



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS



RESUMEN – TESIS DE GRADO

AUTORES: ERWIN HERNANDO JACOME CASTILLA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIO DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

DIRECTOR: VÍCTOR MANUEL TIBATÁ RODRÍGUEZ

TITULO DE LA TESIS DETERMINACION DE CEPAS CIRCULANTES EN LA COSTA ATLANTICA COLOMBIANA, DEL VIRUS DEL SINDROME DEL TAURA (TSV) EN *Litopenaeus vannamei* MEDIANTE EL ANALISIS DE VARIACION DEL GEN DE LA PROTEINA DE CAPSIDE VP1.

RESUMEN

La producción de camarón de cultivo es una actividad agropecuaria relativamente reciente que tiene su inicio en el sur-este de Asia, utilizando métodos rudimentarios consistentes en capturar y encerrar camarones juveniles en estanques con agua salobre durante algunos meses para esperar su engorda y así poderlos cosechar.

Por lo tanto en esta investigación se buscó la posible variabilidad del gen que codifica para la proteína de capsido VP1 de TSV esto debido a que había reportes de nuevos brotes de Taura a pesar de estar empleando camarones resistentes al virus producidos por Ceniagua. Estas mutaciones según los reportes, pueden otorgarle al virus la capacidad de ampliar su rango de hospederos y aumentar o disminuir su nivel de infección (Refugio Robles-Sikisaka et al 2002, Heidi S. Erickson et al 2002).

CARACTERISTICAS

PAGINAS 100 PLANOS ILUSTRACIONES CD-ROM 1

**DETERMINACION DE CEPAS CIRCULANTES EN LA COSTA ATLANTICA
COLOMBIANA, DEL VIRUS DEL SINDROME DEL TAURA (TSV) EN
Litopenaeus vannamei MEDIANTE EL ANALISIS DE VARIACION DEL GEN DE
LA PROTEINA DE CAPSIDE VP1.**

ERWIN HERNANDO JACOME CASTILLA

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA
2005**

**DETERMINACION DE CEPAS CIRCULANTES EN LA COSTA ATLANTICA
COLOMBIANA, DEL VIRUS DEL SINDROME DEL TAURA (TSV) EN
Litopenaeus vannamei MEDIANTE EL ANALISIS DE VARIACION DEL GEN DE
LA PROTEINA DE CAPSIDE VP1.**

ERWIN HERNANDO JACOME CASTILLA

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero de
producción biotecnológica**

**Director
VÍCTOR MANUEL TIBATÁ RODRÍGUEZ
Ingeniero de producción biotecnológica**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA
2005**



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 29 DE SEPTIEMBRE DE 2005

HORA: 10:00 A.M.

LUGAR: 3 PISO EDIFICIO CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

TITULO DE LA TESIS: "DETERMINACION DE CEPAS CIRCULANTES EN LA COSTA ATLANTICA COLOMBIANA, DEL VIRUS DEL SINDROME DEL TAURA (TSV) EN LITOPENAEUS VANNAMEI MEDIANTE EL ANALISIS DE VARIACION DEL GEN DE LA PROTEINA DE CAPSIDE VP1".

JURADOS: LILIANA Y. SUAREZ CONTRERAS
FABIAN GALVIS SERRANO
ALBERTO SARMIENTO CASTRO

DIRECTOR: VICTOR MANUEL TIBATÁ R.

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
ERWIN HERNANDO JACOME C.	610135	4.5

OBSERVACIONES:
TESIS MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

Cierro mis ojos y me parece estar viviendo en cámara lenta la historia de mi vida, cada paso en mi camino, todas mis alegrías, tristezas, sueños, esperanzas, ilusiones, todo un conjunto de sentimientos que abarcan cada centímetro de mi ser, siempre acompañado del amor de mi familia y de la protección eterna de Dios.

Y abro mis ojos y me encuentro aquí cumpliendo una de las metas mas importantes en mi vida, convirtiéndome en un profesional, gracias a la ayuda y colaboración de seres especiales que invirtieron en mi, tiempo, confianza, amor, respeto, solo a cambio de una sonrisa, un abrazo, un beso, viendo en mi el reflejo real de sus metas de juventud aquel día en que unieron sus vidas... mis padres.

Nando y Judith, los mejores padres que Dios puso en mi camino, hoy este titulo mas que mío es de ustedes, gracias por enseñarme el verdadero valor de la vida, por enseñarme a caminar, hablar, vivir, pensar a querer y a luchar en esta vida llena de obstáculos a superar; a ustedes les debo mi vida, con todo el amor del mundo y desde mis entrañas muchas gracias por hacerme parte de sus vidas.

A mis hermanos, Naydú y Eduardo, gracias por ayudarme a construir mi futuro, gracias por acompañarme y brindarme su amor, un pedazo de ustedes siempre acompaña mi vida. Nay gracias por ser mi hermanita preciosa. Eduardo eres mi hermano de vida, hoy quiero regalarles un pedazo de mi vida con todo el amor. A Saúl y Dalgy les digo con todo el corazón hermanos este titulo también tiene un pedacito de ustedes, muchas gracias.

Hoy todo es felicidad, no hay campo para la tristeza por la ausencia de parte de mi vida: mis recuerdos y mi amor, gracias abuelita Cecilia por el amor y los valores que les distes a mis padres, hermanos y a mi, yo se que hoy desde el cielo estas feliz por el logro que juntos alcanzamos este día, ni mis lagrimas

podrán opacar la felicidad eterna que hoy sientes al verme graduado, gracias a mi abuelito chepe por todo su amor y esos últimos años a mi lado, hoy quiero dedicarte mi logro, gracias. Eterna gratitud a mis abuelitos Ana y Luís, que con fervoroso ahínco educaron a mi padre con los valores más hermosos y me brindaron la oportunidad de tener un gran papá. A mis abuelos Cecilia, Ana, Luís, y chepe, gracias por la hermosa familia que me dieron, hoy también para ustedes es este título y todo mi amor.

A mi tío Fredy, a Carlos y Esperanza muchas gracias por abrirme las puertas de sus vidas y permitirme acompañarlos, minuto a minuto de sus existencias, el calor que ustedes me brindaron acabo con el frío de Bogotá, gracias por sus risas, sus palabras y compañía, gracias por su cariño y por darme la oportunidad de tener una mejor ocasión para ser un mejor profesional y una mejor persona, y hoy quiero dedicarles mi título con todo mi amor.

A toda mi familia, mis tíos Chepe, Alfredo, German y a Carmen, a mis primos Libardo, y German Eduardo.

Le doy gracia a la vida por regalármelos a ustedes y gracias a ustedes por darme la vida, hoy y siempre estarán en mi corazón aquellas personas que siempre tuvieron el deseo de verme triunfar, y junto a ustedes lo estoy logrando, gracias.

Erwin Hernando

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Víctor Manuel Tibatá Rodríguez, por toda su colaboración, amistad y conocimientos ofrecidos.

A Dr. (es) Maria Mercedes Zambrano, Marcela Salazar, Walter Ocampo Y Patricia del Portillo, que me extendieron la mano cuando necesite de ella.

A la Corporación CORPOGEN, por abrirme las puertas y brindarme todo el apoyo que necesitaba en el momento preciso.

A la Universidad Francisco de Paula Santander por brindarme una formación bajo principios éticos y profesionales.

A CENIACUA por su ayuda desinteresada.

A todos mis compañeros Alejandro, Carlos, Vicky, Betty, Juanito, Juan Rodrigo, Claudia, Paola, Sonia, Diana, luz Marina, German.

A la directora del plan de estudios de Ingeniería de Producción Biotecnológica Profesora Yaneth Muñoz por su constante ayuda.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
1.1 TITULO	20
1.2 PROBLEMA	20
1.2.1 Formulación del problema	20
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	21
1.3.1 Objetivo general	21
1.3.2 Objetivos específicos	21
1.4 JUSTIFICACIÓN	21
2. MARCO TEORICO	23
2.1 ANTECEDENTES	23
2.2 BASES TEORICAS	26
2.2.1 Clasificación taxonómica del camarón	26

2.2.2 Ciclo de vida del <i>Litopenaeus vannamei</i>	27
2.2.3 Proceso de crecimiento del camarón	28
2.2.4 Sistemas de Producción	29
2.2.5 Camaronicultura Mundial	32
2.2.6 La cadena de camarón de cultivo en Colombia	32
2.2.7 Enfermedades en Camarón	33
2.2.8 Síndrome del Virus del Taura	35
2.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	40
2.3.1 Extracción de RNA	40
2.3.2 RNAasas (Ribonucleasas)	40
2.3.3 Manejo del RNA	41
2.3.4 PCR (reacción en cadena de polimerasa)	42
2.3.5 Requerimientos para una PCR	42
2.3.6 RT-PCR	45
2.3.7 Electroforesis en gel	46

2.3.8 Secuenciación de genes	47
2.4 BASES CONCEPTUALES	47
2.5 BASES LEGALES	51
2.5.1 Código Sanitario para los Animales Acuáticos 2004	52
2.6 HIPÓTESIS	54
3. METODOLOGÍA	55
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	55
3.2 POBLACIÓN	55
3.3 MUESTRA	55
3.4 VARIABLES	55
3.5 INSTRUMENTOS	56
3.6 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	56
3.7 TÉCNICA DE ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS	56
3.8 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	56
3.9 DIAGRAMA DE FLUJO	57

4. MATERIALES Y METODOS	58
4.1 PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS	58
4.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL RNA DE LAS MUESTRAS	58
4.2.1 Extracción de RNA (por columnas kit eppendorf)	58
4.2.2 Extracción de RNA con isotiocianato de guanidío (protocolo Corporación Corpogen)	60
4.2.3 Visualización de la integridad del RNA extraído por electroforesis en gel de agarosa	61
4.3 RT-PCR	61
4.3.1 RT	62
4.4 PCR DIAGNÓSTICA DE TSV	63
4.4.1 Estandarización de la PCR diagnóstica	63
4.4.2 Identificación de las muestras positivas a TSV por PCR	64
4.5 PCR DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA DE CAPSIDE VP1	64
4.6 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR PARA VP1	66
4.6.1. Purificación de los productos de PCR VP1 con el kit Wizards PCR prep. DNA purification system (promega)	66

4.6.2 Condiciones de envío de la muestras a secuenciar	67
4.7 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	67
4.7.1 Análisis de los cromatogramas	67
4.7.2 Alineamientos de la secuencias nucleótidos de VP1 de TSV	68
4.7.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos	68
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	70
5.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL RNA DE LAS MUESTRAS	70
5.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	71
5.2.1 PCR diagnóstica	71
5.2.2 PCR para VP1	73
5.3 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR VP1	75
5.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	75
5.4.1 Análisis de los cromatogramas	75
5.4.2 Ensamblaje de las dos secuencias de VP1	75
5.5 TRADUCCIÓN DE SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS A AMINOÁCIDOS	76

5.6 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE MCCTSV 2 Y MCCTSV 3 EN EL SERVIDOR NCBI, CON LA HERRAMIENTA BLAST2SEQ	77
5.7 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE MCCTSV 2 Y MCCTSV 3 EN EL SERVIDOR NCBI, CON LA HERRAMIENTA BLASTN	77
5.8 ALINEAMIENTOS DE LA SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE VP1 DE TSV	78
5.9 DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS AISLAMIENTOS MCCTSV 2Y 3 CON LAS SECUENCIAS DE TSV REPORTADAS EN GENBANK	83
5.10 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS	84
6. CONCLUSIONES	86
7. RECOMENDACIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXOS	90