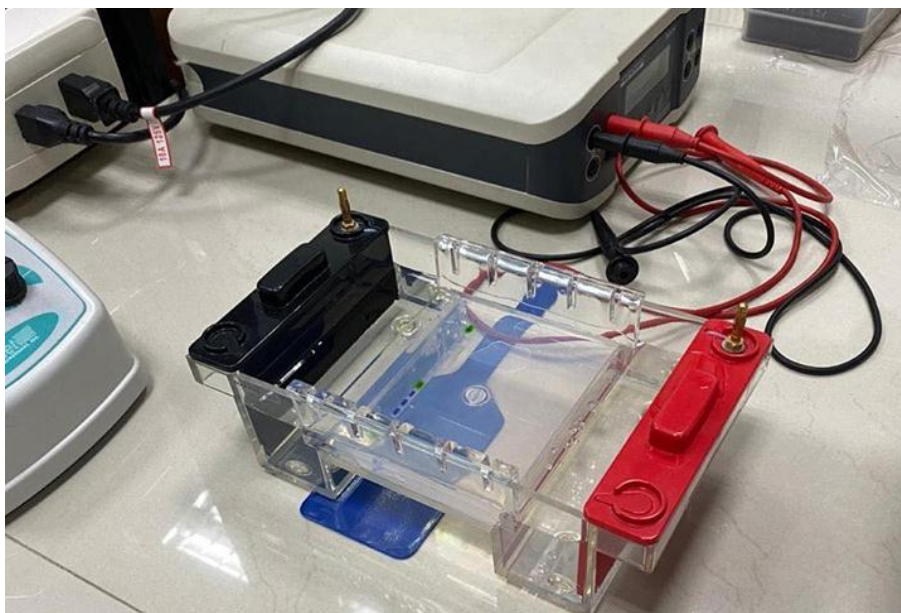


Figura 21 Se observa la cámara de electroforesis con el gel cargado de muestras de ADN



Figura 22 Fotodocumentador E-Gel Imager, junto al software Ligh Blue Base

3.7.3 Fase 3. Análisis estadístico de la extracción de ADN

En la tercera fase de este trabajo, se utilizó el software Minitab 19, en donde se desarrolló un análisis estadístico ANOVA de un solo factor, para encontrar diferencia significativa de concentración del ADN de intestino y hepatopáncreas de camarón *P. vannamei* extraído por dos métodos; protocolo convencional modificado y kit comercial PureLink TM. También se realizó una comparación en Tuckey (Miller, 1981).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN de camarón *P. vannamei*

Se ensayaron dos distintos métodos para la extracción de ADN de camarón *P. vannamei*, en intestino y hepatopáncreas. Primero, una extracción con fenol – cloroformo, protocolo convencional modificado de Lopera y colaboradores (2008), protocolo relativamente sencillo, de bajo costo y eficaz para muestras de cualquier origen según menciona Sánchez y colaboradores (2016) y segundo, una extracción con el kit comercial PureLink TM siguiendo el protocolo del fabricante Thermo Fisher Scientific (2019), kit que tiene propiedad de una lisis eficiente para microorganismos, su capacidad de eliminar inhibidores y su rapidez de extracción de ADN, incluso, utilizando varias muestras en el mismo ensayo (Yoshikawa *et al.*, 2011).

4.1.1 Resultados de la cuantificación de ADN

Los datos de las concentraciones de ADN obtenidos con los dos métodos de extracción de ADN se presentan en la tabla 6. Con el método convencional modificado se obtuvieron dos alícuotas por cada muestra y con el kit de extracción una sola alícuota.

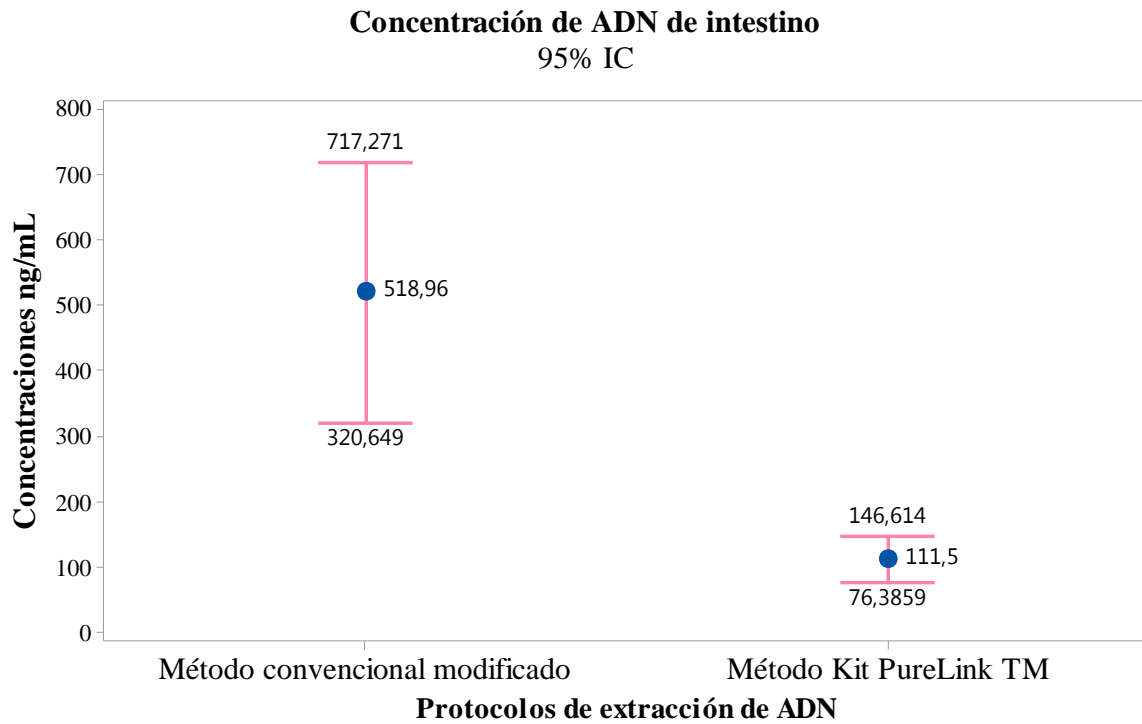
La concentración promedio de ADN obtenido por el método convencional modificado con fenol – cloroformo, para intestino fue de 548.5 ng/mL y para hepatopáncreas fue de 496.4 ng/mL. Para el método de extracción con Kit PureLink TM microbiome, la concentración promedio de ADN de intestino fue de 311.5 ng/mL y de hepatopáncreas fue de 67.7 6 ng/mL.

En las gráficas 1 y 2 se muestran las representaciones de los promedios de las concentraciones de ADN de intestino y hepatopáncreas respectivamente. El método convencional modificado muestra un mayor promedio de concentración de ADN para intestino y para hepatopáncreas a comparación del kit comercial PureLink TM.

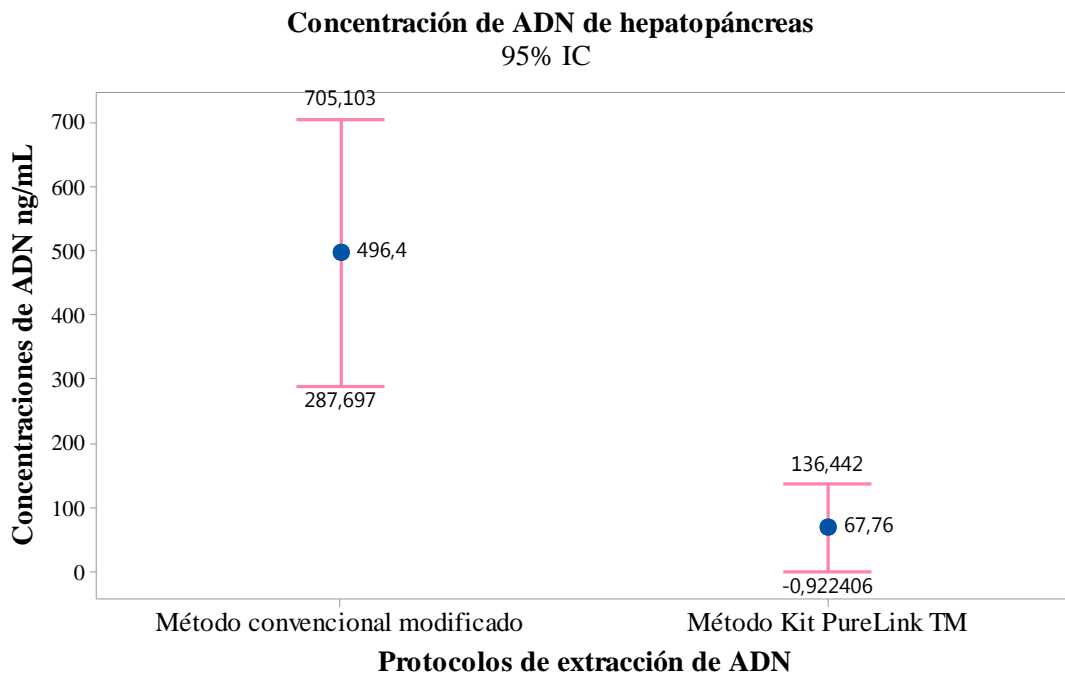
Tabla 6 Datos de las concentraciones de ADN (ng/mL), del intestino y hepatopáncreas del camarón *Penaeus vannamei*

	ADN de	ADN de	ADN de	ADN de
Camaroneras	Intestino	Hepatopáncreas	Intestino	Hepatopáncreas
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
Muestras El Oro				
	Método Convencional Modificado		Método Kit PureLink TM	
Camарosa	A:564 ng/mL	A:524 ng/mL	121 ng/mL	53.5 ng/mL
	B:602 ng/mL	B:440 ng/mL		
Valeria	A:394 ng/mL	A:746 ng/mL	117 ng/mL	93.7 ng/mL
	B:113 ng/mL	B:591 ng/mL		
Rodríguez	A:665 ng/mL	A:263 ng/mL	67.5 ng/mL	0.50 ng/mL
	B:638 ng/mL	B:144 ng/mL		
Muestras Santa Elena				
	Método Convencional Modificado		Método Kit PureLink TM	
Chanduy	A:394 ng/mL	A:1160 ng/mL	1145 ng/mL	147 ng/mL
	B:383 ng/mL	B: 410 ng/mL		
Bagén	A:990 ng/mL	A: 436 ng/mL	107 ng/mL	44.1 ng/mL
	B:742 ng/mL	B: 250 ng/mL		
Rangos	113 - 990	144 - 1160	67.5 - 1145	0.50 - 147
Promedio	548.5 ng/mL	496.4 ng/mL	311.5 ng/mL	67.76 ng/mL

Fuente: Autor



Gráfica 1 Intervalos con una confianza del 95% y promedio de la concentración de ADN de intestino de *P. vannamei*, extraído mediante dos protocolos.



Gráfica 2 Intervalos con una confianza del 95% y promedio de la concentración de ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei*, extraído mediante dos protocolos

4.1.2 Resultados de la cualificación de ADN

El análisis de la calidad de ADN de camarón *P. vannamei* se realizó con un proceso electroforético en gel de agarosa al 0.5%. El ADN extraído de intestino y hepatopáncreas de camarón *P. vannamei*, mediante los protocolos de extracción por fenol – cloroformo y por kit comercial, mostraron una visibilidad de bandas proporcional a la concentración de ADN obtenido. La visibilidad de las bandas fue fuerte en unos casos y escasa en otros.

El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó comparando la migración de las bandas provenientes del ADN de camarón *P. vannamei*, con las bandas formadas por los marcadores de peso molecular, con tamaños de fragmento conocidos, los valores iban desde los 100 pares de bases, seguido de 1 500 pares de bases, hasta los 2 072 pares de bases.

4.1.2.1 Resultados de electroforesis, ADN extraído con método convencional modificado

La primera y segunda electroforesis, en gel de agarosa al 0.5%, se realizó con ADN extraído de intestino y hepatopáncreas de *P. vannamei* de las provincias de El Oro y Santa Elena respectivamente, mediante el método convencional modificado con fenol – cloroformo. Ambas electroforesis muestran tamaños de fragmentos de ADN mucho mayor a los 2 072 pares de bases, a comparación del marcador de peso molecular.

En la primera electroforesis, ver figura 23, se observó que las bandas formadas por el ADN de hepatopáncreas, aunque son las que mayor contaminación presentan en sus carriles, mostraron bandas definidas a comparación de las bandas generadas por el ADN de intestino y en la segunda electroforesis, ver figura 24, las bandas fueron muy poco visibles para hepatopáncreas e intestino, a excepción de los carriles 7 y 8 que mostraron mayor definición.

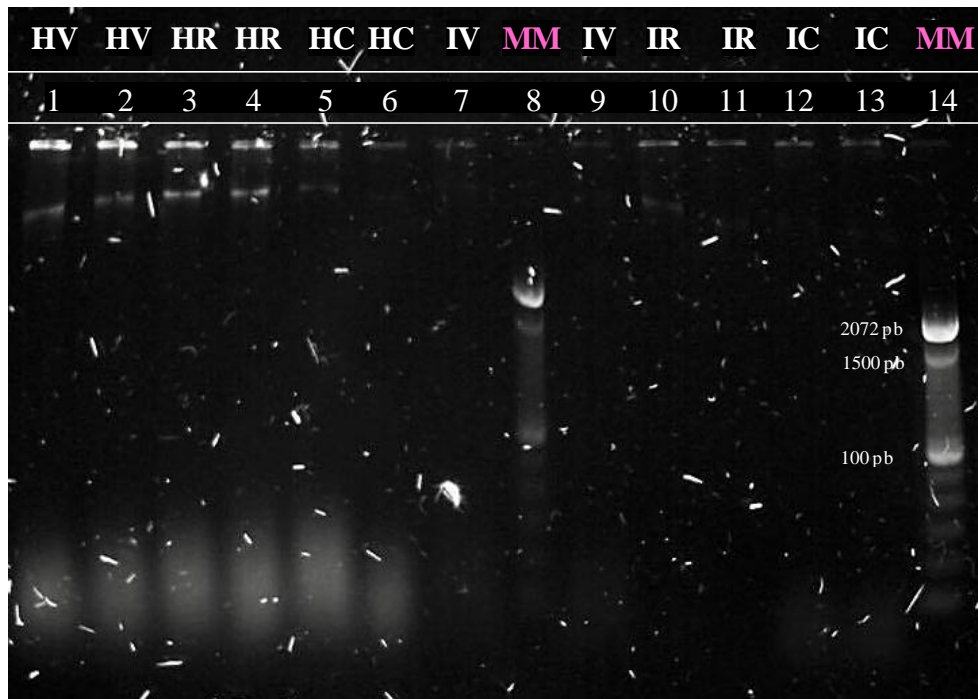


Figura 23 Primera electroforesis: Carriles 1(HV), 2(HV), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de camaronera Valeria. Carriles 3(HR), 4(HR), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de camaronera Rodríguez. Carriles 5(HC), 6(HC), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de camaronera Camarosa. Carriles 7(IV), 9(IV), ADN de intestino de *P. vannamei* de camaronera Valeria. Carriles 10(IR), 11(IR), ADN de intestino de *P. vannamei* de camaronera Rodríguez. Carriles 12(IC), 13(IC), ADN de intestino de *P. vannamei* de camaronera Camarosa. Los marcadores moleculares en los carriles 8 y 14

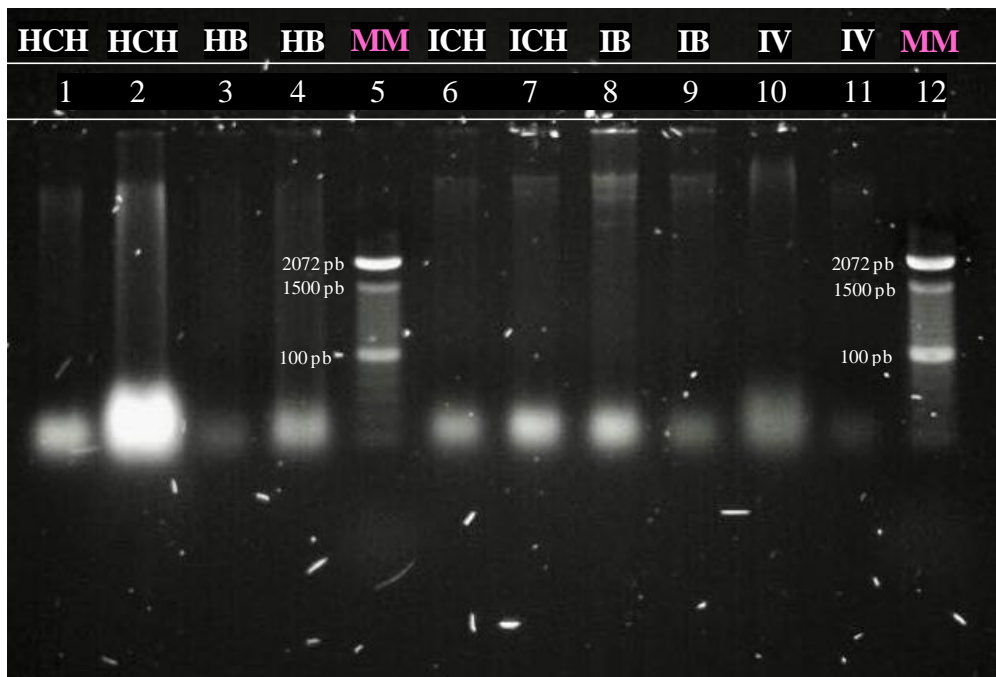


Figura 24 Segunda electroforesis: Carriles 1(HCH), 2(HCH), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de camaronera en Chanduy. Carriles 3(HB), 4(HB), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de camaronera en Bagén. Carriles 6(ICH), 7(ICH), ADN de intestino de *P. vannamei* de camaronera en Chanduy. Carriles 8(IB), 9(IB), ADN de intestino de *P. vannamei* de camaronera en Bagén. Carriles 10(IV), 11(IV), ADN de intestino de *P. vannamei* de camaronera Valeria, resultados repetidos. Los marcadores moleculares en los carriles 5 y 12.

4.1.2.2 Resultados de electroforesis del ADN extraído con kit de extracción PureLink™

La tercera y cuarta electroforesis, en gel de agarosa al 0.5%, se realizaron con ADN de hepatopáncreas e intestino mediante la extracción por kit PureLink™, con las muestras tomadas en las diferentes provincias de El Oro y Santa Elena, respectivamente

Los tamaños de los fragmentos de ADN en el caso de las dos electroforesis resultaron mayores a los 2 072 pares de bases, a comparación del marcador de peso molecular. De igual manera, en ambas electroforesis se observó muy poca o nula contaminación en los carriles que contienen las muestras de ADN de *P. vannamei*.

En la tercera electroforesis, ver figura 25, se observan bandas definidas para hepatopáncreas en dos carriles y una banda definida para intestino. El resto de bandas resultaron ser escasas o poco visibles y de igual manera para la cuarta electroforesis, ver imagen 26.

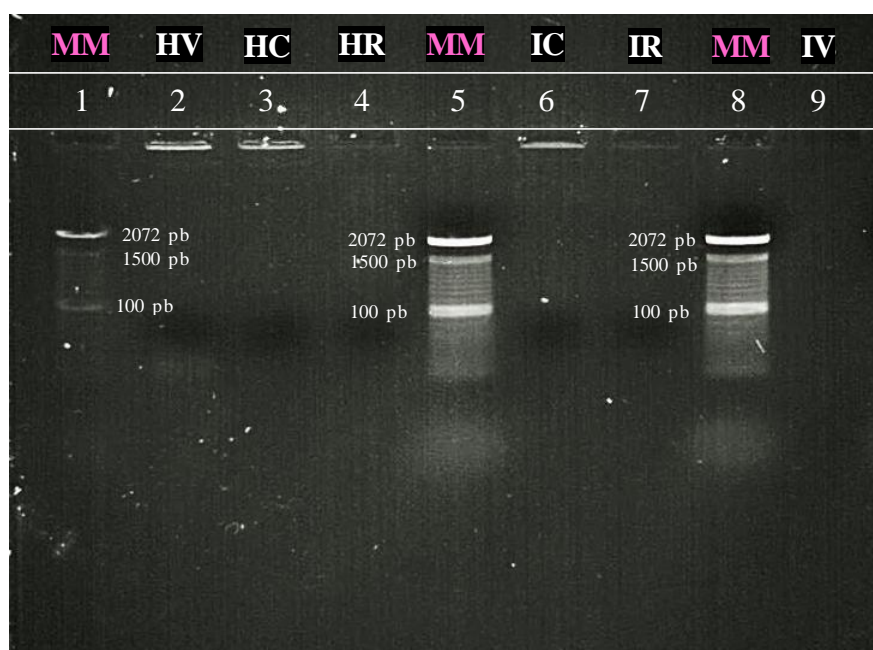


Figura 25 Tercera Electroforesis: Carril 2(HV), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de la camaronera Valeria. Carril 3(HC), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de la camaronera Camarosa. Carril 4(HR), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de la camaronera Rodríguez. Carril 6(IC), ADN de intestino de *P. vannamei* de la camaronera Camarosa. Carril 7(IR), ADN de intestino de *P. vannamei* de la camaronera Rodríguez. Carril 9 (IV), ADN de intestino de *P. vannamei* de la camaronera Valeria. Los marcadores moleculares en los carriles 1, 5 y 8.

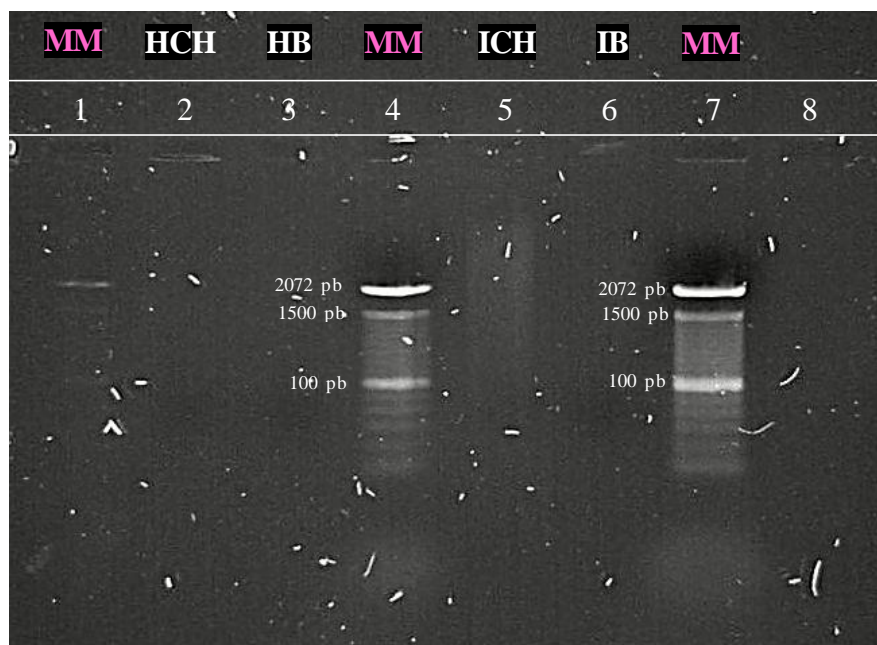
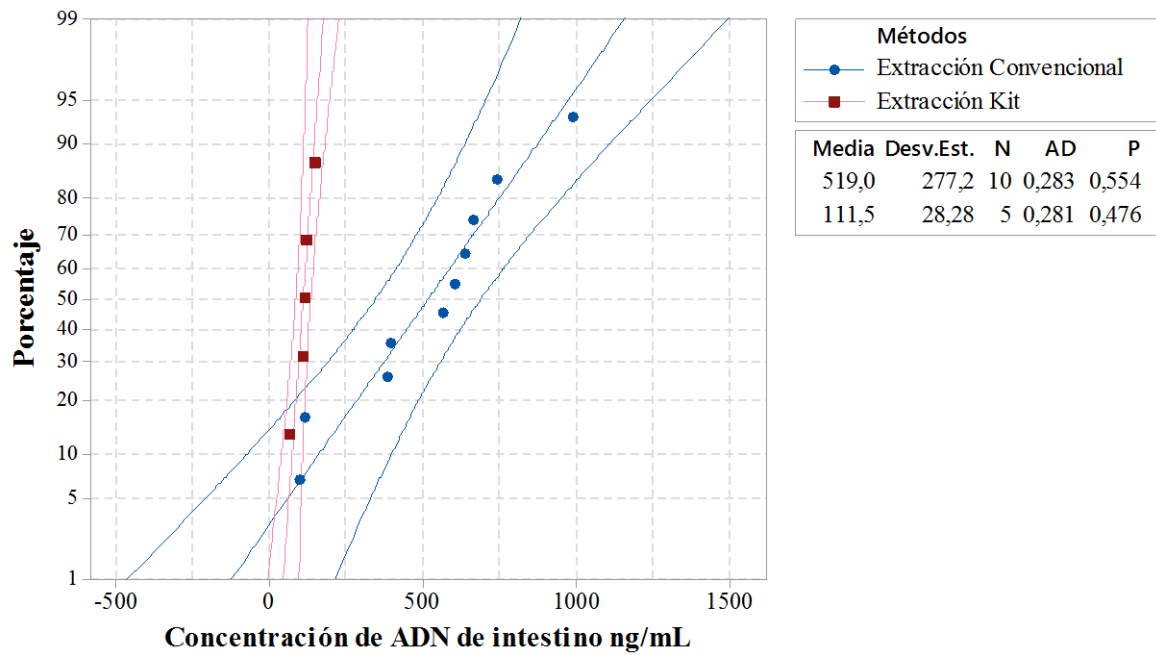


Figura 26 Cuarta electroforesis: Carril 2(HCH), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de la camaronera en Chanduy. Carril 3(HB), ADN de hepatopáncreas de *P. vannamei* de la camaronera en Bagén. Carril 5(ICH), ADN de intestino de *P. vannamei* de la camaronera en Chanduy. Carril 6(IB), ADN de intestino de *P. vannamei* de la camaronera en Bagén. Los marcadores moleculares en los carriles 1, 4 y 7.

4.1.3 Análisis estadístico para la concentración de ADN de *P. vannamei*

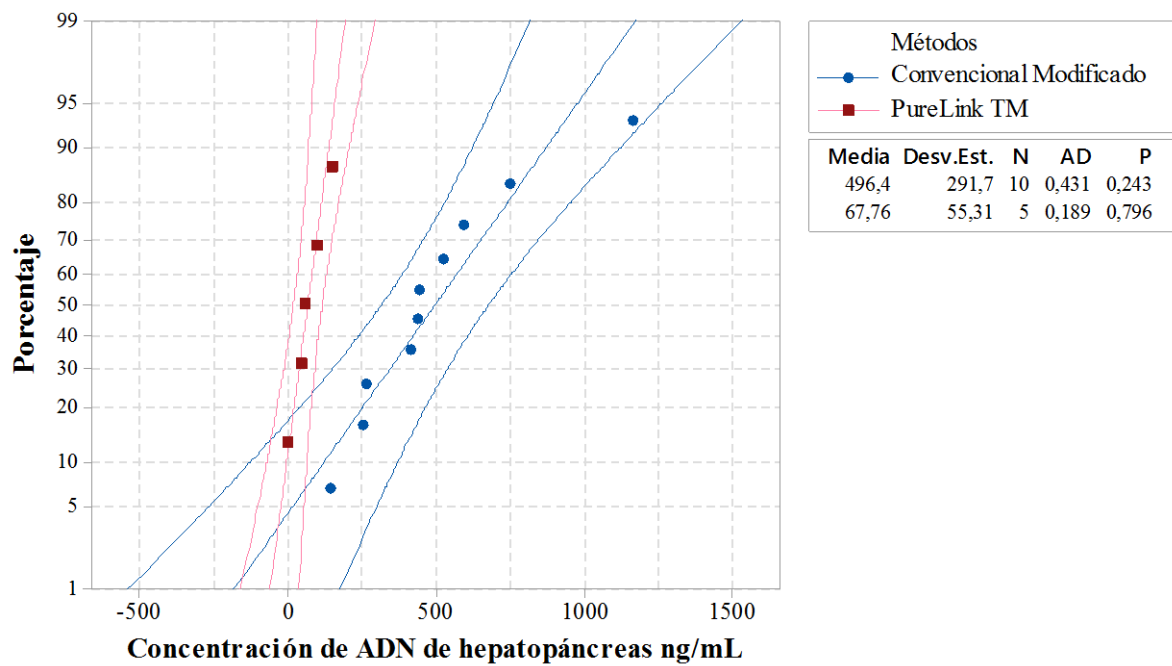
Para la comparación de los dos métodos de extracción de ADN se realizaron pruebas de normalidad, para posteriormente realizar el análisis ANOVA. Las pruebas de normalidad se realizaron de manera independiente, para cada grupo de datos obtenidos de las distintas extracciones de ADN y se contrarrestaron las probabilidades de los dos métodos de extracción en una misma gráfica para cada órgano. Los resultados de la prueba de Anderson Darling, para las concentraciones de ADN de intestino, extraídas por el método convencional modificado y por el kit PureLink TM, obtuvieron los siguientes valores de P; 0.554 y 0.476 respectivamente, valores mayores al nivel de significancia de 0.05 con lo que consideramos que los datos son normales, ver gráfica 3. Y para los datos de las concentraciones de ADN de hepatopáncreas, extraídas por el método convencional modificado y el kit de extracción PureLink Tm los valores de P fueron; 0.243 y 0.796 respectivamente para cada método, siendo valores mayores al nivel de significancia de 0.05, obteniendo una población normal, ver gráfica 4.

Probabilidad de cada método de extracción de ADN
Normal - 95% de IC



Gráfica 3 Probabilidad para datos de las concentraciones de ADN de intestino, extraídos por ambos métodos

Probabilidad de cada método de extracción de ADN
Normal - 95% de IC



Gráfica 4 Probabilidad para datos de las concentraciones de ADN de hepatopáncreas, extraídos por ambos métodos.

Después de que se comprobó que los datos de las concentraciones de ADN resultaran ser normales, se plantearon las hipótesis; nula y alternativa, para el análisis estadístico ANOVA de las concentraciones de ADN de intestino y hepatopáncreas. Las hipótesis se pueden diferenciar en la tabla 7.

Tabla 7 Planteamiento de Hipótesis

Nivel de confianza	Nivel de significancia	Hipótesis nula	Hipótesis alternativa
95%	$\alpha = 0.05$	Las dos medias son iguales	Las dos medias son distintas

Fuente: Autor

Para el análisis de la varianza se ocupó un diseño completamente al azar, con datos de respuesta separados para cada nivel de factor, considerando que se están comparando dos métodos con tamaño de muestra diferentes. Seguido se analizó estadísticamente cada órgano por separado, primero, se procedió a realizar el método ANOVA para los datos de concentraciones de ADN de intestino, y luego para las concentraciones de hepatopáncreas, los detalles del análisis se describen en las tablas 8 y 9.

Tabla 8 Análisis de varianza para las concentraciones de ADN de intestino

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
Factor	1	143466	143466	1.19	0.294
Error	13	1561853	120143		
Total	14	1705319			

Fuente: Autor

El valor de p que se obtuvo luego del análisis fue de 0.294, valor mayor al del nivel de significancia de 0.05, con este resultado se aceptó la hipótesis nula y se rechazó la hipótesis alternativa, se estableció que las medias son iguales para concentraciones de ADN de intestino.

Tabla 9 Análisis de varianza para las concentraciones de ADN de hepatopáncreas

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
Factor	1	612441	612441	10.23	0.007
Error	13	778283	59868		
Total	14	1390724			

Fuente: Autor

Para el análisis de varianza de las concentraciones de ADN de hepatopáncreas el valor de *p* dio como resultado 0.007, valor mucho menor al del nivel de significancia de 0.05, con este resultado se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, estableciendo que las medias son distintas. Seguido se aplicó el método Tuckey, método que indica que, si las medias no comparten igualdad en una letra en las agrupaciones, los métodos son significativamente diferentes. Este análisis se realizó para verificar que los métodos son iguales para la obtención de las concentraciones de ADN de intestino, y diferentes para las concentraciones de hepatopáncreas. Los detalles se muestran en la tabla 10 y 11:

Tabla 10 Detalles del método Tuckey para concentraciones de ADN de intestino, con una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Convencional modificado	10	519.0	A
Kit PureLink TM	5	312	A

Fuente: Autor

En el primer caso, los resultados de las concentraciones de ADN de intestino de *P. vannamei* muestran similitud en las letras en su agrupación, estableciendo que los protocolos de extracción son iguales, verificando con esto el resultado del análisis de varianza en ANOVA. Esto nos indica que se obtuvieron concentraciones buenas de ADN de intestino, con el método de extracción convencional modificado y el kit PureLink Tm, independientemente de las muestras.

Tabla 11 Detalles del método Tuckey para concentraciones de ADN de hepatopáncreas, con una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Convencional modificado	10	496.4	A
Kit PureLink TM	5	67.8	B

Fuente: Autor

El resultado del análisis Tuckey para las concentraciones de ADN de hepatopáncreas, mostró diferencia en las letras de las agrupaciones, indicando que los métodos son significativamente diferentes entre ellos, confirmando el análisis de la varianza que se realizó anteriormente. Este resultado indicó que las concentraciones de ADN de hepatopáncreas fueron distintas y que se obtuvo mejor resultado con el método convencional modificado que con el kit de extracción PureLink TM, pudiendo deberse a la fase grasa encontrada en el hepatopáncreas en el proceso de extracción de su ADN.

4.2 Discusión

La ausencia de un método estandarizado de extracción de ADN para las características físicas y biológicas del camarón *Penaeus vannamei* es un limitante para el conocimiento de su diversidad (Giacomazzi *et al.*, 2005) y elegir un método adecuado para la extracción de los ácidos nucleicos depende del estudio de varios factores como; pureza requerida, tamaño de fragmento requerido, tipo de muestra y cantidad de muestra que se posee (Mirmomeni *et al.*, 2010), todos estos factores son claves para cualquier estudio del material genético.

En este trabajo se escogieron como muestras; un pool de intestino y un pool de hepatopáncreas de camarón *P. vannamei* y para la extracción de su ADN se seleccionaron dos diferentes métodos, siguiendo una guía de criterios claves mencionados por Sandoval & Armendáriz (2016).

Se escogió un método convencional modificado con una extracción por fenol – cloroformo, un método generalmente muy utilizado por sus buenos resultados, reproducible, sencillo y de bajo costo (Lopera-Barrero *et al.*, 2008); (Sánchez *et al.*, 2016), que se enfrentó a un kit comercial de extracción “PureLink TM microbiome”, método rápido y eficiente para investigaciones con microbiomas (Scientific, 2015), el método se escogió debido a que las muestras de intestino y hepatopáncreas de *P. vannamei*, presentan una gran cantidad de bacterias (Rungrassamee *et al.*, 2014), y estas, están estrechamente relacionadas con el proceso fisiológico y las funciones biológicas de todo el ciclo vital del camarón *P. vannamei* (Bou *et al.*, 2011); (Garibay *et al.*, 2020).

En este trabajo se evaluaron los dos métodos seleccionados y se demostró la efectividad que puede conseguir un método convencional modificado, frente a un kit comercial para la extracción del ADN de camarón *P. vannamei*, estos resultados se han visto reflejados en estudios realizados con diferentes crustáceos, como en la extracción de ADN del *Macrobrachium carcinus*, en donde el método convencional con fenol – cloroformo reflejó similitud frente al kit comercial de extracción “ENZA”, en cuanto a la concentración de ADN (Rodríguez, 2017).

El promedio de las concentraciones de ADN que se obtuvieron por el método convencional modificado fueron; para intestino 518.96 ng/mL y para hepatopáncreas 496.4 ng/mL y el promedio de las concentraciones obtenidas con el kit comercial PureLink Tm fueron; para intestino 111.5 ng/mL y para hepatopáncreas 67.76 ng/mL. Los resultados de las extracciones de ADN se lograron de acuerdo a lo requerido, excepto, por el resultado de la extracción con kit para hepatopáncreas, los demás valores de las extracciones servirían para tratamientos y estudios posteriores como secuenciación, según Necochea y colaboradores (2004), las lecturas se realizaron con la ayuda del equipo Qubit 2.0, fluorómetro diseñado para medir las concentraciones de ADN con una alta sensibilidad y en el stock requerido (Perez, 2018).

La evaluación de los métodos de extracción, según los análisis estadísticos realizados con ANOVA, indicaron que para la extracción de intestino, los dos protocolos pueden dar resultados eficientes y esto se verificó mediante el método estadístico Tuckey, que compara la similitud entre ambos métodos según sus resultados (Silva *et al.*, 2017). Pero, para la extracción del ADN de hepatopáncreas los dos métodos de extracción indicaron ser significativamente diferentes, resultado que puede inferirse a la presencia de inhibidores tales como, la fase grasa encontrada en el proceso de la extracción de los ácidos nucleicos ya que, en el hepatopáncreas se encuentra una gran cantidad de fosfolípidos, triglicéridos y es el órgano encargado de metabolizar estos lípidos y absorber los nutrientes (NRC, 2011).

La fase grasa fue eliminada en el protocolo con fenol – cloroformo por su visibilidad en el tubo cónico en el proceso de extracción, paso esencial que no se pudo realizar en el protocolo del kit comercial, por lo que, las concentraciones de ADN obtenidas fueron menores relacionadas a las obtenidas por el método convencional modificado.

En el estudio realizado por Gonzales de la Cruz y colaboradores (2011), en la extracción del ADN de langostino *M. carcinus*, con la metodología de suelos y sedimentos planteada por Rojas y colaboradores (2008), no se obtuvieron resultados para el hepatopáncreas ya que inhibidores restringían la recuperación del ADN (Rojas-Herrera *et al.*, 2008), inhibidores tales como ácidos biliares y ácidos grasos que se encontraron en el sistema digestivo del langostino (Ahearn, 1978).

Las metodologías de extracción del ADN de *P. vannamei* como para *M. carcinus* son distintas, pero se encuentra una similitud en la muestra de hepatopáncreas, para lo cual se plantea que es necesario en cualquier protocolo de extracción de ADN en donde la muestra contenga ácidos grasos, una preparación previa de la muestra, en donde se tenga como propósito romper las cadenas saturadas para su posterior extracción del ADN (Gonzales, 2011).

La evaluación de la calidad del ADN de intestino y hepatopáncreas de *P. vannamei* extraído por ambos métodos, se realizó mediante electroforesis, con una concentración en gel de agarosa al 0.5%, para obtener una estimación de la concentración y el grado de entereza (Fierro, 2011), se observaron diferencias en las bandas generadas para una misma muestra, con un protocolo diferente de extracción.

Los resultados de las electroforesis realizadas con las concentraciones de ADN de intestino y hepatopáncreas, obtenidas con el método convencional modificado mostraron tamaños de fragmentos mucho mayores a los del marcador de peso molecular, que contenía repeticiones de pares de bases, desde 100 pares de bases, hasta 2 072 pares de bases (Acuña *et al.*, 2019), los resultados se ven reflejados en las electroforesis realizadas con las concentraciones de ADN de intestino y hepatopáncreas obtenidas con el kit de extracción PureLink TM, y la diferencia observada con respecto a la ausencia y presencia de bandas de las concentraciones obtenidas de una misma muestra, se puede deber al diferente método de extracción o a presiones ambientales y la composición de la microbiota del intestino o hepatopáncreas, que se encontraba y difería en las muestras analizadas (Gamboa *et al.*, 2003).

La contaminación presente en los carriles de los geles se mostró especialmente en las electroforesis realizadas con los resultados del método convencional modificado, acentuándose mucho más en las concentraciones de ADN de hepatopáncreas, en este caso se puede inferir que, el método ocupado necesitaba incorporar en su protocolo de extracción más lavados con cloroformo para separar totalmente los contaminantes como; proteínas y ARN, del ácido nucleico o ejecutar una filtración con columnas específicas para eliminar las impurezas (Salazar *et al.*, 2015), columnas que se ven presentes en el kit PureLink TM y que junto a su lisis tripe puede eliminar eficientemente los contaminantes (Scientific, 2019), método con el cual, las concentraciones de ADN extraídas de intestino y hepatopáncreas resultaron tener un grado de pureza superior y no presentaron contaminación en los resultados de su electroforesis.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Al final del estudio se concluyó que, el método más aceptable en cuanto a los resultados de las concentraciones de ADN de camarón *Penaeus vannamei* obtenidas fue, el método convencional modificado con su extracción por fenol cloroformo, además, por ser un método de bajo costo y sencillo para el operario.

La caracterización de los dos métodos demostró una efectividad y una similitud en cuanto a sus protocolos de extracción de ADN de intestino, mientras que para el ADN de hepatopáncreas se presentó complejidad con el Kit de extracción y una diferencia significativa entre los dos protocolos, debido a la presencia de inhibidores, mostrando la necesidad de una efectiva preparación de la muestra antes de su extracción.

En cuanto a la pureza del ADN, el kit de extracción PureLink™, presentó una mayor entereza en las concentraciones de ADN de intestino en los resultados electroforéticos. El método convencional modificado podría alcanzar una pureza parecida a la del kit comercial de extracción, si en su protocolo de extracción se incrementara el número de lavados con cloroformo o una columna específica de filtración.

La elección con respecto al costo beneficio de un método dependerá del futuro tratamiento que se desee dar al ADN obtenido, en este caso los resultados de la calidad y cantidad de las concentraciones de ADN de cada muestra de intestino y hepatopáncreas de camarón *Penaeus vannamei*, serán claves para posteriores estudios y esencialmente análisis genéticos como el estudio de metagenómica.

Los métodos estadísticos utilizados para verificar la normalidad de los datos y comparar la similitud entre ambos protocolos, resultaron ser simples de usar, gracias al software Minitab 2019, mostrando resultados fáciles de interpretar.

5.2 RECOMENDACIONES

Las muestras de camarón *P. vannamei*, deben ser recolectadas con sumo cuidado y respeto, para no estropear el material genético, manteniendo una asepsia controlada evitando la contaminación y usando material de laboratorio esterilizado durante su disección.

El desarrollo de los protocolos de extracción necesita obligatoriamente una asepsia total del área de trabajo y una correcta manipulación de los implementos utilizados, para evitar completamente la contaminación cruzada entre las muestras.

Para la extracción de ADN se requiere un completo estudio de la muestra, en el caso de la muestra de hepatopáncreas se recomienda eliminar los ácidos grasos que puedan inhibir la extracción del material genético y en las muestras de intestino realizar varios lavados con cloroformo hasta obtener una muestra limpia.

Los protocolos de extracción del ADN, deben seguirse a exactitud en cuanto a los requerimientos de tiempos y temperaturas a las que se someterán las muestras, asegurarse de que las soluciones a ocupar cumplan con el pH requerido y es necesario evitar las agitaciones bruscas o exageradas, todos estos factores deben ser controlados para no estropear las muestras y obtener éxito en los resultados de las extracciones.

La mayor recomendación que se puede realizar, es directamente a los estudiantes, para que se interesen en proyectos dirigidos a investigaciones y análisis genéticos, ya que se observó que las bases de datos relacionadas con el estudio genético de varias especies que son de gran interés aún no han sido estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M., Ramírez, A., & Umaña, A. (2019). *Cuantificación y cualificación de ADN y ARN de Phaseolus vulgaris, sometidos a dos regímenes lumínicos*. p. 6. Cartago: Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Ahearn, G. (1978). Allosteric cotransport of sodium, chloride, and calcium by the intestine of freshwater prawns. *The Journal of Membrane Biology*, 42(3), 281–300.
<https://doi.org/10.1007/BF01870363>
- Alicia, C., Peña, P., Dapena, J., Galisteo, E., Antonio, J., Ruiz, B., & Alfonso, G. (2005). *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. Córdoba.
- Andriantahina, F., Liu, X., Feng, T., & Xiang, J. (2013). Current Status of Genetics and Genomics of Reared Penaeid Shrimp: Information Relevant to Access and Benefit Sharing. *Marine Biotechnology*, 15(4), 399–412. DOI: 10.1007/10126-013-9500-9
- Ardila, N., Navas, G., & Reyes, J. (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: shorturl.at/mnH29
- Arias, F. G. (2012). El Proyecto de Investigación - Introducción a la metodología científica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). Editorial Episteme.
- Ávila, J., Cutipa, B., Quispe, Z., & Sumiri, R. (2015). *Edta conceptos-basicos*. Universidad Andina.

- Biddle, J., Lipp, J., Lever, M., Lloyd, K., Sørensen, K., Anderson, R., ... Hinrichs, K. (2006). Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(10), 3846–3851.
- Bonda, M., McGladdery, S., & East, I. (2001). *Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*.
- Bordenstein, S., & Theis, K. (2015). Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biology*, *13*(8), e1002226.
- Borrell, Y., Espinosa, G., Vázquez, E., Sánchez, J., & 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.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Antonio, J., & Valdezate, S. (2011). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *29*(8), 601–608.
- Bray, W., Lawrence, A., & Leung, J. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, *122*(2–3), 133–146.
- Bustos, C., Cango, A., Chalán, L., Espinoza, S., & Vargas, V. (2011, January 27). Cuantificación de muestras de dna mediante el kit quant.
- Cahuana, K. (2014). *Evaluación de la sobrevivencia de postlarvas de camarón Litopenaeus vannamei, en diferentes procesos de recepción, transporte y siembra*. Universidad Técnica de Machala, Machala.
- Calderón, J. (1993). La nutrición y alimentación en la acuicultura de América Latina y el Caribe. Retrieved March 2020, from Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas.

- Carrillo, F., & González, R. (2000). *Control de la digestión en camarones*. La Habana.
- Carvajal, J., Castillo, E., Lagos, I., Mora, B., & Tonguino, N. (2013). *Electroforesis en gel de agarosa para determinar cantidad y calidad de ADN en Anadara tuberculosa*. p. 15. San Juan Pasto: Universidad de Nariño.
- Cerritelli, S., & Crouch, R. (2009). Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes. *FEBS Journal*, 276(6), 1494–1505.
- 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.
- Corrales, D., & Sambache, M. (2018). *Amplificación del Gen runx3 y Análisis de variables clínico patológicas de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en el hospital Carlos Andrade Marín*. UDLA, Quito.
- 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. 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)*.
- Egusa, S. (1990). *Advances in Marine Biology* (VII). New York: Academic Press Limited.
- FAO. (2006). Programa de información de especies acuáticas - *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Retrieved March 6, 2020, from: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura website: shorturl.at/jlmBC
- Fenucci, J. (2016). *Manual para la cria de camarones peneidos*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/AB466S/AB466S00.htm>
- Fierro, F. (2011). *Electroforesis de ADN*. Ciudad de México.

- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Carpenter, K., & Niem, V. (1995). Vertebrados . *Guía para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental*. Retrieved from: <http://www.fao.org/docrep/010/t0852s/t0852s00.htm>
- Forster, J., Harkin, V., Graham, D., & McCullough, S. (2008). The effect of sample type, temperature and RNAlater™ on the stability of avian influenza virus RNA. *Journal of Virological Methods*, 149(1), 190–194.
- Gamboa, J., Molina, C., & Cahu, C. (2003). Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*, 34(15), 1403–1411. DOI: 10.1111/1365-2109.2003.00959
- 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. *Biotecnia*, 22(1), 6–16.
- Giacomazzi, S., Leroi, F., & Joffraud, J. J. (2005). Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1230–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02574.x>
- Gonzales, C., & Luis, J. (2003). Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. *Rev Med Hered*, 14(4).
- Gonzales de la Cruz, J. (2011). Protocolo para la extracción de adn metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3), 875–883.
- Haws, M., Boyd, C., & Green, B. (2001). *Buenas Prácticas de Manejo en el Cultivo de Camarón en Honduras*.

- Herrnkind, W. F., & Lipcius, R. N. (2013). Habitat Use and Population Biology of Bahamian Spiny Lobster. *Aquatic Commons*, 1–14.
- Hu, Y., Li, F., Zheng, Y., Jiao, X., & Guo, L. (2020). Isolation, molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of *Vibrio parahaemolyticus* from aquatic products in the southern Fujian coast, China. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Invitrogen. (2007). *Alta sensibilidad de los ensayos Quant-iT*. Retrieved from www.invitrogen.com.ar
- Kumlu, M., Eroldogan, O., & Aktas, M. (2000). Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus*. *Aquaculture*, 188(1–2), 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00330-6)
- Lopera-Barrero, N. M., Povh, J., Ribeiro, R., Gomes, P., Jacometo, C., & Silva, T. (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>
- Markofsky, S. (2000). Nitro Compounds, Aliphatic. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. https://doi.org/10.1002/14356007.a17_401
- Miller, R. G. (1981). *Simultaneous statistical inference*. Springer-Verlag.
- Mirmomeni, M., Sajjadi, S., Sisakhtnezhad, S., & Doranegard, F. (2010). Comparison of the Three Methods for DNA Extraction from Paraffin-Embedded Tissues. *Journal of Biological Sciences*, 10(3), 261–266. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.261.266>
- Monroy, E., Fernández, C., Díaz, R., Martínez, G., Zaragoz, 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.

- Morales, V. (1990). *Levantamiento larvario de camarones peneidos*. Panamá.
- Moreno, C. (2007). *Moluscos y crustáceos asociados a las raíces sumergidas de Rhizophora mangle (Linnaeus, 1753) y su relación frente a la “ciénagas del ostional y navío y ciénaga de la soledad” (córdoba), caribe colombiano*. Fundación Universidad de Bogotá, Córdoba.
- Nayak, S. . (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Necochea, R., & Canul, J. (2004). *Secuenciación de Ácidos Nucleicos*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- NRC. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp* . N.Y.: National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.
- Ordoñez, R. (2017). *Escuela superior politécnica del litoral facultad de ingeniería marítica 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., Conte, F., MacGrath, W., & Miller, B. (1974). An intensive culture system for penaeid shrimp. *Proceedings of the Annual Meeting - World Mariculture Society*, 5(1–4), 65–79.
- Patricia, L., Velázquez, A., Del Consuelo, M., Martínez, A., & Romero, A. C. (2015). *Extracción y purificación de ADN*. México.

- Pérez, L., Rodríguez, F., Langebaek, C., & Groot, H. (2016). Cuantificación en tiempo real de un conjunto de muestras colombianas de relevancia histórica mediante la detección de un fragmento corto de la región hipervariable II del ADN mitocondrial. *Biomédica*, *36*, 475–482. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3098>
- Perez, M. (2018). Análisis de calidad y cantidad del RNA y DNA – Cabimer. Retrieved March 14, 2020, from Cabimer website: <https://www.cabimer.es/web3/unidades-apoyo/genomica/analisis-de-calidad-y-cantidad-del-rna-y-dna/>
- Plaza, M., & Nuñez, A. (2016). *Industria de Pesca, estudios industriales orientación estratégica para la toma de decisiones*. Guayaquil.
- 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, 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.
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., & Mena-Martínez, M. E. (2008). A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology*, *40*(1), 13–17. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9061-8>
- Rojas, Haws, & Cabanillas. (2015). *Buenas Prácticas de Manejo Para el Cultivo de Camarón*. California.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2014). Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS ONE*, *9*(3).

- Salazar, A., Cruz, E., Lloveras, J., & Urriolagoitia, G. (2015). Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos para utilidad para amplificación por PCR. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *17*(1), 131–142. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Salazar, C., Niño, C., & Díaz, R. (2017). Color Bands Detection on a Gel Electrophoresis Image in one Dimension Applying a Location Algorithm Based on Maximums and Minimums. *Scielo*, *14*. <https://doi.org/10.15332/iteckne.v14i2.1766>
- Sánchez, E., Calleros, E., Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O., Hernández, S., & Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, *26*. <https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>
- Sandoval, S., & Armendáriz, J. (2016). *Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud BIOLOGÍA MOLECULAR*. Retrieved from www.mhhe.com/med/salazar_bmfa1e
- Scientific, T. F. (2015). *PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit Purification of high-quality microbial DNA from microbial culture and transport media samples*.
- Silva, C., Jadue, J., Crivelli, A., & Baccioni, E. (2017). Análisis estadístico y aplicaciones del S.A.S. *Contribuciones Científicas y Tecnológicas*.
- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Thermo Fisher Scientific. (2019). Thermo Fisher Scientific. Retrieved November 8, 2019, from PureLink™ Genomic DNA Mini Kit website: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001?fbclid=IwAR1b-1j18S6KVbAPB-d2wloCRcPi0JEoj9Lx196S-nlU-EXfmugspXJ8cDY#/K182001>

- Valle, C. (2002). *Instituto tecnologico de costa rica escuela de biologia informe de práctica de especialidad comparacion de tres metodos de extraccion de ADN de restos oseos. complejo de ciencias forenses del organismo de investigacion judicial, heredia*. Cartago.
- Villalobos, R., Pérez, A., Luz, P., & Castro, F. (2006). *Diversidad y diferenciación genética con marcadores rapds en poblaciones naturales de Pinus Strobiformis*. Universidad de Guadalajara, Jalisco.
- Walter, K., Morán, A., & Asesor, A. (2020). *Análisis y Propuesta de un modelo de fuente de poder de voltaje variable para electroforesis en gel de agarosa*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Peru.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481.
<https://doi.org/10.2144/97223st01>
- Yoshikawa, H., Dogruman-AI, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N., & Sultan, N. (2011). Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. *Parasitology Research*, 109(4), 1045–1050.
<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2342-3>

ANEXOS

Anexo 1. Piscinas de las distintas camaroneras de la provincia de El Oro y Santa Elena.



Figura 27 Camaronera Valeria, en la provincia de El Oro, en Huaquillas.



Figura 28 Camaronera Valeria, piscina 1, coordenadas: 3°22'57" S, 80°7'39" O



Figura 29 Camaronera Valeria, piscina 2, coordenadas: 3°23'1" S, 80°7'37" O.



Figura 30 Camaronera Valeria, piscina 3, coordenadas: 3°22'57" S, 80°7'41" O.



Figura 31 Camaronera Rodríguez en la provincia de El Oro en Arenillas.



Figura 32 Camaronera Rodríguez: piscina 1, coordenadas 3°30'35" S, 80°11'30" O.



Figura 33 Camaronera Rodríguez, piscina 2, coordenadas: 3°30'36" S, 80°11'29" O.



Figura 34 Camaronera Rodríguez, piscina 3, coordenadas: 3°30'34" S, 80°11'23" O.



Figura 35 Camaronera Camarosa de la provincia de El Oro, en Machala, piscina 1.



Figura 36 Camaronera Camarosa, piscina 2.



Figura 37 Camaronera Camarosa, piscina 3.



Figura 38 Camaronera en Chanduy, Provincia de Santa Elena, piscina 1.



Figura 39 Camaronera en Chanduy, piscina 2.



Figura 40 Camaronera en Chanduy, piscina 3.



Figura 41 Camaronera Bagen, piscina 1. En esta camaronera debido a sus restricciones no se pudieron capturar más fotografías.

Anexo 2. Recolección de camarones *P. vannamei* en las diferentes piscinas



Figura 42 Recolección de camarones, en la provincia de Santa Elena.



Figura 43 Recolección de camarones, en la provincia de El Oro.

Anexo 3. Protocolo convencional modificado con fenol – cloroformo

Fase 1. Preparación de la muestra

1. Se pesa 1g de la muestra en un tubo cónico de 2mL y se agrega 1 mL de TEN para macerar con ayuda de un pistilo.



Figura 44 Macerado de la muestra mezclada con TEN

2. Homogenizar la muestra macerada dentro del tubo agregando 1 mL más de TEN. Asegurarse de no rebasar el volumen en el tubo.

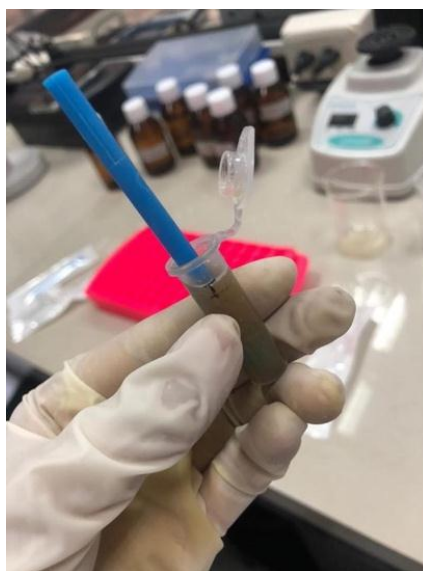


Figura 45 Muestra macerada con 2 mL de TEN

3. Llevar al vórtex para agitar las muestras por 30 segundos.



Figura 46 Agitado de las muestras en vórtex para mejorar la homogenización

4. Incubar a 65 °C por 10 minutos en baño seco.



Figura 47 Baño seco con las muestras de ADN en su interior

5. Centrifugar a 10 000 g por 10 minutos a 4 °C.



Figura 48 Centrifuga configurada para el proceso

6. Enfriar a -20 °C por 10 minutos.



Figura 49 Muestras almacenadas a -20 °C

7. Centrifugar a 10 000 g por 10 minutos a 4 °C. En la muestra de hepatopáncreas se forman tres fases, la fase grasa que se encuentra en el parte superior del tubo cónico debe ser eliminada.



Figura 50 Extracción de la primera capa que contiene alta cantidad de grasa

8. Recuperar en otro tubo cónico de 2 mL nuevo, 1 mL del sobrenadante de cada muestra.

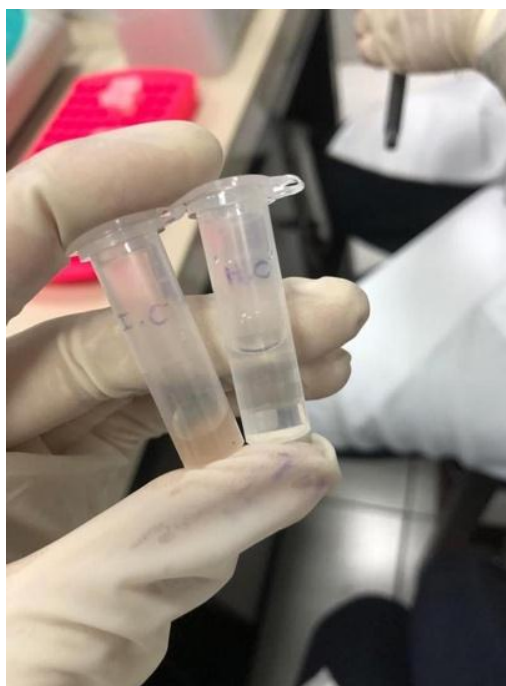


Figura 51 Traspaso del sobrenadante a tubos cónicos nuevos

Fase 2. Extracción de ADN

1. Añadir SDS a una concentración final de 1% (100 μ L), RNAsa a una concentración final de 0.1 mg/mL (5.5 μ L), e incubar a 37 °C durante 5 minutos.

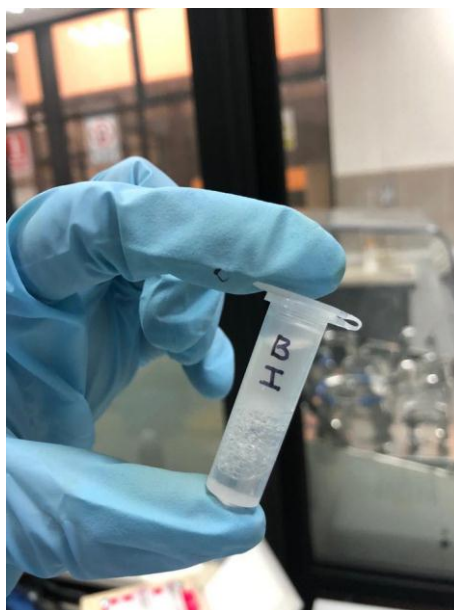


Figura 52 Muestra con SDS y RNAsa lista para proceder a incubar

2. Añadir 1 volumen de fenol (1 mL) (pH 6.6) y agitar en un vórtex durante 30 segundos.



Figura 53 Muestra con fenol para luego agitar en el vórtex

3. 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.



Figura 54 Sobrenadante transferido a un tubo cónico nuevo

4. Añadir 1 volumen de fenol (500 μ L) (pH 6.6): cloroformo (500 μ L) (1:1) y agitar en vórtex durante 30 segundos.



Figura 55 Fenol utilizado en el proceso con un pH de 6.6

5. 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.



Figura 56 Centrifuga configurada a 5 minutos para obtener el nuevo sobrenadante

6. Añadir 1 volumen de cloroformo (1 mL) y agitar en un vórtex durante 30 segundos.



Figura 57 Vórtex listo para la agitación

- Centrifugar a 16 000 g durante 5 minutos a 4 °C y transferir el sobrenadante (1 mL) dividido en dos alícuotas de 500 µL a dos tubos c de 1.5 mL nuevos.

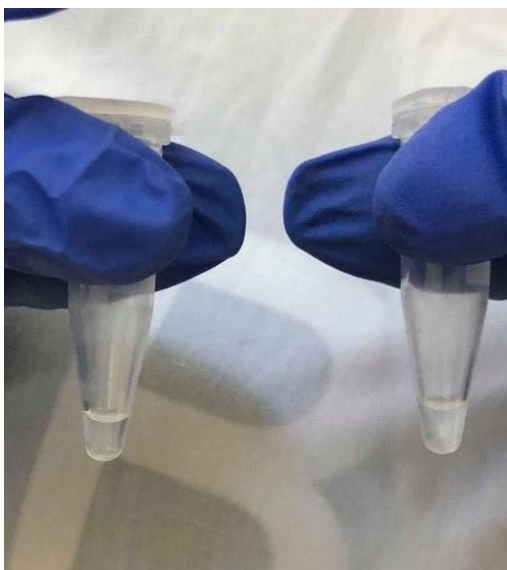


Figura 58 Tubos de 1.5 mL con la muestra dividida en alícuotas de 500 µL

- Añadir a cada tubo 2 volúmenes de etanol absoluto (1 mL) a -20 °C + 1/10 volumen de acetato sódico (40 µL) 3M (pH 5.2) y guardar a -20 °C durante un tiempo mínimo de 1 hora.



Figura 59 Todas las muestras divididas en las dos alícuotas de 500 µL cada una

9. Centrifugar a 16 000 g durante 15 minutos a 4 °C, tirar el sobrenadante, dar un pulso en la centrifuga y retirar lo que quede de sobrenadante con una micropipeta.



Figura 60 Sobrenadante desechado con cuidado, para la obtención del pellet

10. Añadir 1 mL de etanol al 70%.



Figura 61 Etanol siendo agregado a las muestras en una cámara de extracción.

11. Centrifugar a 16 000 g durante 15 minutos a 4 °C, desechar el sobrenadante, dar un pulso en la centrifuga y retirar lo que quede de sobrenadante con una micropipeta.



Figura 62 Interior de centrifuga donde las muestras son colocadas de manera que no se ocasione un desequilibrio



Figura 63 Retirado del sobrenadante con la ayuda de una micropipeta

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



Figura 64 Tubos cónicos con tapas abiertas dentro de una campana de extracción para secado del precipitado.



Figura 65 Muestra luego de una hora en la campana de extracción

13. Añadir 50 μL de TE $_{1/10}$ E (pH 7.5) sobre el precipitado y dejar que se suspenda a 4° C durante toda la noche. El ADN quedará listo para ser usado o almacenado.



Figura 66 Muestras con TE (pH:7.5)

Anexo 4. Protocolo de extracción de and con kit “PureLink™ DNA microbiome”

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



Figura 67 Solución S1:Lysis Buffer



Figura 68 Pesado de muestra dentro de cada bead tube

2. Coloque en vórtex hasta que la muestra se disperse en el líquido.



Figura 69 Muestras en los bead tubes más lysis Buffer antes de ir al vórtex

3. Añada 100 uL de **Lysis Enhancer** y lleve al vórtex brevemente.

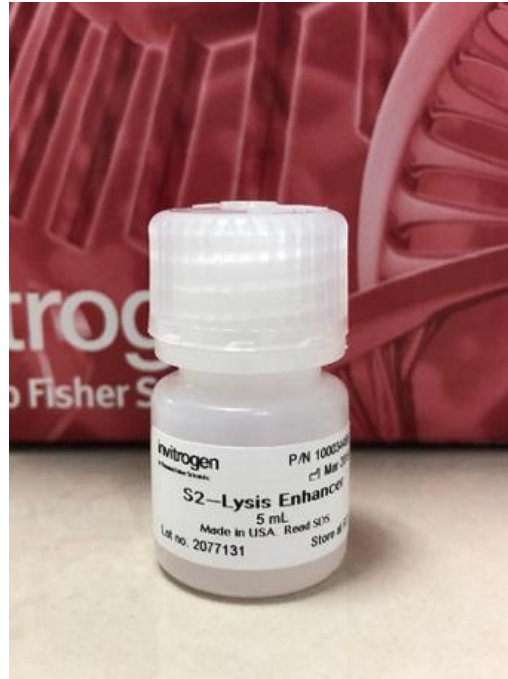


Figura 70 Solución S2: Lysis Enhancer

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

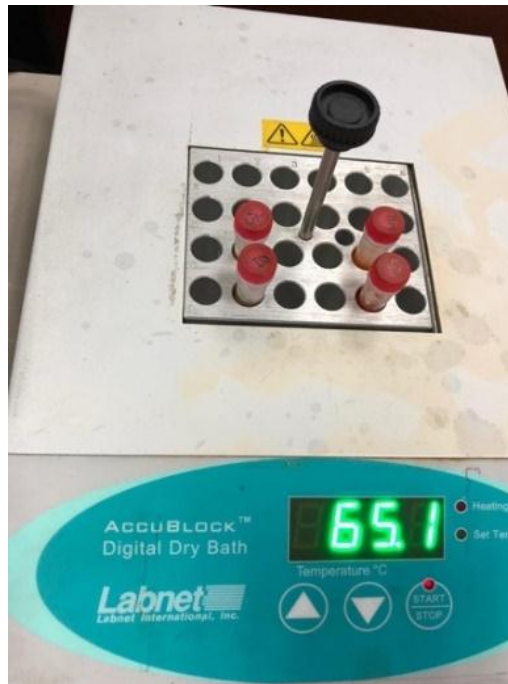


Figura 71 Muestras sometidas a 65 °C

5. Homogenice la muestra utilizando el adaptador del vórtex por 10 minutos a velocidad máxima.

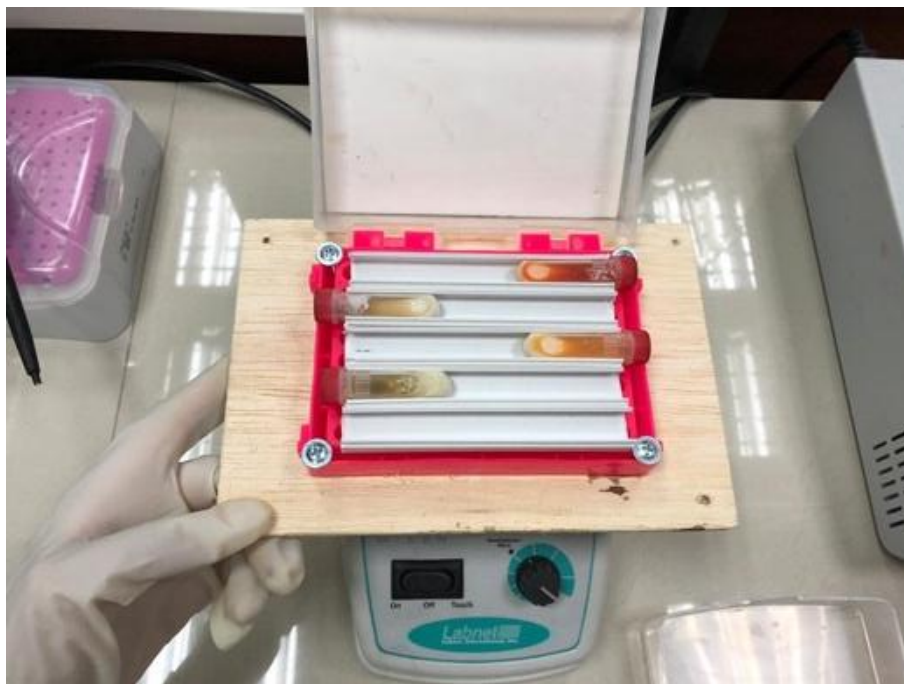


Figura 72 Las muestras nuevamente sometidas a agitación en el vórtex.

- Centrifugue a 14 000g por 5 minutos.



Figura 73 Centrifuga programada

- Transfiera hasta 400 uL del sobrenadante a un tubo nuevo.

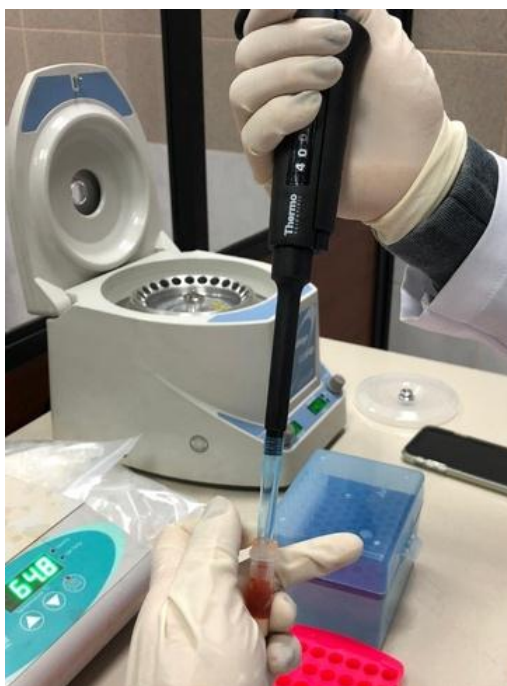


Figura 74 Transferencia del sobrenadante con ayuda de una micropipeta



Figura 75 Sobrenadante en un nuevo tubo

8. Añada 250 μ L de **Cleanup Buffer** y lleve al vórtex de manera inmediata para asegurarse dispersión homogénea y eliminación de inhibidores (ácidos biliares, ácidos húmicos, etc.).

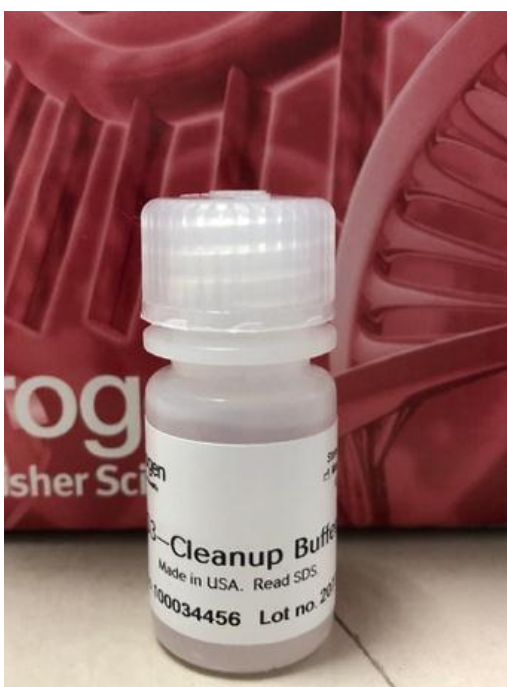


Figura 76 Solución S3: Cleanup Buffer

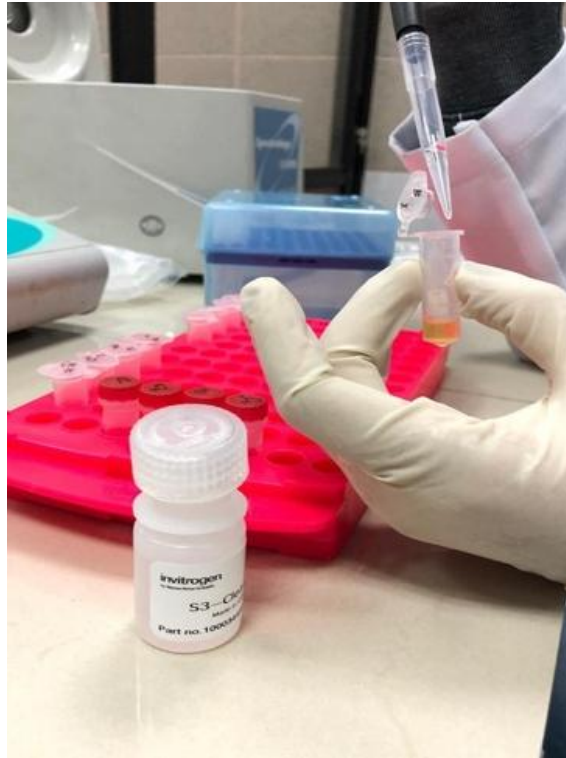


Figura 77 Reactivo colocado en cada muestra con una micropipeta

9. Centrifugue a 14000 g por 2 minutos.



Figura 78 Centrifuga configurada

10. Transfiera hasta 500 uL del sobrenadante a un tubo nuevo, evite tocar el precipitado y cualquier residuo.



Figura 79 Transferencia del sobrenadante a otro tubo

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



Figura 80 Solución S4: Binding Buffer

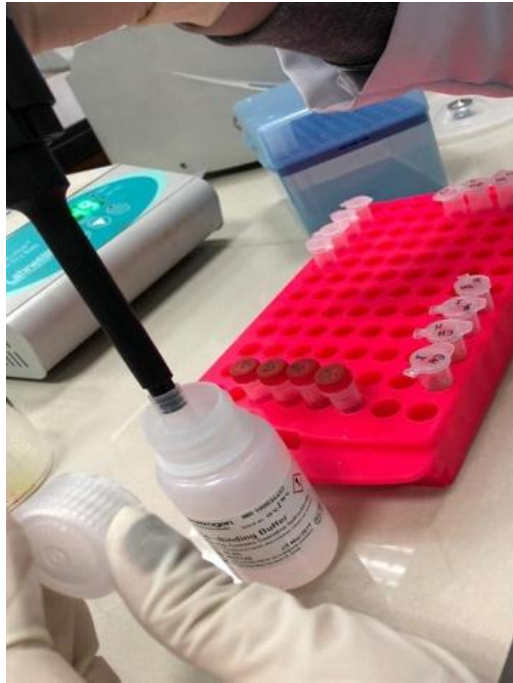


Figura 81 Reactivo siendo agregado a los tubos con columnas adaptadas

12. Cargue 700 uL de la mezcla en una columna (spin column) acoplada a un tubo.



Figura 82 Tubos con columnas para el proceso

13. Centrifugue a 14 000 g por 2 minutos. Descarte el sobrenadante y repita nuevamente.



Figura 83 Centrifuga programada para el proceso

14. Para lavar el ADN coloque la “spin column” en un tubo nuevo y añádale 500 uL de **Wash Buffer**.



Figura 84 Solución S5: Wash Buffer

15. Centrifugue a 14 000 g por 1 minuto.



Figura 85 Muestras en centrifuga programada para el proceso

16. Descarte el líquido y centrifugue nuevamente por 30 segundos a 14 000 g para eliminar el Wash Buffer.

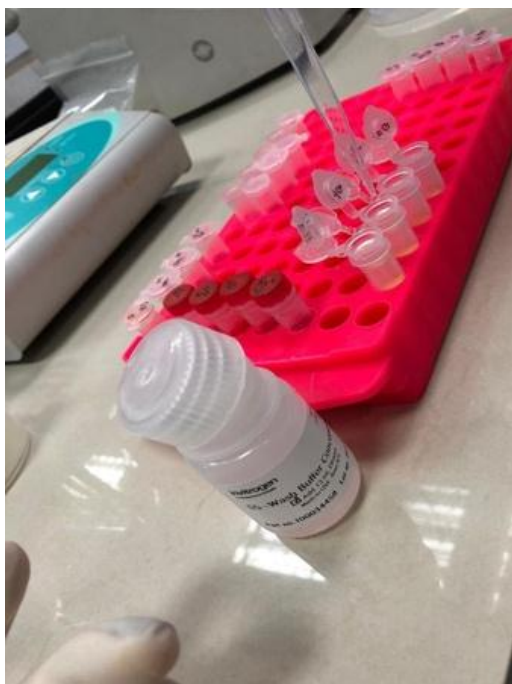


Figura 86 Reactivo wash buffer agregado a las muestras

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 87 Solución S6: Elution Buffer

18. Coloque nuevamente el eluido que contiene el ADN, sobre la columna y aplique una segunda elución.



Figura 88 Aplicación de la segunda elución

19. Centrifugue por 1 minuto a 14 000 g y descarte la columna.



Figura 89 Muestras colocadas en la centrifuga

20. El ADN purificado se encuentra en el tubo y listo para uso o para almacenarlo.



Figura 90 Columna desechada para obtener el ADN



Figura 91 Tubos rotulados con el ADN obtenido