

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA
MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE RECEPTORES DEL VIRUS
DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA EN
ESPERMÁTIDAS DEL LANGOSTINO *Litopenaeus vannamei***

Br. YOEL MARINO ZEGARRA BERMUDEZ

TUMBES, PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:

BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA
MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE RECEPTORES DEL VIRUS
DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA EN
ESPERMÁTIDAS DEL LANGOSTINO *Litopenaeus vannamei***

Br. YOEL MARINO ZEGARRA BERMUDEZ

TUMBES, PERÚ

2019

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, YOEL MARINO ZEGARRA BERMUDEZ, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada, sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, también que, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita, la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo, con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y jurado calificador.

Br. Yoel Marino Zegarra Bermudez

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

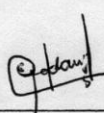
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los diecinueve días del mes de octubre del año dos mil dieciocho, a las 13:10 horas, en el auditorio de la Escuela de Posgrado, Ciudad Universitaria se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 082-2018/UNTUMBES-EPG-D; Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila - Presidente; Dr. Adán Alvarado Bernuy - Secretario; Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier – Vocal y con Resolución Directoral N° 0140-2018/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: Implementación del sistema CRISP/Cas9 para la mutagenesis dirigida de receptores del virus del síndrome de la mancha blanca en espermátidas del langostino *Litopenaeus vannamei*, presentada por el egresado del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular Br. Yoel Marino Zegarra Bermúdez, asesorado por el Ph. D. Emmerik Motte Darricau.

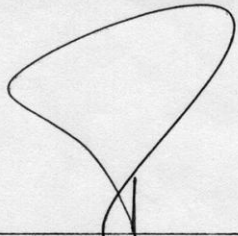
Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Sobresaliente, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 14:20 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

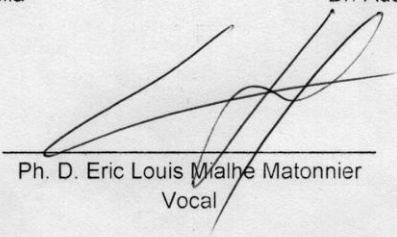
Tumbes, 19 de octubre de 2018.



Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila
Presidente



Dr. Adán Alvarado Bernuy
Secretario



Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier
Vocal

RESPONSABLES

Br. Yoel Zegarra Bermudez

EJECUTOR

Ph. D. Emmerik Motte Darricau

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila

PRESIDENTE

Dr. Adan Alvarado Bernuy

SECRETARIO

Ph. D. Eric Mialhe Matonnier

VOCAL

AFILIACIÓN INSTITUCIONAL DE LOS AUTORES

Implementación del sistema CRISPR/Cas9 para la mutagénesis dirigida de receptores del virus del síndrome de la mancha blanca en espermátidas del langostino *Litopenaeus vannamei*

Implementation of CRISPR/Cas9 system for white spot syndrome virus receptor-directed mutagenesis in *Litopenaeus vannamei* shrimp spermatids

Yoel Zegarra^{1,2*}, Damaris Ezquen^{1,2}, Juan Quimi², Jineika López², Max Salvatierra², Emmerik Motte², Eric Mialhe².

¹Programa de maestría de Ciencia Activa en Biotecnología Molecular. Universidad Nacional de Tumbes – Incabiotec SAC. Tumbes, Perú.

²Laboratorio de biotecnología molecular de la empresa de investigación Incabiotec SAC, Tumbes, Perú.

*Autor para correspondencia

Email Yoel Zegarra Bermudez: zegarrabj@gmail.com

Email Damaris Esquén Bayona: daysken@outlook.com

Email Max Salvatierra Alor: maxsa1002@gmail.com

Email Juan Quimi Mujica: juange8406@hotmail.com

Email Jineika Lopez Parra: jordanaparra1986@hotmail.com

Email Emmerik Motte Darricau: motte.emmerik@outlook.com

Email Eric Louis Mialhe Matonnier: ericmialhe@yahoo.fr

Información sobre los autores

YZB: Investigador principal del proyecto. DEB: Colaborador experimental en la etapa final del proyecto. JQM, JLP: Proveedores de las instalaciones y animales para la experimentación. Colaboradores en MSA, EMD, EMM: Asesores en el desarrollo del proyecto.

Los autores declaran que no presentan conflicto de intereses.

Proyecto de investigación fue financiado por la empresa Incabiotec SAC, el programa de maestría en Biotecnología Molecular, convenio N° 000190-2015-FONDECYT DE, la Universidad Nacional de Tumbes y el Circulo de investigación en biotecnología molecular para el desarrollo y la sostenibilidad de los sectores acuícolas del Perú, N° 132-2015-FONDECYT DE.

RESUMEN

La producción de langostinos *Litopenaeus vannamei* es usualmente afectado por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Su prevención a través del mejoramiento genético es la estrategia más conveniente pero demasiado laboriosa. Por ello, se ha propuesto implementar la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9 para inducir mutaciones sobre receptores virales como alternativa para seleccionar langostinos resistentes al WSSV. El gen receptor seleccionado LvRab7 fue parcialmente caracterizado. Se diseñó un sgRNA y se adquirió el plásmido correspondiente. Se estableció la base de un protocolo de transfección *in vivo* de espermátidas y de detección de mutaciones inducidas basado en la secuenciación profunda de amplicones del gen objetivo a partir de ADN de espermatozoides. El análisis de datos NGS no son concluyentes, pero revelaron indicios de modificación genética en algunas muestras. Además, se detectó mayor variabilidad en un segmento del gen LvRab7 en langostinos resistentes F0 de un programa de mejoramiento genético en comparación a langostinos no resistentes.

Palabras clave: edición genómica, CRISPR/Cas9, LvRab7, espermátidas, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

The production of shrimp *Litopenaeus vannamei* is usually affected by the white spot syndrome virus (WSSV). Its prevention through genetic improvement is the most convenient but too laborious strategy. Therefore, it has been proposed to implement the CRISPR / Cas9 genomic editing technology to induce mutations in viral receptors as an alternative to select shrimp resistant to WSSV. The selected receptor gene LvRab7 was partially characterized. A sgRNA was designed and the corresponding plasmid was acquired. The basis of an in vivo transfection protocol of spermatids and detection of induced mutations based on the deep sequencing of amplicons of the target gene from sperm DNA was established. The analysis of NGS data is not conclusive, but revealed genetic modification signs in some samples. In addition, greater variability was detected in a segment of the LvRab7 gene in F0 resistant shrimps from a breeding program compared to non-resistant shrimps.

Keywords: LvRab7, *Litopenaeus vannamei*, spermatids, CRISPR/cas9, genome editing