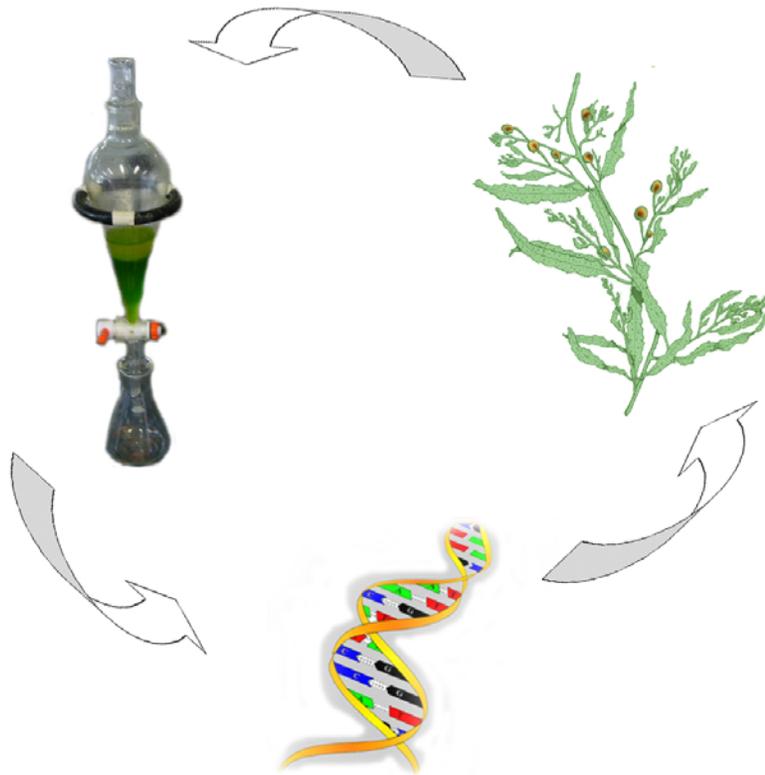




Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología



Manual de prácticas del
Laboratorio de Investigación Formativa II

(LIF II)

México DF febrero 2009

Autores:

Dra. Alejandrina Graciela Avila Ortiz
M. en C. Carlos Bautista Reyes
Q.F.B. María del Rocío Breceda Hernández
Biól. Isaura Escalante Vargas
Biól. Rocío Espitia Licea
Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz
Quím. María Estela Encarnación Jiménez
Biól. Carlos Martínez Montoya
Q.F.I. María del Carmen Niño de Rivera Oyarzabal
Dra. Elia Roldán Reyes
Biól. Aída Zapata Cruz
M.C. Raúl Zavala Chavero

Coordinadores:

Dra. Alejandrina Graciela Avila Ortiz
M. en C. Carlos Bautista Reyes
Q.F.B. María del Rocío Breceda Hernández

Índice

	Página
Prólogo	iv
Unidad 1 Química Orgánica	
Introducción	2
Experimentos 1 y 2	
Extracción y separación de compuestos orgánicos de un producto natural	3
Experimento 3	
Aislamiento e identificación de aceites esenciales por destilación por arrastre con vapor de agua	6
Unidad 2 Genética	
Introducción	11
Práctica 1	
Leyes de Mendel y herencia ligada al sexo	12
Práctica 2	
Aislamiento, purificación e identificación de ADN	25
Práctica 3	
Cromosomas gigantes	29
Práctica 4	
Cromatina sexual	36
Práctica 5	
Cultivo de linfocitos	42
Unidad 3 Bacterias, Algas y Hongos	
Introducción	55
Práctica 6 y 7	
Preparación y manejo de medios de cultivo bacterianos	
Aislamiento y observación de bacterias	56
Práctica 8	
Observación de algas procariotas	67
Práctica 9	
Observación de algas eucariotas	72
Práctica 10	
Observación de hongos falsos y verdaderos	86
Práctica 11	
Observación pruebas químicas y de cristalización de líquenes	96
Unidad 4 Proyecto de investigación	101

Prólogo

Laboratorio de Investigación Formativa II

La filosofía y la misión de la FES-Zaragoza, establece que los egresados deberán tener una actitud crítica y creativa; además desarrollar un espíritu científico y humanista; en este contexto, el Laboratorio de Investigación Formativa es el espacio académico donde cristalizan dichos ideales. Para ello, se requiere que el laboratorio abandone su papel tradicional en el que funcionaba como un acompañante o subordinado de la teoría y en su lugar darle la relevancia que merece, como el espacio didáctico en donde el alumno desarrolle y construya su propio proceso de aprendizaje a través de actividades que lo orienten tanto en la búsqueda de información, como en el diseño de su trabajo experimental.

En el Laboratorio de Investigación Formativa II se privilegia el aprendizaje grupal con el fin de promover la formación completa del alumno, esto es, no sólo aprender leyes, teorías y principios, entre otras cuestiones. Sino desarrollar por un lado un espíritu de colaboración y por otro, destrezas, habilidades y actitudes. Este laboratorio tiene como núcleo temático la investigación experimental en biología básica y como objetivo, introducir al alumno en el conocimiento de la biología básica mediante la integración y aplicación de conceptos y métodos para realizar prácticas, experimentos y proyectos de investigación con la finalidad de plantear y resolver problemas relacionados con química orgánica, genética, bacterias, algas, hongos y líquenes.

Las actividades académicas que se realizan a lo largo del semestre incluyen una serie de prácticas y experimentos, así como la elaboración de un proyecto de docencia-investigación durante las últimas cuatro semanas, de esta manera se contribuye a lograr el cumplimiento del perfil profesional que caracteriza al egresado de la carrera de biología de la FES Zaragoza, el cual señala:

“El biólogo es el profesional que posee, genera, integra, aplica y comunica conocimientos para la comprensión y explicación de la estructura y funcionamiento de los sistemas biológicos con base en la teoría evolutiva. Su preparación académica se dirige a la investigación, producción, conservación o restauración de estos sistemas. Su formación teórico-práctica le permite tener una amplia visión para la toma de decisiones respecto al aprovechamiento y manejo sustentable de los recursos naturales.

Asimismo, tiene una sólida información científica que le permite incorporarse a la investigación en cualquier nivel de la organización biológica, cuenta con una orientación terminal sustentada en experiencia práctica de laboratorio y campo; está capacitado para integrarse al trabajo multi e interdisciplinario, incorpora la componente socioeconómica y humanística al trabajo profesional y posee una actitud ética de valoración a su profesión y a la naturaleza”.

Contamos con que realices el esfuerzo que te corresponde, para lograr las metas de aprendizaje establecidas para el laboratorio, que participes de manera responsable en las actividades del laboratorio y cumplas con las tareas de investigación, realización y entrega de informes; y prepares oportunamente tus exámenes, con el fin de asegurar la calidad de tu formación profesional.

Normas de operación

El trabajo en el laboratorio se desarrolla con una organización basada en la constitución de equipos de trabajo, cuyo número, así como el número de alumnos integrantes de cada uno, lo determinan los profesores asignados al grupo, es deseable que el número de alumnos por equipo no supere a los seis integrantes. De igual manera, la necesidad de dividir o no al grupo para la formar secciones, lo determinan los profesores del grupo. Por las características de nuestros laboratorios y equipamiento, si un grupo cuenta con más de 30 alumnos inscritos, los profesores considerarán la viabilidad de trabajar en dos secciones, siempre y cuando cada una de ellas puede contar con su propio laboratorio.

Grupo de 30 alumnos o menos

4 semanas Química Orgánica	4 semanas Genética	4 semanas Bacterias, Algas y Hongos.	4 semanas Proyecto
----------------------------	--------------------	--------------------------------------	--------------------

Si los Profesores deciden que por el número de alumnos inscritos en el grupo se debe trabajar en secciones: A y B, y existen los espacios y condiciones adecuadas para ello, la distribución sugerida es:

A	4 semanas Química Orgánica en el Lab. 1	4 semanas Bacterias, Algas y Hongos en el Lab. 1	4 semanas Genética en el Lab. 2	4 semanas Proyecto en el Lab. 2
B	4 semanas Bacterias, Algas y Hongos en el Lab. 2	4 semanas Genética en el Lab. 2	4 semanas Química Orgánica en el Lab. 1	4 semanas Proyecto en el Lab. 1

Criterios de evaluación del LIF II

Cubrir al menos el 80% de asistencia en todas y cada una de las unidades.

El alumno deberá obtener una calificación aprobatoria (mínimo de seis) en cada una de las cuatro unidades de que consta el laboratorio, su calificación final se obtendrá mediante el promedio aritmético de las mismas.

Si, alguna o algunas de las unidades 1, 2 ó 3, no se aprueban, será necesario presentarlas en el examen final ordinario A, en caso de no aprobarlo presentará el ordinario B, si en esta oportunidad, aún quedan una o más unidades reprobadas **no acreditará** el laboratorio y por tanto será necesario recurrarlo (si le asiste ese derecho), o bien presentará el examen extraordinario.

Para el caso de la unidad 4, si el proyecto no obtiene una calificación aprobatoria al término del periodo de clases, las observaciones que el profesor haga, serán atendidas por el equipo y lo presentarán en la fecha asignada al ordinario A, de ser necesario atender aún algunas observaciones la última oportunidad será presentarlo en la fecha asignada al ordinario B. Si en esta ocasión no se aprueba no acredita el LIF II.

El examen extraordinario se diseña con dos componentes una parte teórica que si es aprobada se presenta entonces la parte práctica.

Por las características particulares de cada Unidad, en sus respectivos apartados, se indica de manera puntual cuales son los criterios, aspectos y ponderaciones aplicables de manera particular.

Unidad 1

Química orgánica

INTRODUCCIÓN

La Química Orgánica tiene actualmente un papel muy importante para el Biólogo, puesto que su actividad la desarrolla tanto en la industria, la investigación, la docencia y sector público, empleando una serie de sustancias de origen orgánico.

El estudio de la Química Orgánica debe ser abordado desde el punto de vista teórico hasta la actividad práctica.

En este laboratorio se trabajará con productos orgánicos naturales y sintéticos, dando su enfoque preferentemente hacia la práctica, en donde se aplicarán aquellos conceptos teóricos que se revisan en la clase teórica de Química Orgánica.

Durante el desarrollo de la actividad práctica el estudiante podrá conocer comprender, analizar y aplicar toda aquella información relacionada con el uso y manejo de sustancias orgánicas, las técnicas más comunes y aparatos que se emplean para aislar, purificar, identificar y sintetizar compuestos orgánicos presentes en productos naturales.

El laboratorio pretende desarrollar en el estudiante un conocimiento activo, en el que se le proporcione un nexo entre el trabajo de laboratorio necesariamente formal que se efectúa en el curso y el trabajo de laboratorio de investigación.

Los componentes de la unidad son: experimentos uno y dos, extracción y separación de compuestos orgánicos de un producto natural, y en el experimento tres, aislamiento e identificación de aceites esenciales por destilación por arrastre con vapor de agua

EXPERIMENTOS 1 Y 2

EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DE UN PRODUCTO NATURAL

INTRODUCCIÓN

El estudio de los compuestos orgánicos presentes en productos naturales ha sido motivo de estudio de profesionales de diferentes áreas y para ello se aplican métodos diversos como las técnicas de extracción, las cuales son sólido-líquido y líquido-líquido.

La extracción sólido-líquido. Es el proceso en el cual, mediante la acción de un disolvente o agente extractor se separará un principio activo contenido en un material sólido. Para ello se usará un disolvente que sea lo más selectivo posible y permita la separación. Por su parte, la extracción líquido-líquido es el proceso en el cual se desarrolla la transferencia de una sustancia X desde una fase líquida (A) a otra fase líquida (B) inmiscibles entre si, el proceso marca un reparto y está dado por la ecuación de Nerst.

La cromatografía. Es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla de compuestos, por distribución diferencial entre dos fases, una de las cuales es móvil y la otra estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Si la fase estacionaria es un líquido esta deberá estar soportada en un sólido inerte.

Dependiendo de la naturaleza de las fases involucradas la cromatografía puede clasificarse en varios tipos: sólido-líquido, líquido-líquido, sólido-gas y líquido-gas.

La cromatografía en capa fina es uno de los métodos analíticos más sencillos ya que se utilizan cantidades mínimas, requiere poco tiempo y es confiable para la separación e identificación de compuestos.

Los resultados obtenidos de la cromatografía en capa fina son muy valiosos, pues ayudan a seleccionar el adsorbente y eluyentes adecuados que se pueden emplear en la separación cromatográfica en columna.

En general debido a la alta sensibilidad de estas técnicas se aprecia que son de gran utilidad en Ciencias Químicas, Biológicas y Médicas.

OBJETIVO GENERAL:

Extraer y separar diversos compuestos contenidos en un producto natural mediante métodos y técnicas convencionales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. El alumno extraerá el compuesto o compuestos de un producto natural por técnicas de extracción sólido-líquido y líquido-líquido.
2. El alumno separará e identificará mediante las técnicas de cromatografía en capa fina y columna los compuestos aislados del producto natural.

ACTIVIDADES

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos:

1. Propiedades físicas, químicas y tóxicas de las sustancias empleadas en el experimento.
2. Método de extracción sólido-líquido, líquido-líquido. Fundamente teórico.

3. Material y equipo empleados para la extracción.
4. Cromatografía en capa fina, en columna, fundamento teórico
5. Conceptos de polaridad, eluyente, adsorbente, revelador.
6. Definición de los términos Rf y Rx. Usos y aplicaciones

DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

El alumno desarrollará la parte experimental considerando lo siguiente:

Extraer el (los) compuesto (s) del producto natural asignado por el profesor, concentrar el extracto y realizar la cromatografía en capa fina para determinar el eluyente ideal y posteriormente efectuar la separación por cromatografía en columna.

Desarrollará el plan de trabajo que incluya: hipótesis, material y reactivos, variables, procedimiento (diagrama de flujo) y antecedentes académicos.



Extracción por maceración



Filtración a vacío



Extracción líquido – líquido



Cromatografía en columna



Extracción con equipo Soxhlet

Fotografías proporcionadas por la Q.F.B. María del Rocío Breceda Hernández

RESULTADOS

Deberá incluir en su informe:

1. Características del extracto obtenido.
2. Registro de resultados de la elusión en las placas cromatográficas, especificando eluyente y adsorbente utilizado.
3. Determinar los valores de Rf y Rx en su caso.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué propiedades de los compuestos permiten su aislamiento del producto natural y su posterior separación en cromatografía en capa fina y columna?
2. ¿Cuáles sustancias se utilizan como adsorbentes en cromatografía en capa fina y en columna? (clasifíquelas en función de su actividad)
3. ¿Cuáles eluyentes son utilizados comúnmente en cromatografía? (clasifíquelos en orden creciente de polaridad).
4. ¿Cómo se clasifican los reveladores en cromatografía?
5. ¿Qué factores permiten la reproducibilidad del Rf?

BIBLIOGRAFÍA

1. Ault A. 1997. Techniques and Experiments for Organic Chemistry. 6th ed. Prospect Heights, Illinois: Waveland.
2. Brewster R.Q., *et al.* 1978. Curso Práctico de Química Orgánica Experimental. España.
3. Browning D.R. 1971. Cromatografía. Toray-Masson, Barcelona.
4. Domínguez X. 1987. Experimentos de Química Orgánica 4^a ed. Editorial CECSA.
5. Furniss B. S. *et al.* 1989. Vogel's. Textbook of Practical Organic Chemistry. 5th.ed. New York.
6. Keese R., Muller R. K. Toube T. P. 1990. Métodos de Laboratorio de Química Orgánica. Ed. Limusa, México.
7. Landgrebe J.A. 1992. Theory and Practice in the Organic laboratory with microscale and Standard Scale Experiments. 4th.ed. Brooks/Cole. U.S.A.
8. Pavia D.L., Lampman G.S. 1995. Introduction to Organic Laboratory techniques. A microscale Approach, Saunders College Publishing 3rd. ed U.S.A.

EXPERIMENTO 3

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales o esencias vegetales son productos contenidos en las plantas, formados por la acción del agua sobre las sustancias que contienen. Los aceites esenciales se encuentran normalmente en las glándulas o los espacios intercelulares de los tejidos vegetales que pueden estar diseminados por toda la planta o bien concentrados en las flores o las semillas.

Los compuestos más comunes derivan biogenéticamente del ácido mevalónico, se les cataloga como monoterpenoides y sesquiterpenoides.

Los aceites esenciales son por lo general menos densos que el agua, su densidad varía de 0.759 a 1.096 g/ml; el olor es fuerte, penetrante, agradable y el sabor es acre y algunas veces cáustico; muchas son las plantas que los producen ; entre las más notables conviene mencionar las de las coníferas, rutáceas y crucíferas.

La destilación en corriente de vapor o arrastre con vapor de agua es una técnica ingeniosa para la separación de sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otras no volátiles mezcladas con ellas.

El arrastre en corriente de vapor hace posible la purificación adecuada de muchas sustancias de punto de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura. Esta técnica es particularmente útil cuando la sustancia en cuestión hierve por encima de 100° C a la presión atmosférica o se descompone en su punto de ebullición o por debajo de este.

Algunas sustancias pueden ser arrastradas en corriente de vapor; esto se debe principalmente a que algunos compuestos no son solubles entre sí con el agua, en este caso la presión del sistema es la suma de las presiones parciales de los componentes.

OBJETIVO GENERAL:

Aislar el aceite esencial de un producto natural asignado por el profesor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. El alumno aplicará la destilación por arrastre de vapor en la separación de un aceite esencial.
2. El alumno realizará una extracción líquido-líquido discontinua para la recuperación del producto a partir del codestilado.
3. El alumno realizará las pruebas físicas y químicas para la identificación del aceite esencial y sus derivados.

ACTIVIDADES

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos:

1. Propiedades físicas, químicas y tóxicas de las sustancias empleadas en el experimento.
2. Fundamento teórico de la destilación por arrastre con vapor
3. Usos de la destilación por arrastre con vapor
4. Material y equipo empleados para la destilación por arrastre con vapor
5. Pruebas de identificación físicas y químicas
6. Características y preparación del derivado

DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

El alumno desarrollará la parte experimental considerando lo siguiente:

Aislará el aceite esencial del producto natural asignado por el profesor y realizará su recuperación mediante la técnica de extracción líquido-líquido.

Desarrollará las pruebas de identificación específicas al producto aislado (preparación de un derivado).

Desarrollará el plan de trabajo que incluya: hipótesis, material y reactivos, variables, procedimiento (diagrama de flujo) y antecedentes académicos.



Equipo de destilación por arrastre con vapor de agua



Rotavapor



Extracción líquido – líquido



Cromatografía en capa fina

Fotografías proporcionadas por la Q.F.B. María del Rocío Breceda Hernández

RESULTADOS

Deberá incluir en su informe:

1. Características del aceite esencial obtenido.
2. Registro de resultados de las pruebas de identificación realizadas (químicas y físicas)

CUESTIONARIO

1. ¿Qué influencia tienen los puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares en una destilación por arrastre con vapor de agua?
2. ¿Qué ventajas presenta la destilación por arrastre con vapor sobre la destilación a presión reducida?
3. ¿A que se debe que el vapor que se condensa durante la destilación por arrastre con vapor es generalmente turbio?
4. ¿Qué características deben presentar las sustancias para ser aisladas con vapor de agua?
5. ¿A qué le llama derivado y cuál es su utilidad práctica?
6. ¿Qué diferencias existen entre un codestilado y un destilado puro?

BIBLIOGRAFÍA

1. Ault A. 1997. Techniques and Experiments for Organic Chemistry. 6th ed. Prospect Heights, Illinois, Waveland, U.S.A.
2. Brewster R.Q., 1978. *et al.* Curso Práctico de Química Orgánica Experimental. España.
3. Browning D.R. 1971. Cromatografía. Toray-Masson, Barcelona, España.
4. Domínguez X. 1987. Experimentos de Química Orgánica 4^a ed. Editorial CECSA. México.
5. Furniss B. S. *et al.* 1989. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. 5th.ed. New York, U.S.A.
6. Keese R., Muller R. K., Toubé T. P. 1990.b Métodos de Laboratorio de Química Orgánica. Ed. Limusa, México.
7. Landgrebe J.A. 1992. Theory and Practice in the Organic laboratory with microscale and Standard Scale Experiments. 4th. Ed. Brooks/Cole, U.S.A.
8. Pavia D.L., Lampman G.S. 1995. Introduction to Organic Laboratory techniques. A microscale Approach, Saunders College Publishing 3rd ed. Saunders College Publishing U.S.A.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA UNIDAD.

1. Lista de cotejo	50 %
-Asistencia	
-Presentación del plan de trabajo	
-Trabajo experimental	
2. Examen	30 %
-Un examen parcial por cada experimento	
3. Informe	20 %
	<hr/>
total	100 %

NOTA: todos los puntos deberán ser aprobados

ASPECTOS A CONSIDERAR EN EL INFORME

1. Portada
2. Resumen
3. Introducción
4. Parte experimental
5. Resultados
6. Análisis y discusión de los resultados obtenidos
7. Conclusiones
8. Bibliografía

Unidad 2

Genética

INTRODUCCIÓN

Bienvenidos al estudio de la genética, campo de la Biología que resulta sumamente interesante y fascinante. La información genética dirige el funcionamiento de la célula, determina la apariencia externa de un organismo y sirve de unión entre generaciones en todas las especies. El conocimiento de cómo se dan estos procesos es importante para el entendimiento de la vida y de la biosfera, es por tanto imprescindible en la formación del Biólogo.

Los temas que estudia la genética tienen una relación directa con la biología molecular, la biología celular, la fisiología, la evolución, la ecología, la sistemática y la etología. Y determina un mejor y completo entendimiento de estas.

El crecimiento y aplicación del conocimiento en este campo es muy dinámico, pues cada año se realiza un gran número de nuevos descubrimientos. Otra razón por la que el estudio de la genética es tan atrayente. A lo largo de las últimas cinco décadas, no ha pasado un lustro sin que nuevos descubrimientos en genética, obligue a revisar nuestros conceptos o a ampliar nuestro conocimiento de forma importante. Cada avance se convierte en piedra angular en la que se basa el progreso posterior. Es por lo tanto, estimulante encontrarse inmerso en estos progresos ya sea como estudiante, como docente de la genética y/o como investigador.

El programa que comprende la unidad 2 Genética, del Laboratorio de Investigación Formativa II (LIF-II), pretende dar un panorama general de los procesos genéticos básicos, que van desde la genética Mendeliana hasta la observación de las estructuras que portan el material genético, los cromosomas. Está conformado por las prácticas, leyes de Mendel y herencia ligada al sexo, aislamiento, purificación e identificación de ADN, cromosomas gigantes, cromatina sexual y cultivo de linfocitos todas ellas con elementos suficientes y adecuados, donde los docentes han vertido un cúmulo de experiencia adquirida a lo largo de los años, por lo que es de esperar un adecuado desarrollo de las mismas logrando el desarrollo de habilidades y adquisición de conocimientos por parte de los estudiantes que cursaran el segundo semestre de la carrera de Biólogo.

PRÁCTICA No. 1

LEYES DE MENDEL Y HERENCIA LIGADA AL SEXO

INTRODUCCION

Leyes de Mendel



La genética actual parte de las investigaciones de Mendel. El estudio de los patrones que gobiernan la herencia de los caracteres generación tras generación se conoce como genética de la transmisión o herencia mendeliana, la cual se debe a Juan Gregorio Mendel quien descubrió en 1865, las reglas que gobiernan la transmisión de los caracteres hereditarios, realizó sus experimentos sobre la hibridación en plantas de chícharo (*Pisum sativum*) en el huerto aledaño a su monasterio.

Figura 1. Gregorio Mendel de history.nih.gov/popup_html/01_mendel.htm

Mendel estudió siete caracteres del chícharo: la forma de la semilla, el color de la semilla, el color de la flor, la forma y color de la vaina, la posición de las flores y de las vainas, y la longitud del tallo. El trabajo de Mendel se caracterizó por: a) elegir un material de experimentación adecuado, b) simplificar la tarea, seleccionando caracteres con distribuciones alternativas claras examinándolas uno por uno, solo después, procediendo a combinaciones más complicadas, c) en las evaluaciones de sus resultados no quedó satisfecho con afirmaciones cualitativas, por lo que las cuantificó y esto le permitió establecer las leyes estadísticas que rigen estos fenómenos, d) el encontrar una interpretación biológica correcta; las células germinales contienen los factores hereditarios.

A pesar de que en esa época no se sabía nada acerca del ADN ni de los cromosomas. Mendel observó que cada progenitor contribuye con un número de elementos individuales a la herencia del carácter. Estos elementos llamados por Mendel “factores” son, en términos modernos, los genes.

La primera ley de Mendel se puede enunciar como sigue: un gameto recibe uno de los dos alelos que posee un organismo; la fecundación restablece el número diploide. Mendel realizó sus primeros experimentos con base en la herencia de un solo carácter lo que se denomina cruce monohíbrido.

La segunda ley de Mendel o ley de la distribución independiente se puede enunciar como sigue: Los miembros de pares de alelos diferentes (genes) se distribuyen independientemente uno del otro durante la formación de los gametos.

Herencia Ligada al Sexo

La primera prueba completa de naturaleza experimental de la herencia ligada al sexo se obtuvo en 1910 por T. H. Morgan de un mutante de ojos blancos de *Drosophila*. Un gen había experimentado un cambio que resultó en una alteración fenotípica. Este cambio se expresó como

ojos blancos en lugar de los ojos rojos normales. El macho de ojos blancos que se descubrió primero se cruzo con una hembra de ojos rojos. Todas las moscas de la generación F₁ tenían ojos rojos, pero la F₂ incluyo tanto moscas de ojos rojos como moscas de ojos blancos en una proporción de alrededor de tres rojos a uno blanco. Sin embargo, todas las moscas con ojos blancos de la generación F₂ fueron machos. Alrededor de la mitad de los machos de la F₂ tenían ojos blancos y la otra mitad ojos rojos, pero todas las hembras tenían ojos rojos. En este experimento, el alelo recesivo se expresa solo en machos. Morgan llego a una explicación asociando a este gen con en cromosoma X.

Por lo tanto en la herencia ligada al sexo la característica se hereda del abuelo al nieto a través de la hija que funciona como portadora; las cruza reciprocas producen resultados en la progenie diferentes; la expresión fenotipica de los genes ligados al sexo es mas frecuente en los machos que en la hembras, un gen ligado al cromosoma X nunca se transmite directamente del padre al hijo. La explicación a estos resultados se obtuvo posteriormente con la comprensión de los mecanismos de determinación del sexo.

***Drosophila melanogaster* COMO MODELO BIOLÓGICO.**



Una de las primeras preguntas que debiera surgir en la mente de los alumnos de Biología es el por qué de la elección de esta mosca para el desarrollo de una serie de actividades durante el transcurso del semestre. La respuesta es que *Drosophila melanogaster* ofrece una serie de características propicias para cursos de introducción a la Genética.

Figura 2. Cepas de *Drosophila melanogaster*, de <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/Drosophila/Drosophila.htm>

Drosophila es un género cosmopolita del cual existen alrededor de 1500 spp la más utilizada en los laboratorios de investigación es la *Drosophila melanogaster* esta mosca es un insecto homometabolo su ciclo vital consta de 4 estadios: huevo, larva de primero, segundo y de tercer estadio, pupa y el imago o adulto

Ventajas de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico.

- Eucarionte pluricelular
- Cuatro pares de cromosomas totalmente mapeados
- Genoma totalmente secuenciado
- Cientos de mutantes con defectos en miles de genes disponibles
- Es abundante en todo el mundo
- Su cultivo en el laboratorio es fácil y económico.
- Es relativamente resistente al manejo.
- Engendra un gran número de descendientes.
- Tiene un corto tiempo de generación (a 10 °C es de 57 días, a 20 °C de 15 días y a 25 °C de 10 días).
- Su número cromosómico reducido es conveniente para su estudio.

- Algunas de sus células en estadio de larva son muy grandes lo que facilita el estudio de sus cromosomas.

Se cuenta con 50 años de experiencia en trabajo sobre este organismo, a través de los cuales se ha acumulado bastante literatura a la cual podemos remitirnos para solucionar dudas y tener bases sólidas para estudios posteriores.

En este organismo las mutaciones son comunes y fácilmente inducibles.

Pueden observarse y manejarse muchos caracteres externos.

Su embriología y su ciclo de vida han sido perfectamente estudiados.

SISTEMÁTICA

Se ha designado a *Drosophila melanogaster* con varios nombres comunes como son: mosca de la fruta y mosca del vinagre.

Phylum: Artropoda
 Clase: Hexapoda
 Orden: Diptera
 Familia: Drosophilidae
 Género: *Drosophila*
 Especie: *melanogaster*



Figura 3. Ciclo de vida. Tomada de www.educa.madrid.org

CICLO DE VIDA

Tiene cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto. La duración de estos estadios varía con algunos factores, de los cuales el más importante es la temperatura. A 20°C de huevo a larva transcurren 8 días y el estado pupal dura 4 a 4.5 días.

Huevo: Las moscas hembras adultas son capaces de poner huevos 2 días después de haber alcanzado el estado adulto y seguir haciéndolo continuamente hasta su muerte. El huevo mide aproximadamente 0.5 mm de longitud y sus estructuras visibles son el Corión y dos filamentos o pliegues anterodorsales, debajo de los cuales se ve la membrana vitelina.

Larva: Durante este estadio se realizan dos mudas e incrementan su tamaño de 4 a 4.5 mm lo cual es debido a un aumento en tamaño de las células y no a un aumento en el número de éstas.

Pupa: Durante este estadio se desarrollan los sistemas de la mosca adulta.

Adulto: Las moscas recién emergidas del estado pupal son frágiles y de color claro, con las alas no totalmente terminadas; sin embargo pocas horas después oscurecen y toman las características del estado adulto. (Véase figura 4). Viven aproximadamente 1 mes y mueren.

DIFERENCIACIÓN DEL SEXO



Figura 4. Macho y hembra adultos. Tomada de www.sepiensa.org.mx

Tamaño: Las hembras son generalmente más grandes que los machos.

Forma: En el macho el extremo caudal es redondeado, mientras que en la hembra es alargado y poco protuyente.

Color: La pigmentación oscura es más extensa en el extremo caudal del macho y los anillos rodean el abdomen, mientras que en la hembra solo son dorsales

El abdomen de la hembra tiene 7 segmentos, mientras que el del macho tiene solo 5 segmentos.

Los machos tienen un peine sexual que consiste en una fila de aproximadamente 10 cerdas gruesas en la superficie distal del segmento tarsal basal de la pata anterior.

Si se requieren hembras vírgenes para una cruce, éstas pueden colectarse 10 a 12 horas después de que terminó la pupación, ya que en este tiempo las hembras no permiten la cruce.

PROCEDIMIENTO

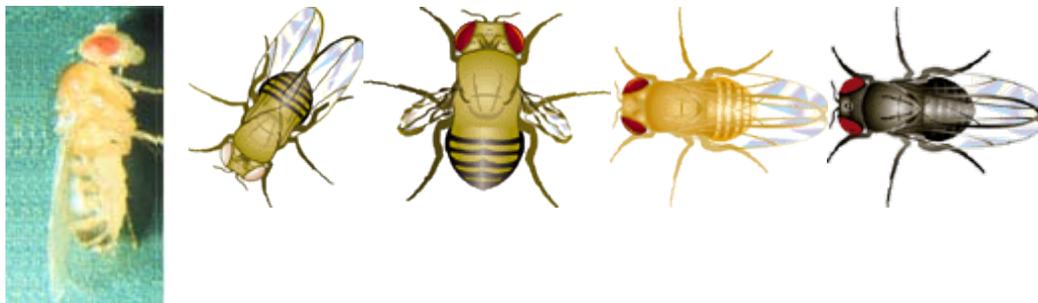
Agregar en un recipiente de peltre o aluminio 600 ml de agua de la llave, póngalos a calentar en una parrilla eléctrica, los 400 ml restantes ocúpelos para disolver en frío los componentes sólidos del medio. Adicionar el Agar-agar lentamente y agitando para evitar la formación de grumos; mantenga en agitación hasta llegar casi a ebullición (Véase nota 1); añadir la miel mezclando hasta su disolución completa; posteriormente agregar la levadura y la harina ya disueltas en agua. Hervir de 10 a 20 minutos (**tener cuidado de agitar durante toda la ebullición**), después dejar enfriar un poco agregue la solución de tegosept y agitar, inmediatamente después, vaciar el medio de cultivo a los frascos previamente lavados con agua y jabón, secarlos perfectamente y humedecer sus paredes con solución de tegosept, vierta en ellos aproximadamente 2 cm de altura de medio en cada frasco, tapar con hule espuma.

MANEJO DE LAS MOSCAS

Para el examen y selección de las moscas el primer paso es anestésicarlas, esto se hace poniendo unas gotas de éter en el algodón del eterizador y uniendo la boca de éste a la boca de la botella de cultivo. Debe hacerse pasar a las moscas de un frasco a otro por movimiento o por fototactismo; se coloca rápidamente la tapa del eterizador y se mantiene una forma vertical con la tapa hacia arriba por 30 s. Después de que haya cesado el movimiento de las moscas son transferidas a la placa del estereoscopio para analizarlas (Véase nota 2). En caso de que empiecen a reaccionar antes de haber terminado el análisis se usa el eterizador en el que se han puesto unas gotas de éter y se pone sobre el conjunto de moscas por unos segundos. Se debe tener cuidado para evitar una sobranestesia que mataría a las moscas.

COMPARACIÓN ENTRE CEPAS MUTANTES Y EL TIPO SILVESTRE DE *D. melanogaster*.

Para el desarrollo de esta práctica se utilizarán las siguientes cepas de *Drosophila melanogaster*:



. Silvestre,

White,

Vestigial,

Yellow

y

Ebony.

Figura 5. Cepas de *Drosophila melanogaster* tomada de <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/Drosophila/Drosophila.htm>

Pasar moscas de cada una de las cepas a frascos vacíos diferentes, **evitando que las moscas escapen** tapándolos inmediatamente.

Anestesiarse a las moscas empleando algodón con unas gotas de éter, una vez que ha cesado el movimiento de las moscas esperar 20 s. y destapar el frasco; pasar las moscas ya anestesiadas a una Caja Petri y colocar éstas en la base de un Estereoscopio.

Proceder a comparar el fenotipo de las moscas mutantes con el de las silvestres manipulándolas con mucho cuidado y con la ayuda de un pincel delgado, también realizar la comparación de los sexos de las moscas utilizando para esto los esquemas adjuntos.

En caso de que las moscas se recuperen de la anestesia durante la observación proceder a reanestesiarse utilizando un algodón que contenga unas gotas de éter, **máximo por 3 ocasiones** para no sobreenestesiarse.

Al terminar la observación regresar las moscas al frasco original.

NOTAS

1. La disolución completa del Agar-agar se logra en el momento en que la mezcla toma un aspecto transparente.
2. Para transferir las moscas anestesiadas, ayúdense con el pincel de cerdas finas.

MATERIAL Y EQUIPO

- Probetas de 50 y 1000 ml
- Vidrios de reloj
- Pipetas de 5 ml
- Recipiente de 1500 ml de peltre o aluminio
- Eterizador
- Frascos de 250 ml de boca ancha
- Cajas petri
- Balanza granataria
- Estereoscopio
- Agujas de disección
- Pincel de cerdas finas
- Tapones de hule espuma
- Parrilla de calentamiento

MATERIAL BIOLÓGICO

- Moscas *Drosophila melanogaster* tipo silvestre en sus diferentes estadios de desarrollo.
- Cepas mutante de *Drosophila melanogaster* en sus diferentes estadios de desarrollo: White, Vestigial, Yellow, Ebony. Star, Brown y Black

REACTIVOS

- Éter
- Medio de cultivo

PROCEDIMIENTO

Para la primera Ley de Mendel

Los alumnos guiados por el maestro deberán:

En un vial con medio de cultivo sembrar 10 hembras silvestres vírgenes y 10 machos Ebony rotular con la simbología adecuada la cruz e incluir los datos de la fecha de siembra y el nombre del alumno con un marcador indeleble.

En un segundo vial realizar la cruz inversa 10 machos silvestres y 10 hembras Ebony. Rotular con la simbología adecuada la cruz e incluir la fecha de siembra y el nombre del alumno con marcador indeleble.

Mantener los cultivos a temperatura constante de 25°C anotar cuando se observen los huevos sobre el medio, las larvas, las pupas y los adultos. Cuando se tengan larvas, sacar y sacrificar a los progenitores.

Cuando emerjan todas las moscas de los cultivos (F_1) observarlas al microscopio estereoscópico contar y anotar el número de hembras y machos y el fenotipo que presenten.

Sembrar 10 parejas de la generación obtenida en frascos con medio de cultivo nuevo. Cuando se obtengan los adultos de la segunda generación (F_2) observarlas, contar y anotar el número de hembras y machos de cada fenotipo.

Elaborar el reporte de la práctica.

PROCEDIMIENTO

Para la segunda Ley de Mendel

En un frasco con medio de cultivo sembrar 10 hembras silvestres vírgenes ébano con alas vestigiales (e vg) y 10 machos silvestres. Rotular con la simbología adecuada la cruz e incluir la fecha de siembra y el nombre del alumno con marcador indeleble.

En un segundo frasco realiza la cruz inversa sembrar 10 machos ébano vestigiales y 10 hembras silvestres. Rotular con la simbología adecuada la cruz e incluir los datos de la fecha de siembra y el nombre del alumno con marcador indeleble.

Mantener los cultivos a temperatura constante de 25°C anotar cuando se observen los huevos sobre el medio, las larvas, las pupas y los adultos. Cuando se tengan larvas, sacar y sacrificar a los progenitores.

Cuando emerjan todas las moscas de los cultivos (F_1) observarlas al microscopio estereoscópico contar y anotar el número de hembras y machos y el fenotipo que presenten.

Sembrar 10 parejas de la generación obtenida en frascos con medio de cultivo nuevo. Cuando se obtengan los adultos de la segunda generación (F_2) observarlas, contar y anotar el número de hembras y machos de cada fenotipo.

Elaborar el reporte de la práctica.

PROCEDIMIENTO

Para herencia ligada al sexo

Realizar una cruz utilizando 10 hembras vírgenes normales y 10 machos con ojos blancos.

Al quinto día eliminar a los progenitores y esperar a que emerja la F_1 .

Observar los fenotipos de las hembras y de los machos de la F_1 , y anotar sus observaciones en las hojas de registro.

Colocar en frasco con medio de cultivo nuevo toda la F_1

Al quinto día eliminar a los progenitores y esperar que emerja la F₂. Observar con ayuda del microscopio de disección, los fenotipos de las hembras y de los machos.

Anotar las observaciones en la hoja de registro

REPORTE DE RESULTADOS

Anote las diferencias fenotípicas de las cepas mutantes y tipo silvestre observadas.

Anote las características fenotípicas que permiten diferenciar el sexo de las moscas.

Dibuje esquemas de las moscas observadas, haciendo notar las características fenotípicas que permiten diferenciar cepas mutantes y el sexo de las mismas.

Reporte el resultado de las cruzas de la siguiente forma:

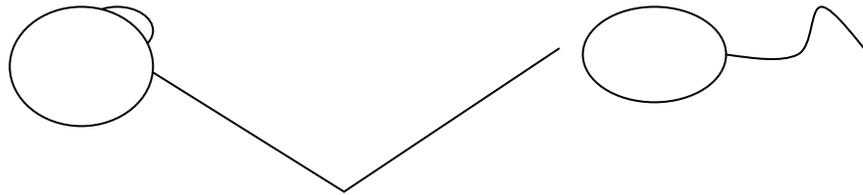
Actividad	Fecha
Cruza progenitora	
Retirar a los progenitores	
Emerge F₁	
Sembrar F₁ x F₁	
Retirar a los progenitores	
Emerge F₂	

Escribir, con la nomenclatura adecuada, la cruce de los espacios destinados en la figura de la siguiente para una cruce dihíbrida

P ♂ _____ x ♀ _____
 Fenotipo Fenotipo

Genotipo _____ x _____

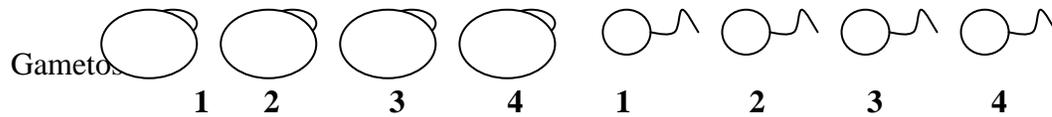
Gametos



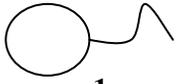
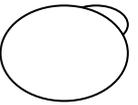
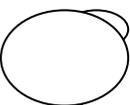
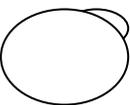
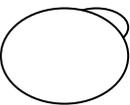
Genotipo F₁ _____

Fenotipo _____

F₁ X F₁ ♂ _____ x ♀ _____
 Fenotipo Fenotipo



Cuadro de Punnett

 +CO ₂	 1	 2	 3	 4
 1				
 2				
 3				
 4				

CUESTIONARIO

1. Describa el ciclo de vida de *D. melanogaster*.
2. Mencione las características que permiten diferenciar el sexo en *D. melanogaster*.
3. ¿Cuáles son los elementos básicos del medio de cultivo? Indique su función.
4. Definir los siguientes conceptos.
 - a. Gen
 - b. Alelo
 - c. Cromosoma
 - d. Homocigoto
 - e. Heterocigoto
 - f. Locus
 - g. Fenotipo
 - h. Genotipo
 - i. Cruza monohibrida y dihibrida
5. Investigar 5 ejemplos de herencia Mendeliana en el humano y explicar cada una de ellas.

6. Realizar a través de un diagrama tres ejemplos de la primera y la segunda ley de Mendel, indicando la frecuencia genotípica y fenotípica de la F_1 y F_2

7. ¿Cómo afecta la temperatura la duración del ciclo de vida de este insecto?

8. ¿Qué son los discos imaginales? ¿Cuál es su importancia?

BIBLIOGRAFIA

1. Demerec M. Kaufmann, B. P., 1979. Introducción a la genética y citología de *D. melanogaster*, 7ª Edición, México: Edición autorizada por el instituto Carnegie de Washington.

2. Salceda, V. M., Gallo, A. J., 1984. Genética de *D. melanogaster*. Técnicas de laboratorio, 1ª. Ed. México: Editorial Limusa, S.A.

3. Winchester, A. M., 1977. Introducción a la genética humana, Ed. Alambra, Madrid, España.

4. Winchester, A. M., 1980. Laboratory manual of genetics, Third edition, U.S.A.: Wm. C. Brown Company Publishers. USA.

5. Arnaiz, Castañeda, 2004. Conceptos básicos de genética. UNAM y Facultad de Ciencia. México.

6. Avers, C. 1990. Genetics, Ed. Wadsworth Internacional. USA.

7. Barahona, Ana, 1992. El hombre de las moscas, Ed. CNCA-PANGEA. México.

8. Blanco y Bullon. 1997. Cuadernos de genética, Ed. Marban. España.

9. C. Stern y E. R. Sherwood, 1973. El origen de la genética, Ed Alambra. España.

10. Gardner Simmons, 1991. Principios de genética, Ed. John Wiley, 4ª edición. España.

11. Márquez Trujillo J. M. 1992. Principios de genética humana, Ed. La Prensa Medica Mexicana. México.

12. Thompson y Thompson, 1993. Genética medica, Ed. Salvat, 2ª edición. España.

PRÁCTICA No. 2

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ADN

INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (ADN por sus siglas en inglés) fue aislado por primera vez en 1869 por Miescher, desde entonces ha sido objeto de múltiples investigaciones, es un biopolímero, que por diversos estudios fisicoquímicos ha demostrado su elevado peso molecular, en donde las unidades que se repiten son nucleótidos éstos están formados por una base nitrogenada (adenina, guanina, timina y citosina), ácido fosfórico y un azúcar en este caso desoxi-D-ribosa.



Fig. 1 Watson y Crick

Una de las propiedades que destacan al ADN es su elevada viscosidad en soluciones acuosa así como su fragilidad.

Tomada de <http://physicsweb.org/>

En cuanto a la estructura del ADN Watson y Crick (Fig.1) en 1953, propusieron un modelo; constituido por dos cadenas de ADN que se enrollan helicoidalmente en torno a un eje central común originando una molécula de cadena doble de unos 20Å de diámetro, las cadenas de azúcar fosfato están situadas en la parte externa, las bases púricas y pirimídicas se encuentran enlazadas por puentes de hidrógeno, (Fig. 2) en la parte interna de las hélices solo se tolera el apareamiento de bases entre adenina y timina o entre guanina y citosina (Fig.3).

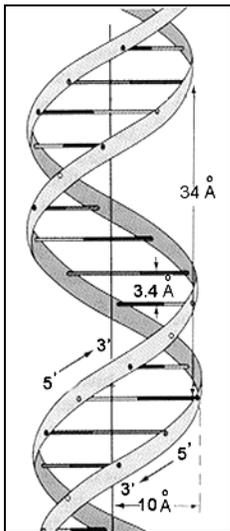


Fig. 2 Estructura secundaria del ADN

Tomada de <http://www.um.es>

El ADN de un organismo determinado es relativamente homogéneo en lo que se refiere a:

Las bases que entran en su composición; peso molecular y localización intracelular.

En esta molécula se encuentra almacenada la información genética de las células vivientes.

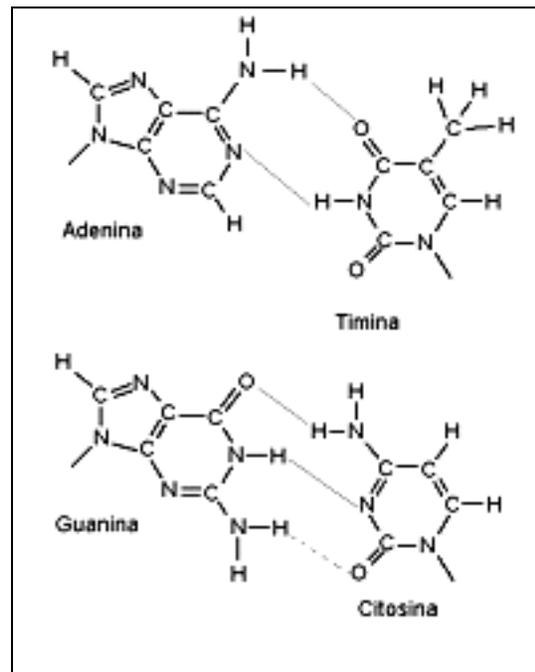


Fig.3 Apareamiento de bases en el ADN

Tomada de <http://superfund.pharmacy.arizona.edu>

OBJETIVO

El alumno obtendrá, purificará e identificará el ácido desoxirribonucleico (ADN) de germen de trigo en el laboratorio, mediante una técnica sencilla y de fácil aplicación.

FUNDAMENTO

La obtención del ADN se realiza con una metodología basada en las propiedades fisicoquímicas de éste, de tal forma que no se modifique su estructura y pueda identificarse mediante la reacción de uno de sus componentes: la desoxi-D-ribosa con difenilamina.

MATERIAL Y EQUIPO

- Espátula
- Mortero con pistilo
- Vasos de precipitados de 250 ml
- Probeta de 50 ml
- Tubos de ensaye de 16 x 150
- Pipetas de 5 ml
- Centrífuga clínica
- Parrilla eléctrica
- Balanza de dos platos
- Vidrio de reloj
- Vasos de precipitados de 100 ml
- Agitador de vidrio
- Tubos de ensaye de 13 x 100
- Pipetas de 1 ml
- Frasco con tapón esmerilado de 250 ml
- Gasa

MATERIAL BIOLÓGICO

- Germen de trigo

REACTIVOS

- Hielo seco
- Buffer CSC
 - Citrato de sodio 0.15 M
 - Cloruro de sodio 1.5 M
- Buffer SAS
 - Tris 0.01 M
 - Sacarosa 0.30 M
 - MgCl₂ 0.005 M
 - Mercaptoetanol 0.005 M (PM 78 d = 1.114 g/ml)
- EDTA Salino pH 8.0
 - EDTA 0.1 M
 - NaCl 0.15 M
- TRIS 0.4 M pH 8.5
- Lauril sulfato de sodio al 4% en agua P/V
- Etanol 96° frio
- DSC Dilución 1:100 del buffer CSC
- Mezcla Sevag
 - Cloroformo 24 partes
 - Alcohol isoamílico 1 parte

- Ácido tricloroacético al 10%
- Difenilamina.- Disolver 1.5 g. de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial, agregar 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Guardar en frasco ámbar y en la oscuridad.

PROCEDIMIENTO

Macerar 5 g de germen de trigo en un mortero, agregando pequeños trozos de hielo seco hasta homogeneizar finamente el material.

Pasar el material a un vaso de precipitados de 100 ml adicionar 30 ml de buffer SAS agitando rápidamente una vez que está todo el material húmedo, agregar un trozo de hielo seco muy fragmentado mezclar y dejar congelar durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo descongelar en baño maría a 30 grados.

Pasar este homogeneizado a través de una gasa doble y con un trozo de plástico limpio ayudar a exprimir el material de la gasa.

Centrifugar el filtrado a 3000 rpm durante 5 minutos.

Desechar el sobrenadante y resuspender el botón en 5 ml de TRIS 0.4 M, añadir ahora 5 ml de lauril sulfato de sodio y homogenizar, agregar 0.5 ml de EDTA salino y por último adicionar 1 ml de CSC.

Verter el contenido del tubo lentamente a un vaso de precipitados de 250 ml que contenga 50 ml de etanol frío en baño de hielo. El ADN asciende como una nata blanca. Fig. 4.

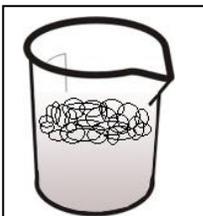


Fig.4 ADN precipitado asciende

Colectar con la ayuda de una varilla esta nata blanca y transfírela a un vaso de pp de 100 ml, eliminar el alcohol con un papel filtro.

Disolver el ADN en 40 ml de DSC y agregar la cantidad necesaria de NaCl para que estos 40 ml queden a una concentración 1 M de NaCl. Recuerde que el DSC, es una dilución del CSC 1:100 y que por lo tanto ya existe NaCl en ella considérela para su cálculo.

Añadir 40 ml de la mezcla Sevag y en un frasco con tapón esmerilado agitar durante 10 minutos, haciendo chocar suavemente el contenido con las paredes del frasco.

Centrifugar el material a 3000 rpm durante 5 minutos; se obtienen 3 fases, en la superior se encuentra el ADN, en la media las proteínas histonas y no histonas que se encontraba asociada al ADN, y en la capa inferior translúcida la mezcla Sevag (Fig. 5). Las figuras 4 y 5 fueron elaboradas por Carlos Bautista R.

Colecte en un vaso de precipitados las capas superiores de todos los tubos, ahora vierta lentamente lo colectado a un vaso de precipitados que contenga 50 ml de etanol frío en baño de hielo.

Colectar el ADN libre de proteína con una varilla de vidrio sobre un vidrio de reloj y elimine el exceso de alcohol con un papel filtro. Obtenga por diferencia el peso del ADN.

Identificación.

Depositar aproximadamente la mitad del ADN en un tubo de 16 x 150, agregar 1 ml de TCA al 10%, calentar en baño maría a ebullición durante 15 minutos tape la boca del tubo con aluminio para evitar en lo posible la evaporación, en este hidrolizado estará presente la desoxirribosa libre, de tal forma que es posible identificarla.

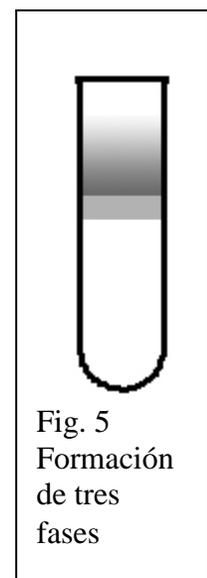


Fig. 5 Formación de tres fases

Prepare un tubo testigo similar al descrito en el punto anterior, sustituya el ADN por un ml de agua. Dé el mismo tratamiento a ambos tubos simultáneamente. Márquelos para poder identificarlos.

Al término del calentamiento agregue a cada tubo tres ml del reactivo de difenilamina.

Calentar ambos tubos en baño de agua hirviendo durante 15 minutos.

Compare la coloración que obtuvo en los tubos.

REPORTE DE RESULTADOS

Informe sobre la estructura y función del ADN, recupere datos históricamente importantes

Describa las reacciones que ocurren durante la identificación.

Indique si la reacción del hidrolizado de ADN con la difenilamina fue positiva o negativa y explique. Esquematice el resultado.

Indique porcentaje de de ADN obtenido en relación con los 5 gramos de germen con los que inició la práctica.

CUESTIONARIO

1. ¿Que azúcar forma parte de los ácidos nucleicos?
2. ¿Cuáles son las bases nitrogenadas características del ADN?
3. ¿Como está formado un nucleótido?
4. ¿Como se aparean las bases nitrogenadas en el ADN?,:
5. ¿Donde se localiza ADN de una célula eucariótica?
6. ¿Como se puede producir la desnaturalización del ADN?
7. ¿Cuáles son las precauciones que se deben tomar en cuenta para obtener el ADN?
8. Describa la estructura primaria y secundaria del ADN.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooker, R. J. 2004. Genetics: analysis and principles. McGraw-Hill Higher Education. USA.
2. Brooker, R. J. 2004. Genetics: student solutions manual. McGraw-Hill Higher Education. USA.
3. Day, T. 2004. Genetics. Gale Group. USA.
4. Hardin, C. 2001. Cloning, gene expression, and protein purification: experimental procedures and process Rationale. Oxford University Press Incorporated. USA
5. Pierce, C. 2004. Genetics. W. H. Freeman & Company. USA.
6. Voet, D. y Voet, J. G. 2006. Bioquímica. 3ª ed. Ed. Panamericana. España.

PRÁCTICA No. 3 CROMOSOMAS GIGANTES

INTRODUCCIÓN

La presencia de cromosomas gigantes es un fenómeno que se presenta en la naturaleza en casos muy específicos, de ésta manera se han identificado dos tipos:

Los cromosomas gigantes plumulados o plumosos (Fig.1) presentes en ovocitos de anfibios denominados así por su forma evidenciada al microscopio.

Los cromosomas politénicos identificados en insectos de género *Chironomus* y en dípteros, específicamente en la etapa larvaria; como el material biológico que se utilizara en esta práctica.

En 1881 E. G. Balbiani describió unas estructuras descritas como bandas en los núcleos de un insecto del género *Chironomus*, sin que esta observación tuviera mayor relevancia.

En 1884 J. B. Carnoy confirmó los hallazgos hechos por Balbiani.

En 1933 T. S. Painter identificó los cromosomas politénicos en glándulas salivales de *Drosophyla melanogaster*.

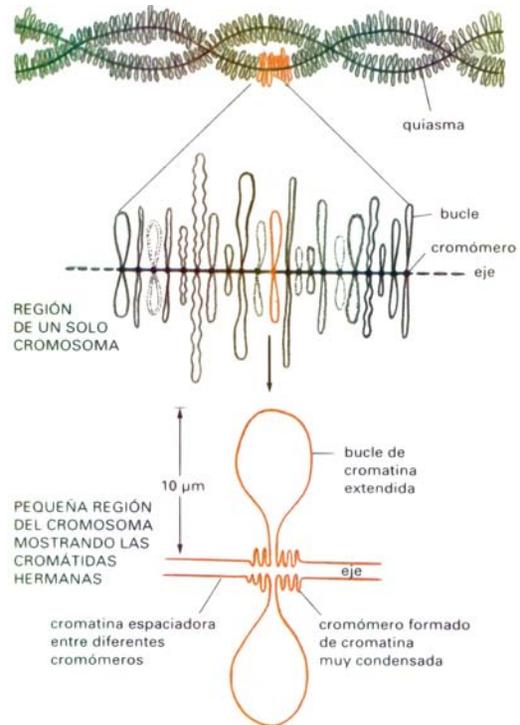


Figura 1 Cromosomas plumulados

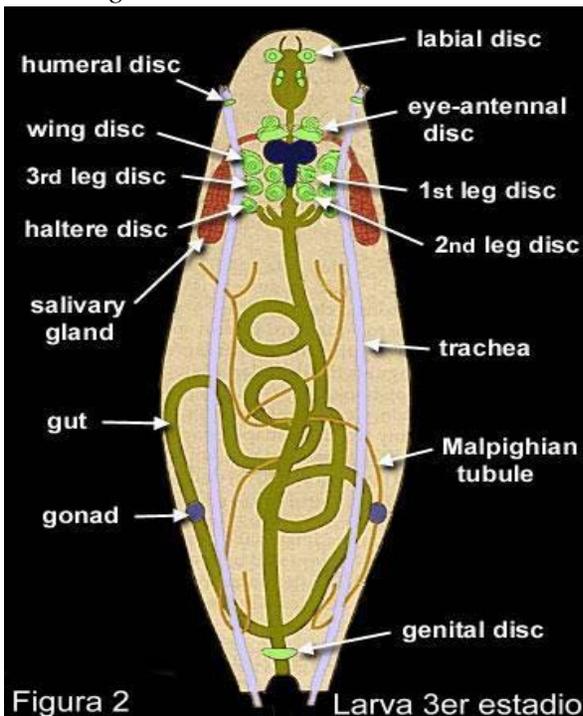


Figura 2 Larva 3er estadio

En

1934 Bridges hizo extensos y detallados estudios de los cromosomas politénicos correlacionando su estructura con el genoma de la mosca.

Los cromosomas gigantes son fácilmente observable en la *Drosophyla melanogaster*, específicamente en las células interfásicas de las glándulas salivales de larvas de tercer estadio presentando un mayor diámetro y una mayor longitud que los cromosomas metafásicos. Aunque cabe hacer mención que los cromosomas gigantes se pueden encontrar en algunas otras estructuras de la larva de tercer estadio. (Fig. 2).

Los cromosomas gigantes politénicos son producto de un proceso llamado endomitosis aunque actualmente se le denomina más correctamente endoautoreplicación el cual consiste

en lo siguiente; los cromosomas normales inician una serie de duplicaciones sin que éstas se acompañen de división celular con lo cual, el material genético neoformado se va acumulando a los lados de los cromosomas originales en perfecta concordancia dando la apariencia de un cable con gran cantidad de filamentos.

También derivado del acomodamiento ya mencionado encontramos la presencia dentro de estos cromosomas de bandas oscuras, las que denotan la presencia de gran cantidad de ADN además de que son sitios específicos de asentamiento invariable del locus génico, por lo cual la longitud de cada banda variará de acuerdo a la información génica que contenga; las interbandas claras denotan una escasa cantidad de ADN. En algunos sitios del cromosoma se encuentran abultamientos llamados anillos de Balbiani o Puffs y son sitios de intensa síntesis de RNA (Fig. 3 Anexos).

Las siguientes son características de los cromosomas gigantes de *Drosophyla melanogaster*;
En cuanto a forma y tamaño son totalmente diferentes de los correspondientes cromosomas metafásicos (Fig. 4 Anexos).

Son cromosomas politénicos,

Son producto de una serie de 9 ciclos de replicación,

Están formados por aproximadamente 1024 filamentos,

Presentan alrededor de 5000 bandas que representan todo el genoma de la mosca.

Su estudio ha permitido lograr grandes avances en citogenética. Primordialmente, porque su tamaño facilita el análisis de secuencia de bandas en los cromosomas comparando el patrón de bandas de un individuo con el bandeado normal y las diferencias que se hallan pueden correlacionarse con las diferencias fenotípicas que se detectan. (Fig. 5 Anexos)

FUNDAMENTO

El método de “aplastado” (squash) y la tinción con colorantes básicos permiten obtener preparaciones citológicas adecuadas para estudios citogenéticos. El material utilizado, las glándulas salivales de *Drosophyla melanogaster*, representa un modelo valioso para observación de los cromosomas gigantes.

OBJETIVOS

El alumno elaborará preparaciones citológicas de glándulas salivales de *Drosophyla melanogaster*

El alumno identificará los cromosomas gigantes de *Drosophyla melanogaster* utilizando preparaciones citológicas elaboradas por él, en el laboratorio.

El alumno detallará la importancia de los cromosomas gigantes en los estudios de Genética.

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

- Microscopio óptico
- Estereoscopio
- Varilla de vidrio
- Papel filtro
- Papel seda
- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Cajas de petri
- Agujas de disección

MATERIAL BIOLÓGICO

- Larvas de tercer estadio de *Drosophyla melanogaster* (Véase video Larva de 3er estadio).

REACTIVOS

- Ácido acético al 30% v/v
- Aceite de inmersión
- Sellador de parafina para las preparaciones temporales
- Solución colorante de acetorceína o
- Solución colorante de acetocarmín

PROCEDIMIENTO

Coloque la larva elegida en un portaobjetos limpio y agregue una gota de ácido acético al 30% (Véase nota 1)

Diseque con cuidado en el estereoscopio, utilizando las agujas para obtener las glándulas salivales (Véase video Disección de las glándulas).

Con una de las agujas fije la larva firmemente por la parte media, la otra aguja colóquela detrás de las partes bucales para desprender la cabeza. Las glándulas por lo general son expulsadas de su sitio con el movimiento de decapitación. (Véase nota 2).

Retire del portaobjetos las partes quitinosas y el reto del cuerpo de la larva.

Macere las glándulas utilizando la punta de la aguja de disección, teniendo cuidado de no macerar demasiado.

Agregue una gota de colorante sobre el material y remueva para que entre en contacto con él, espere durante 5 minutos, no permita que la preparación se seque y si esto sucede añada otra gota de colorante.

Coloque un cubreobjetos limpio sobre el material y con la goma de un lápiz presione ligeramente en forma vertical.

Coloque la preparación con el cubreobjetos hacia abajo en medio de un círculo de papel filtro doblado por la mitad.

Presione firmemente con al yema del dedo pulgar evitando movimientos laterales del cubreobjetos (Véase video Método de squash).

Observe las preparaciones al microscopio para determinar si se logró una buena separación y coloración de cromosomas. (Véase notas 3 y 4).

Selle los bordes del cubreobjetos, utilizando para tal fin el sellador temporal de parafina, caliente la aguja de disección con la ayuda de un encendedor y funda el sellador, tome una gota de éste y extiéndala en los bordes del cubreobjetos a fin de evitar que el montaje se evapore rápidamente.

Observe al microscopio la preparación y localice los cromosomas gigantes, poniendo especial interés en su morfología y la presencia de bandas e interbandas a lo largo del cuerpo cromosómico (Fig. 6 anexos).

Guarde si se requiere las preparaciones temporales en una caja de petri con papel filtro impregnado en ácido acético al 30% y bajo refrigeración. Así almacenadas las preparaciones pueden durar en buen estado de 4 a 5 días.

Si se desea realizar el montaje de las preparaciones permanentes consulte el apéndice.

NOTAS

El color de las larvas elegidas debe ser blanco y éstas deben de tener movilidad activa.

Las glándulas salivales son un par de bolsas muy transparentes.

Se deberá observar, en una buena preparación, los cromosomas como estructuras definidas, en caso de duda consulte a su asesor.

Si la separación de los cromosomas no fue la adecuada, deberá presionar nuevamente la preparación. Si la tinción no fue la adecuada deje actuar más tiempo el colorante.

REPORTE DE RESULTADOS

Dibuje esquemas de los cromosomas observados e identificados, haciendo notar la presencia de bandas, interbandas y puffs.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué ventajas presenta utilizar *Drosophyla melanogaster* en estudios de genética?
2. Diga como y porqué se forman los cromosomas gigantes en *Drosophyla melanogaster*.
3. ¿Por qué se obtienen las glándulas salivales durante el tercer estadio larvario y no en otros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y James D. Watson. 2002. Biología molecular de la célula. 3rd. Omega. Barcelona España.
2. Cooper Geoffrey M. y Ahusman Robert E. 2006. La célula. 3rd. Marban. Madrid España.
3. Demerec M. y Kaufmann B. P. 1979. Introducción a la genética y citología de *Drosophyla melanogaster*. 7a. México: Edición autorizada por el Instituto Carnegie de Washington.
4. Gardner E. J. 1979. Principios de genética, 5ª. México Editorial Limusa S.A.
5. Salceda V.M. y Gallo, A. J. 1984. Genética de *Drosophyla melanogaster* Técnicas de laboratorio, 1rd. México. Limusa, S. A.
6. Winchester A. M. 1977. Introducción a la genética humana, España. Alambra.
7. Winchester A. M. 1980. Laboratory manual of genetics, 3rd. U.S.A. Wm. C. Brown Company Publishers.

ANEXOS

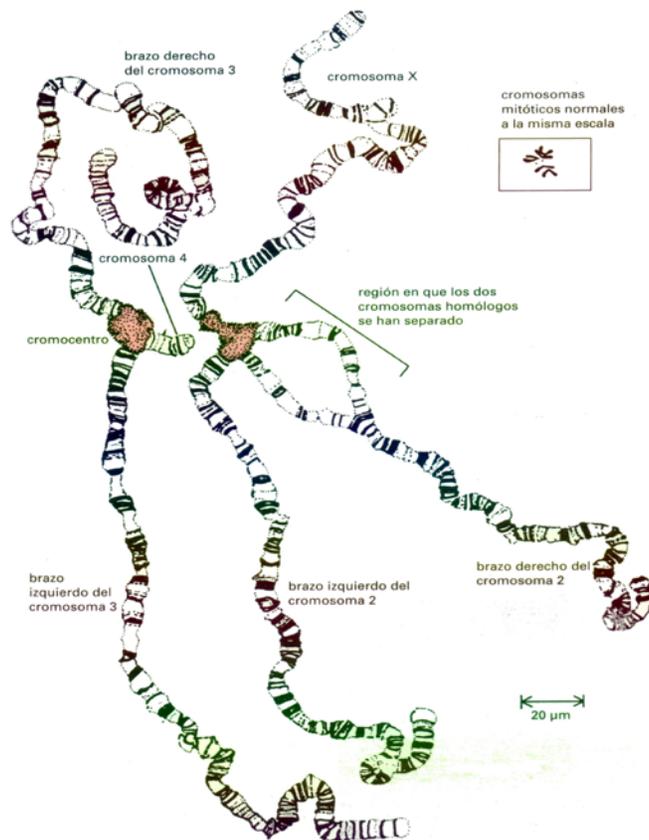
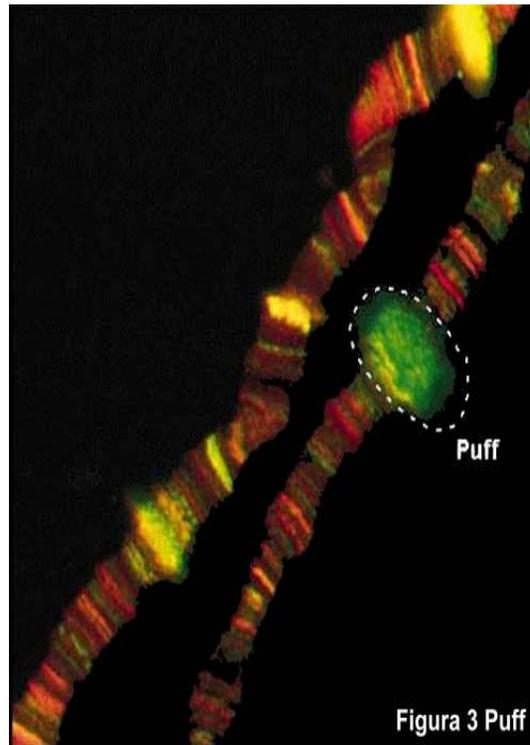


Figura 4 Comparación entre cromosomas gigantes y metafásicos



Figura 5 Cromosomas Gigantes en glándulas salivales



Figura 6 Cromosomas gigantes

Créditos de las figuras:

Fig. 1 tomada de Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y James D. Watson. 2002. Biología molecular de la célula. 3rd. Omega. Barcelona España.

Fig. 2 tomada de Differential Expressions 2: Key Experiments in Developmental Biology. March 2006. Tyler; Kozlowski; Gilbert DVD format. 107 minutes. USA.

Fig. 3 tomada de <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromoeuc/cromoeuc.htm>

Fig. 4 tomada de Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y James D. Watson. 2002. Biología molecular de la célula. 3rd. Omega. Barcelona España.

Fig. 5 tomada de Geoffrey M. Cooper. 2002. La Célula Editorial Marbán, 2ª ed. Argentina

Fig. 6 Fotografía proporcionada por MC Raúl Zavala Chavero.

PRÁCTICA No. 4 OBSERVACIÓN DE CROMATINA SEXUAL

INTRODUCCIÓN

La cromatina sexual se deriva de un cromosoma "X" de origen materno o paterno, condensado precozmente durante el desarrollo embrionario femenino normal, de manera aleatoria en cada una de las células que componen a dicho embrión; a partir de esas células hijas resultantes seguirán condensando el mismo cromosoma "X" de su progenitora (fig. 1).

El cromosoma "X" único de las células masculinas normales no se inactiva.

En 1923, Painter demostró citológicamente la existencia de los cromosomas X y Y en el humano; En 1949, Barr y Bertram

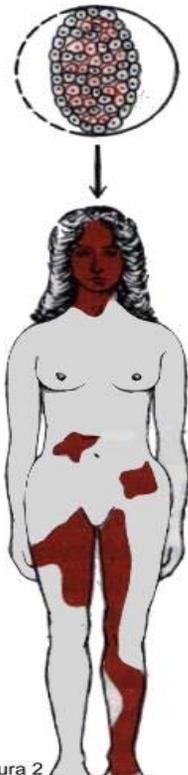
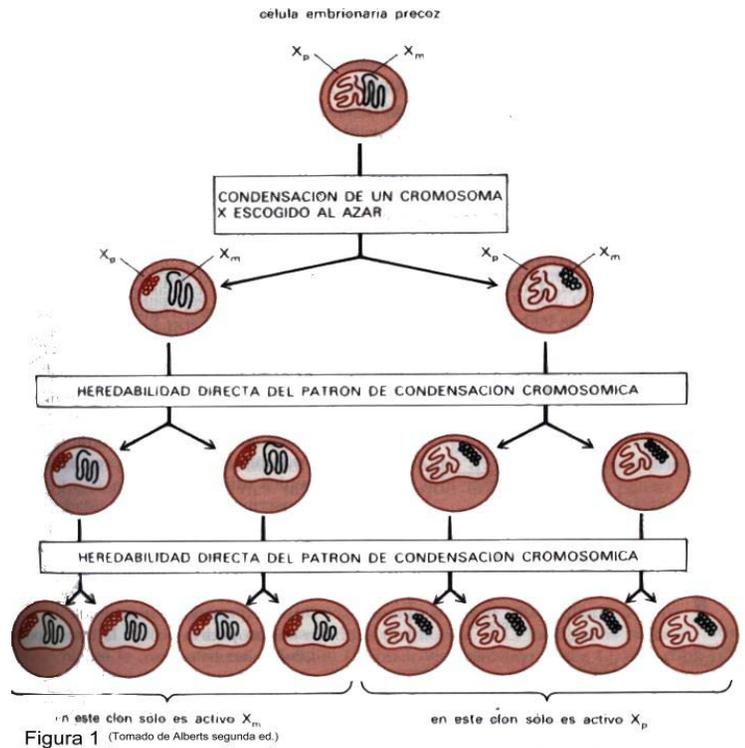


Figura 2



consecuencia de una serendipia descubrieron a la cromatina sexual en neuronas de gata en interfase femeninas y no en masculinas; En 1959 Ohno, Kaplan y Kinosita demostraron que la cromatina sexual corresponde a un solo cromosoma "X" condensado; en 1961 Mary Lyon propuso su hipótesis de la cual los puntos más importantes son: a) El cromosoma "X" condensado es genéticamente inactivo, b) La primera inactivación del cromosoma "X" materno o paterno es al azar en etapa de blastocisto, c) Una vez establecida la inactivación el mismo cromosoma "X" (paterno o materno) seguirá inactivándose en las células descendientes.

De lo anterior se deduce que la inactivación del cromosoma "X" en la hembra (un corpúsculo de Barr) (Fig. 5') tiene como consecuencia una compensación de dosis cromosómica en relación con el macho (Sin corpúsculo de Barr) (Fig. 5) y que las hembras son un mosaico en relación a la inactivación del cromosoma "X" en cada una de las células del organismo (Fig. 2).

La cromatina sexual se encuentra en los núcleos interfásico de las células y puede ocupar diferentes posiciones dentro de éstos dependiendo del tipo de tejido. En las células tejido epitelial de la mucosa bucal se encuentra pegado a la membrana interna del núcleo (Fig. 3). En un frotis sanguíneo se puede identificar en los leucocitos Neutrófilos o polimorfonucleares en forma de palillo de tambor (Drumstick) por su forma como una prolongación de uno de los lóbulos de dichas células sanguíneas (Fig. 4). También puede observarse fácilmente en preparaciones citológicas de raíz de cabello y en Neuronas (suspendida en el jugo nuclear) donde originalmente fue identificada. En general se observa en cualquier tejido cuyas células tengan núcleos grandes y con cromatina dispersa.

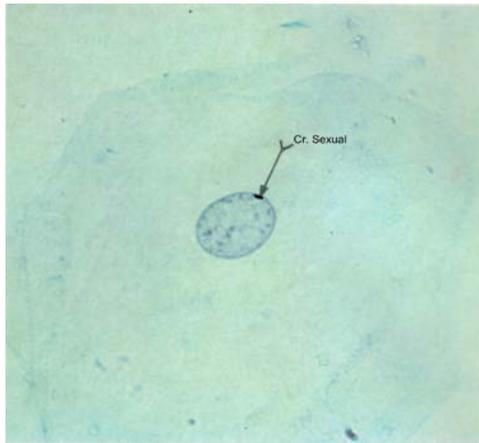


Figura 3: Célula Epitelial

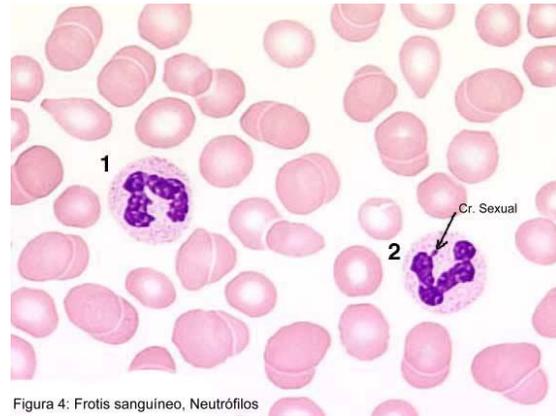


Figura 4: Frotis sanguíneo, Neutrófilos

La fórmula para determinar el número de corpúsculos de Barr es la siguiente:

$$N. \text{ Barr} = N. \text{ "X"} - 1 \text{ (Cuadro 1 en anexos).}$$

Donde N. Barr es = a número de corpúsculos de Barr y N. "X" = a número de cromosomas "X".

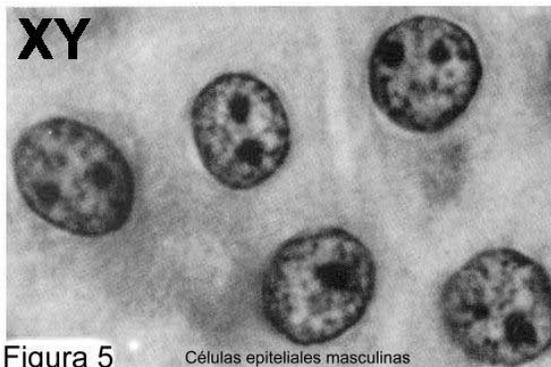


Figura 5 Células epiteliales masculinas

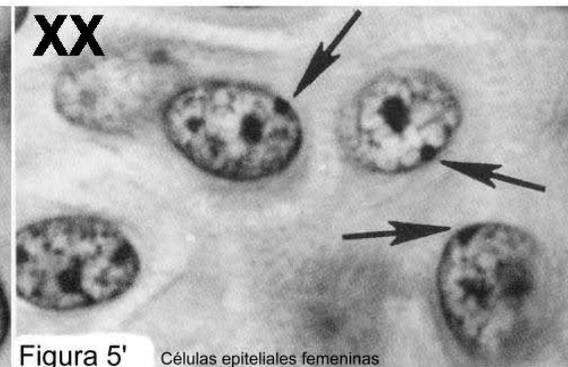


Figura 5' Células epiteliales femeninas

En las células con dos cromosomas X o más, sólo uno de ellos se encuentra laxo y disperso en el núcleo mientras que los restantes se encuentran en estado condensado por lo que se tiñen más intensamente, a los individuos que lo presentan se les denomina cromatina positivos.

FUNDAMENTO

La sexocromatina es un método diagnóstico clínico específico para determinar aberraciones cromosómicas de tipo numérico ligadas a cromosoma sexual (Cromosoma "X"); por lo tanto se pueden determinar síndromes como Turner, Superhembra, Klinefelter entre otros.

Para el estudio de la cromatina sexual, se utiliza un tejido de fácil obtención (epitelio de carrillo bucal y frotis sanguíneo), un ulterior tratamiento con un fijador, el cual tiene por objeto preservar las estructuras con un mínimo de alteraciones, seguido del uso de un colorante mixto que permite teñir tanto las estructuras cromosómicas de carácter ácido, como el citoplasma de carácter básico.

OBJETIVOS

El alumno utilizará sangre y epitelio bucal para identificar al microscopio la cromatina sexual.

El alumno aplicará diferentes métodos para elaborar laminillas en las que identificará la cromatina sexual.

El alumno determinará citológicamente el sexo de un individuo mediante la observación de las laminillas histológicas procesadas previamente.

MATERIAL. EQUIPO Y REACTIVOS

- Portaobjetos
- Microscopio óptico
- Cajas Petri
- Probeta de 25 ml
- Pipeta de 10 ml
- Abatelenguas
- Varilla de vidrio
- Papel seda
- Lancetas estériles
- Cámara de tinción

MATERIAL BIOLÓGICO

- Raspado de la mucosa bucal (células de descamación).
- Gotas de sangre obtenidas por punción capilar

REACTIVOS

- Etanol al 96% y 70%
- Solución colorante Giemsa diluido 1:10 (V/V)

- Solución colorante de fucsina básica:
 - Reactivo A: Disolver 3 g de fucsina básica en 100 ml de etanol al 70%.
 - Reactivo B: Mezclar 10 ml de solución A, 90 ml de fenol al 5%, 10 ml de ácido acético glacial y 10 ml de formaldehído al 37%. Dejar reposar 24 horas antes de su uso.
- Solución colorante de Wright
- Etanol absoluto
- Xilol
- Aceite de Inmersión

PROCEDIMIENTO

Métodos de tinción de células epiteliales con Giemsa

Enjuagar la boca repetidas veces con agua y raspar la mucosa interna de la mejilla con un abatelenguas, desechar este primer raspado por el alto contenido de bacterias.

Repetir la operación y extender la muestra sobre un portaobjetos.

Dejar secar al aire; colocar el porta objetos en una caja Petri que contenga alcohol al 96% para su fijación durante 50 minutos

Dejar secar al aire.

Pasar el portaobjetos a una cámara de tinción que contenga Giemsa diluida 1:10 (V/V) para su tinción por 15 a 20 minutos.

Lavar la preparación al chorro de agua y dejar secar al aire.

Observar las preparaciones al microscopio a 10X, 40X y 100X; localizar las células epiteliales, poniendo especial interés en la cromatina. En mujeres normales el número promedio de células de frotis bucales con corpúsculos de Barr es de 18-60 %.

NOTA 1

Una buena preparación se observa libre de bacterias y en ella las células deben verse en monocapa y la cromatina sexual aparece como una estructura más teñida pegada a la cara interna de la membrana nuclear y que no desaparece al mover el tornillo micrométrico del microscopio

Método de tinción de células epiteliales con Carbol- fucsina

Preparar un extendido siguiendo el mismo procedimiento que en el Método I.

Colocar el portaobjetos en una caja Petri que contenga alcohol al 96% para su fijación durante 40 minutos.

Dejar secar al aire

Añadir 3 a 5 e gotas de colorante carbol-fucsina y teñir durante 5 a 10 minutos, sin dejar secar el colorante.

Sumergir la preparación en etanol al 96% durante 1 minuto.

Sumergir la preparación en etanol absoluto durante 1 minuto.

Aclarar con Xilol.

Observar al microscopio a 10X, 40X y 100X.

NOTA 2

Para aclarar la preparación sumerja rápidamente la preparación (1 minuto) en Xilol y seque al aire. Si es necesario repita la operación.

Método de Wright para tinción de palillos de tambor.

Para obtener una muestra adecuada de sangre capilar: Calentar la yema de los dedos con fricción ligera y limpiar con alcohol al 70%.

Dejar secar la yema del dedo y con una lanceta estéril, picar una sola vez firme y rápidamente. No presionar el dedo para sacar la sangre, ésta debe fluir libremente.

Eliminar las 2 primeras gotas de sangre y depositar la tercera en el extremo de un portaobjetos.

Consultar con su asesor.

Dejar secar al aire la preparación.

Añadir 3 a 5 gotas de colorante Wright, teñir durante 5 minutos sin dejar secar el colorante, si esto sucede, añadir otra gota de colorante.

Lavar la preparación al chorro de agua y secar al aire.

Observar las preparaciones al microscopio a 10X, 40X y 100X localizar los neutrófilos (polimorfonucleares) poniendo especial interés en los palillos de tambor (Drumstick).

NOTA 3

La cromatina sexual se observa como una prolongación del núcleo del neutrófilo. En mujeres normales el promedio calculado de polimorfonucleares con palillo de tambor es de 3 de cada 100 células.

REPORTE DE RESULTADOS

Dibuje las células epiteliales observadas, señalando las estructuras y la cromatina sexual, si la identificó.

Dibuje los polimorfonucleares (neutrófilos) observados señalando las estructuras y los palillos de tambor, si los identificó.

CUESTIONARIO

1. Explique si el cromosoma "X" se condensa totalmente o no.
2. Defina el termino "compensación de dosis" mencionado en el texto.
3. Describa brevemente los síndromes de Turner, Superhembra y Klinefelter.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bianchi O. Nestor. 1978. Duplicación cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citológico. Ed. Unesco Washington D. C.
2. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y James D. Watson. 2002. Biología molecular de la célula. 3ª ed. Omega. Barcelona España.

3. De Robertis E. D. P. y De Robertis E. M. F. 1981. Biología celular, 10a. El Ateneo, Buenos Aires. Argentina.
4. Davidsohn I. y Henry J. B. 1979. Diagnóstico clínico por el laboratorio, 6^a ed.. Salvat Editores S. A. Barcelona. España.
5. Gardner E. J. 1979. Principios de genética, 5^a ed. Limusa, S. A. México.
6. Guizar Vazquez J. Jesús. 1988. Genética clínica. El manual moderno. México D. F.
7. Ham W. A. 1975. Tratado de histología. Interamericana, México.
8. Winchester A. M. 1977. Introducción a la genética humana. Alambra, Madrid, España.

Créditos de las figuras:

Fig. 1 tomada de Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y James D. Watson. 2002. Biología molecular de la célula. 3rd. Omega. Barcelona España.

Fig. 2 tomada de Lesson; Lesson; Paparo. 1992. Texto y Atlas de Histología, 1^a Edición, McGraw,-Hill Interamericana, México D.F.

Fig. 3 tomada de www.isftic.mepsyd.es/MaterialesEducativos/biologia/nucleo/cromatina.htm

Fig. 4 tomada de McDonald 1989 Atlas de hematología, 5^a ed. Ed. Marbán .Argentina.

Fig. 5 tomada de <http://bktt.wordpress.com/2008/12/>

ANEXO

Cromatina X ausente		45, X 46, XY 47, XYY
Una cromatina X		46, XX 47, XXY 48, XXYY
Dos cromatinas X		47, XXX 48, XXXY 49, XXXYY
Tres cromatinas X		48, XXXX 49, XXXXY
Cuatro cromatinas X		49, XXXXX

Cuadro 1 Relación entre el número de cromatinas X y el número de cromosomas X en una célula.

PRÁCTICA No. 5

CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS PARA LA OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS HUMANOS Y ELABORACIÓN DE CARIOTIPO

INTRODUCCIÓN

LINFOCITOS

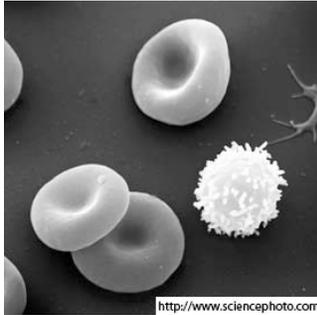


Fig 1 Eritrocitos y linfocito

Para la realización de ensayos mutagénicos, los linfocitos (Figura 1) ofrecen una serie de ventajas, como el hecho de presentar una vida media de dos a cuatro años, lo que permite que acumule lesiones en su ADN, (Ácido Desoxirribonucleico) además de encontrarse sincronizados en un estado definido del ciclo celular (G₀), y mediante la adición de un agente mitogénico como la fitohemaglutinina-M, puede ser inducido a la división en condiciones controladas, y por último, estas células han demostrado poseer una baja actividad de reparación, por lo que durante mucho tiempo ha sido uno de los sistemas ideales para el estudio del efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones de mutágenos, y realizar una gran variedad de análisis como: 1) Aberraciones cromosómicas en metafase. 2) Intercambio de cromátidas hermanas. 3) Asociaciones de satélites. 4) Cinética de la división celular. 5) Micronúcleos. 6) Mutaciones puntuales dominantes. 7) Infidelidad en la síntesis del ADN.

La disponibilidad de este tipo de material biológico, es un punto más a favor de los linfocitos, pues dependiendo de la edad, su concentración en la sangre varía de 2500 a 5500 células por ml. En los adultos el 70% de los linfocitos son del tipo T, mientras que el 30% restante corresponde a linfocitos B, (Evans y O'Riordan 1975; Natarajan y Obe, 1982; Roldán, 1992).

Estudios realizados en individuos expuestos y en células en cultivo, mostraron que los linfocitos de sangre periférica humana, son un indicador muy sensible de daño cromosómico estructural inducido. Estos cambios en la estructura, ofrecen evidencia morfológica de daño al material genético, (Evans, 1984).

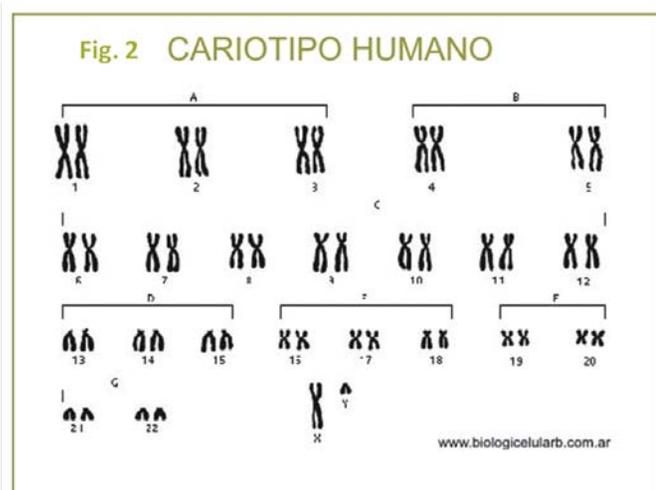
ALTERACIONES CITOGENÉTICAS

En mamíferos se han encontrado anomalías cromosómicas en virtualmente cualquier tipo celular o tejido que se ha examinado. Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, muestran que las alteraciones citogenéticas pueden ser resultado de exposición a químicos y radiación ionizante y no ionizante, (Tucker, 1996).

La asociación entre alteraciones citogenéticas específicas y tumorigénesis es fuerte, (Mitelman, 1994). Esta relación es usada como una justificación para incluir parámetros citogenéticos en evaluaciones toxicológicas de la industria química y el desarrollo de nuevos fármacos y compuestos terapéuticos, (Tucker, 1996).

CARIOTIPO E IDEOGRAMA

Para adentrarse en el análisis cromosómico debemos aprender a ordenar los cromosomas a partir de un cariotipo (número cromosómico de una especie, observado en metafase mitótica) en un ideograma (representación diagramática de un cariotipo). A partir de metafases de buena calidad obtenidas de linfocitos cultivados previamente, donde se acomodan los cromosomas por grupos según el tamaño y la localización del centrómero (Figura 2), de acuerdo a los lineamientos establecidos en Denver¹.



En el grupo A se tienen los cromosomas 1, 2, 3. Grandes metacéntricos, excepto el 2, el cual es un cromosoma grande submetacéntrico.

En el grupo B se tienen los cromosomas 4 y 5, que son submetacéntricos grandes.

En el grupo C se tienen los cromosomas 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, que son los submetacéntricos medianos.

En el grupo D se tienen a los cromosomas 13, 14 y 15, que son acrocéntricos medianos y presentan

satélites en sus brazos cortos.

El grupo E se encuentra constituido por los cromosomas 16, 17, 18, submetacéntricos pequeños.

En el grupo F se tienen a los cromosomas 19 y 20, metacéntricos pequeños.

El grupo G se constituye por los cromosomas 21 y 22, acrocéntricos pequeños.

El par de gonosomas o sexocromosomas se constituyen por X (metacéntrico mediano) y Y considerado acrocéntrico sin satélites.

¹ Denver, ciudad norteamericana, donde se llevó a cabo la Conferencia Internacional en 1966, para acordar los lineamientos a seguir en la elaboración de un ideograma a partir del cariotipo humano.

OBJETIVOS

El alumno desarrollará la metodología de cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica, para realizar la observación de los cromosomas.

El alumno se iniciará en el análisis citogénético mediante la observación al microscopio de los cromosomas humanos obtenidos del cultivo de sus propios linfocitos.

El alumno establecerá el Índice Mitótico (IM), de sus cultivos a partir del análisis de cien metafases.

El alumno identificará las metafases más adecuadas para fotografiar, amplificar y realizar el cariotipo correspondiente.

FUNDAMENTO

Para el estudio de alteraciones cromosómicas se utilizan células en división, en este caso los linfocitos se inducen *in vitro* a dividirse, mediante un agente mitogénico (Fitoheماغلوتinina-M), y la obtención de células en metafase, logradas mediante la inhibición del uso mitótico con colchicina.

MATERIAL, EQUIPO

Fase de Siembra:

- Jeringa estéril nueva, previamente heparinizada
- Tubos Falcon de 15 ml, graduados estériles.
- Pipetas graduadas estériles de 1 y 10 ml
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo a 37°C
- Marcador Indeleble
- Algodón
- Microscopio de campo claro

Material biológico:

- 5 ml de sangre periférica de donadores clínicamente sanos.

Fase de Cosecha:

- Centrifuga clínica
- Vortex
- Portaobjetos desengrasados y marcados
- Hielo
- Pipetas Pasteur (con bulbos de plástico)
- Aceite de inmersión
- Balanza de dos platos

REACTIVOS

- Heparina
- Alcohol 96%
- Medio de cultivo RPMI-1640
- Fitoheماغلوتinina-M

- Sol. Colchicina concentración 4µg/ml
- Sol. Hipotónica de KCl (0.075 M a 37 °C)
- Sol. Fijadora (Metanol-Ácido Acético 3:1 (v/v)
- Sol. de Giemsa al 10% en agua destilada

DESARROLLO METODOLÓGICO.

CULTIVO DE LINFOCITOS:

Se extraen 5 ml de sangre periférica de donadores clínicamente sanos con jeringa previamente heparinizada. La siembra de linfocitos se lleva a cabo en condiciones estériles colocando 5 ml de medio RPMI suplementado con 5 µg/ml de fitohemaglutinina y 0.5 ml de sangre completa en tubos Falcon de 15 ml. Los cultivos son incubados a 37°C por 48 horas.

COSECHA:

Se agregan 20 µl de colchicina por ml de cultivo 2 horas antes de concluir el tiempo de incubación. Para coleccionar las células, los cultivos son centrifugados a 1 500 RPM, durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y el paquete celular se somete a choque hipotónico con 5 ml de una solución de KCl (0.075 M) por 20 minutos a 37°C, después de lo cual se centrifugan nuevamente las muestras. La fijación de las células se lleva a cabo con 5 ml de una solución Metanol-Ácido Acético (frío), en una proporción 3:1 V/V, efectuando tres cambios de la solución fijadora a los 15, 10 y 5 minutos, centrifugando las muestras por 5 min. a 1 500 RPM entre cada cambio. Al término de la última fijación, se adiciona 0.5 ml de la mezcla metanol-ácido acético para que el paquete celular permanezca en solución.

LAMINILLAS:

Las preparaciones se elaboran por goteo. Finalmente se hace una tinción con una solución de Giemsa (10%) durante 10 min.

OBSERVACIÓN Y EVALUACIONES:

Para determinar el IM las evaluaciones se realizarán a 20X en microscopio de campo claro. Se cuantificarán 1000 células por ensayo, contando las células en división y distinguiéndolas de las que estén en interfase y se aplicará el siguiente estadígrafo:

$$\text{IM} = (\text{número de células en división} / \text{número total de células}) \times 100$$

Para elaborar el cariotipo, escoger las metafases mejor extendidas, completas y bien teñidas, tomar la fotografía, amplificarla y elaborar el Ideograma, siguiendo las convenciones internacionales acordadas en Denver, (Bergsma, 1966).

REPORTE DE RESULTADOS

Graficar los resultados del Índice Mitótico (IM) obtenido, por grupo. (consultar al asesor).

Incluir en el reporte del experimento el Ideograma o Cariotipo obtenido de sus observaciones al microscopio.

CUESTIONARIO

1. Explicar ampliamente cuales son los componentes bioquímicos de los cromosomas metafásicos.
2. Justifique la utilización de linfocitos para la observación de cromosomas humanos, (indicando porque no se utilizan otras células del tejido sanguíneo como los eritrocitos o plaquetas).
3. Realice un esquema de un cromosoma metafásico, señalando las siguientes estructuras: a) centrómero, b) telómero, constricción secundaria (sí aplica), y cromátidas.
4. Explique que es la heterocromatina y la eucromatina.
5. Mencione cuantos pares de bases contiene cada cromosoma y cuantos genes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barch J M, Lawsce J H., and Arsham S M. 1991. Peripheral Blood Culture (Chapter 2), En: Barch J M (Ed), *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual* . Second Edition. Reven Press, New York, N.Y., pag.17-30.
2. Bergsma, D., ed. The Bird Defects Original Article Series of publication on estandarization human cytogenetics: Denver Conference, 1960, reprinted in Chicago Conference 1966;12-15.
3. Evans, H. 1984. Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. Elsevier Science Publishers. p 405 – 416.
4. Evans, H. y O'Riordan, M. 1975. Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. *Mutation Res.* 31: p 135 – 148.
5. Natarajan, A. 2002. Chromosome Aberrations: Past, Present and Future. *Mutation Research* 504: p 3 – 16.
6. Roldán-Reyes, E. 1992. Efectos Mutagénico y Teratogénico del Pentóxido de Vanadio. FES Zaragoza, UNAM, México. 1992. p 4 – 7. Tesis de Maestría.
7. Tucker, J. y Preston, R. 1996. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges, and Cancer Risk Assessment. *Mutation Research* 365: pp 147–159.

ANEXO 1



Dotación cromosómica humana en metafase 100X (Imagen proporcionada por: Dra. Elia Roldán)

1. Recorta los cromosomas que aparecen en el esquema.
2. Ordena los cromosomas por tamaño y posición del centrómero.
3. Ubícalos por pares.
4. Identifica cada par.
5. Escribe la fórmula cromosómica indicando: el número total de cromosomas y, separado por una coma, los cromosomas sexuales que encontraste.
6. ¿Cuál par cromosómico mostraría diferencias si el cariotipo correspondiera a un individuo con Síndrome de Turner, con Síndrome de Klinefelter, con Síndrome de Down ?

OBSERVACION DE CROMOSOMAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

(Práctica alternativa al cultivo de linfocitos)

INTRODUCCIÓN

Ratones, ratas y hámster chino son las especies más comúnmente utilizadas para estudios de citogenética *in vivo*. El procedimiento básico es tratar a los animales por varias rutas de aplicación y tomar muestra de diferentes tejidos después de un intervalo de tiempo apropiado. Son posibles dos tipos de evaluaciones citogenéticas: el análisis de metafases para aberraciones cromosómicas y/o la evaluación de la frecuencia de micronúcleos. Ambas técnicas son comúnmente aplicadas y evaluadas en médula ósea; sin embargo también son utilizados órganos como el bazo, riñón, hígado, embriones completos, órganos fetales y, células germinales.

El complemento cromosómico del hámster chino ($2n=22$) contiene pares de cromosomas que se distinguen muy bien lo cual facilita el conteo. El juego cromosómico de la rata ($2n=42$), presenta cromosomas metacéntricos y acrocéntricos, mientras que los ratones ($2n=40$), únicamente acrocéntricos. Ambos ratas y ratones son comúnmente utilizados en toxicología, así que los datos de dosificación están disponibles.

Para la mayoría de pruebas se escogen animales jóvenes, maduros sexualmente y se distribuyen azarosamente en grupos control y tratado. Es prudente utilizar ambos sexos (machos y hembras), en pruebas citogenéticas de tejidos somáticos. Se incluyen de cuatro a cinco animales por sexo, dosis, e intervalo de tiempo. Los animales se albergan en cubículos con aire acondicionado, con ciclos de luz constante y, se les provee de alimento y agua *ad libitum* (Adler, 1984, Roldán, 1992; Altamirano-Lozano *et al.*, 1993; Álvarez-Barrera y Altamirano-Lozano, 1999).



OBJETIVO

El alumno aplicará una metodología para realizar la observación de cromosomas de ratón, a partir de un tejido somático en crecimiento activo, en este caso la médula ósea.

Fig. 1 Ratón cepa CD-1

FUNDAMENTO

Para este estudio de los cromosomas se utilizan células en división, en este caso se elige la médula ósea por ser un tejido somático en crecimiento activo; la acumulación de células en metafase se logra inhibiendo la formación del huso acromático con colchicina; el tratamiento hipotónico esparce los cromosomas dentro de la célula y los hace distinguibles individualmente.

MATERIAL Y EQUIPO

- Jeringas de 1 y 5 ml
- Estuche de disección
- Tabla de disección
- Tubos de ensaye de 13 x 100
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Portaobjetos desengrasados
- Pipetas Pasteur
- Algodón
- Centrífuga clínica
- Balanza granataria
- Balanza de dos platos
- Papel seda
- Baño maría a 37 °C
- Microscopio de campo claro
- Vortex (agitador de toque)

MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratones (de dos meses y medio (60 a 75 días) de edad y de 25 a 30 g de peso).

REACTIVOS

- Colchicina al 0.1% (Véase nota 1)
 - Solución hipotónica de KCl 0.057 M).
 - Solución fijadora.- Mezcla de metanol - ácido acético en proporción 3:1 (V/V). (Recién preparada y fría).
 - Solución colorante de Giemsa.- Diluir el Giemsa con agua destilada 1:10 (V/V).
 - Aceite de inmersión

PROCEDIMIENTO

1. Inyectar el ratón, intraperitonealmente colchicina al 0.1% (0.1 ml por cada 10 g. de peso) (Véase nota 1).
2. Sacrificar al animal por dislocación cervical, después de una hora.
3. Colocar al animal en la tabla de disección y disecar los dos fémures.
4. Cortar las cabezas femorales. (Véase nota 2).
5. Extraer la médula ósea inyectando 5 ml de solución hipotónica, previamente incubada a 37° C. por el extremo superior del fémur. El líquido debe fluir a través del hueso de tal forma que "arrastre" la médula ósea. (Véase nota 3).
6. Colectar la médula ósea en tubos cónicos. Incubar en baño maría a 37° C durante 20 minutos.
7. Transcurrido el tiempo de incubación, centrifugar al 1500 rpm. durante 10 minutos, desechar el sobrenadante.
8. Primera fijación.- Agregar lentamente 5 ml de fijador (metanol - ácido acético 3:1 V/V) con agitación continua, dejar reposar 10 minutos. (Véase nota 4).
9. Centrifugar a 1500 rpm por un lapso de 10 minutos, desechar el sobrenadante.
10. Repetir los pasos 8 y 9 dos veces más.
11. Al finalizar la última centrifugación, resuspender el botón celular en 0.5 ml de fijador limpio y frío.
12. En un portaobjetos desengrasado y glaciado, dejar caer con una pipeta Pasteur 3 gotas de la suspensión desde una altura de 20 cm, dejar secar al aire las laminillas. (Véase nota 5).

13. Cubrir las laminillas durante 10 minutos con una solución de colorante Giemsa diluido en agua, 1:10 (V/V), eliminar el exceso de colorante bajo el chorro de agua, secar al aire las preparaciones. (Véase nota 6).

14. Observar al microscopio a seco débil, seco fuerte e inmersión. Analizar en metafases completas y bien extendidas la morfología y el número cromosómico.

NOTAS

1. La solución de colchicina debe ser preparada con agua destilada.
2. Cada fémur se corta por sus dos extremos.
3. La suspensión celular deberá ser recuperada en un tubo de centrífuga o tubo de 13 x 100.
4. La primera fijación es un paso crítico; debe evitarse la formación de grumos. Consulte a su asesor.
5. Para desengrasar los portaobjetos, se recomienda sumergirlos en xilol durante 24 horas; el glaciado se logra dejando permanecer los portaobjetos en el refrigerador cuando menos una hora antes de depositar la muestra.
6. No debe secarse el colorante sobre la preparación durante el tiempo que dura la tinción, si esto ocurre añada más colorante.

REPORTE DE RESULTADOS

Indique el número de cromosomas observados por célula.

Dibuje esquemas de los cromosomas observados e identificados, haciendo notar su tamaño relativo y la posición del centrómero.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué tipo de colorantes se utilizan para teñir los cromosomas y por qué?
2. ¿Cuál es el mecanismo de acción de los siguientes reactivos?
 - a) Solución hipotónica de KCl
 - b) Solución fijadora
 - c) Solución de colchicina
3. Investigar y describir como se elabora el ideograma del cariotipo del ratón.
4. Indique el número cromosómico del ratón.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, I. D. 1984. Cytogenetic Test in Mammals, Chapter 9. En: *“Mutagenicity testing a practical approach”*. Venitt, S. y Parry, JM (Eds). Ed. OIRL PRESS, Oxford. Washington DC.
2. Altamirano-Lozano, M.; Álvarez-Barrera, L. y Roldán-Reyes, E. 1993. Citogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Medical Science Research*, 21:711-713.
3. Alvarez-Barrera, L. y Altamirano-Lozano, M. 1999. Differential response to induction of chromosomal aberrations between female and male mice treated with a low dose of cyclophosphamide. *Medical Science Research*, 27:193-196.
4. Roldán-Reyes, E. 1992. *“Efecto mutagénico y teratogénico del pentóxido de vanadio”*. FES-Zaragoza, UNAM. México. Tesis de Maestría.
5. Barrera Álvarez Lucila 1992 *“Efecto del pentóxido de vanadio sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) en la médula ósea de ratón. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza UNAM.*

ANEXO 1



Microfotografía (100X) de cromosomas de ratón.

Las fotografías de la figura 1 y del anexo fueron tomadas de la tesis de licenciatura de Barrera, 1992.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN UNIDAD 2 GENÉTICA

Cada una de las unidades tendrá una mecánica de evaluación independiente que al finalizar el curso se plasmará en calificaciones específicas por unidad, que deberán ser aprobatorias para poder exentar de primera y segunda vuelta dicho laboratorio.

REGLAS GENERALES

La asistencia al laboratorio es obligatoria y el alumno deberá de tener por lo menos un 80% de asistencias para poder tener derecho a la calificación correspondiente.

La puntualidad es importante y se dará una tolerancia máxima de 15 min. para poder llegar al laboratorio y tener derecho a la asistencia correspondiente

El alumno tiene estrictamente prohibido ingerir alimento y bebidas en el laboratorio.

El alumno tiene la obligación de usar bata durante su permanencia en el laboratorio; no podrá trabajar sin bata.

Durante una sesión de laboratorio el alumno solo podrá abandonarlo bajo consentimiento del profesor de laboratorio correspondiente

En el caso específico de la unidad 2 Genética se dará una pequeña introducción previa a cada práctica donde se tocarán los contenidos más importantes de teoría y de fundamentación metodológica para inmediatamente iniciar la metodología correspondiente.

Para el trabajo en el laboratorio los alumnos formaran equipos.

Los cuestionarios y reportes de prácticas serán entregados manuscritos y en un cuaderno especial para la unidad, para ser revisados por el profesor.

Al inicio de cada práctica el alumno entregará de manera individual la metodología en un diagrama de flujo y el cuestionario resuelto que viene al final de cada práctica

Se entregara de manera individual un reporte por cada una de las prácticas; que tendrá los siguientes rubros:

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| a). Título. | f). Resultados. |
| b). Introducción. | g): Análisis de resultados. |
| c). Objetivos. | h). Conclusiones |
| d). Metodología fundamentada | i). Bibliografía. |
| e). Material y equipo. | |

MECANISMO DE EVALUACIÓN

La evaluación de la unidad 2 Genética esta dada por dos parámetros que son:

Promedio de calificaciones por práctica, (5 en total) que a su vez contemplara los siguientes rubros: a). Asistencia y puntualidad, b). Comportamiento y desempeño del alumno en el laboratorio, c). Entrega de trabajos de laboratorio (cuestionarios, reportes de práctica etc.).Tendrá un valor de **40%** de la calificación de la unidad.

Promedio de calificaciones de exámenes uno por cada una de las prácticas de la unidad (5 prácticas) abarcando teoría y fundamentación metodológica; Tendrá un valor de **60%** de la calificación de la unidad.

Ambos promedios deberán de ser aprobatorios para obtener la calificación de exención. En caso contrario el alumno presentará esta unidad en la primera vuelta mediante un examen global teórico de todas las prácticas la calificación mínima aprobatoria será de **6**; en caso de reprobar ésta, tendrá que presentar en segunda vuelta un examen global teórico práctico que será la calificación definitiva de la unidad.

Unidad 3

Bacterias, algas y hongos

INTRODUCCIÓN

La Biología tiene como objeto de estudio a los seres vivos, quienes en la naturaleza se muestran como un complicado rompecabezas cuyas piezas tienen formas, fisiologías y hábitos particulares e interactuantes. Este conjunto, mejor conocido como biodiversidad, es al que se enfrenta el biólogo. Por ello es indispensable que tenga el conocimiento suficiente para poder reconocer, delimitar, ubicar y relacionar los elementos que la componen. Así el laboratorio se constituye como pilar fundamental en la formación del estudiante ya que le permite aplicar sus conocimientos teóricos mediante la manipulación directa de los organismos, fomentándole con esto, una infinidad de cualidades como científico. Esta tercera unidad está conformada por seis prácticas cuyo objetivo global es brindar una introducción al estudio de bacterias, algas, hongos y líquenes. Su diseño permite conocer estos grupos² mediante el análisis de su patrón estructural básico directamente con ejemplares representativos y aplicar las técnicas correspondientes para su recolección, manejo en cultivo, observación al microscopio y otras particularidades taxonómicas y ecológicas sólo por citar algunas.

El estudio de los procariotas (**Monera**) abarca las prácticas 6, 7 y 8. La práctica 6 trata las técnicas microbiológicas básicas empleadas en Bacteriología y muchas de ellas también en Micología. En la práctica 7 podrá conocer y aplicar técnicas de siembra y resiembra para aislar bacterias las cuales podemos encontrar en sustratos diversos y cuyo aislamiento requiere una infraestructura y mantenimiento mucho sencillo. Por último, la práctica 8 muestra parte de la diversidad existente de cianobacterias, grupo interesante de procariotas fotosintéticos oxigénicos, llamadas cianofitas por sus afinidades morfo- fisiológicas con algunos grupos algales. Son muy buen ejemplo del desarrollo de los niveles de organización procariota y un eslabón importante dentro de la evolución vegetal .

Los eucariotas se abordan en las prácticas 9, 10 y 11. La práctica 9 introduce al vasto grupo algal (línea autótrofa-**Protoctista**). Se hace evidente que la fotosíntesis oxigénica a lo largo de la evolución se presentó en diferentes linajes filogenéticos comprobando por qué son un grupo artificial. La práctica 10 comprende la diversidad fúngica³: hongos falsos⁴ (línea heterótrofa⁵-**Protoctista**) y hongos verdaderos (**Fungi**). Se analizan representantes mucilaginosos, unicelulares y filamentosos en una mezcla interesante de patrones estructurales. Para finalizar, en la práctica 11 se presenta a los líquenes, la más compleja de las simbiosis, algas y hongos dan como resultado el talo liquénico con su particular química de importancia taxonómica y con potencial dentro del campo de la medicina y la industria.

Las prácticas contienen una serie amplia de actividades con el fin de brindarle al profesor la flexibilidad necesaria para cubrir los objetivos en función del material disponible y el tiempo con el que se cuente. Por su parte el alumno contará con una gama atractiva de alternativas para desarrollar su proyecto de investigación según sus intereses particulares.

² Por sencillez del esquema se plantean bajo el esquema de los cinco Reinos *sensu* Margulis.

³ Bajo un criterio tradicional y sencillo se ha pretendido abarcar los grupos de “hábito fungoide”.

⁴ Ver explicación en la práctica 10 para el caso de los cigomicetos.

⁵ Por absorción, no por ingestión como en Protozoa.

PRACTICA No. 6 Y 7

PREPARACIÓN, MANEJO DE MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS, AISLAMIENTO Y OBSERVACIÓN DE BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se pueden encontrar en todos los ambientes, incluidos el suelo, el agua y el aire. Su papel en la naturaleza es relevante por sus contribuciones a los ciclos biogeoquímicos y ecológicos.

La taxonomía de las bacterias es muy compleja debido que su clasificación se basa en gran medida a sus procesos metabólicos, lo que implica una serie de pruebas bioquímicas. Sin embargo es posible reconocer básicamente cuatro grupos morfológicos: células esféricas o cocos, bastón o bacilos, espiral o espirilos y con forma de coma llamadas vibriones (Anexo 5).

Una cepa bacteriana se define como una población de células que descienden de una sola, que al compartir características comunes puede considerarse como una especie.

Para el estudio de las bacterias se utilizan técnicas microbiológicas convencionales: preparación de medios de cultivo, toma de muestras, aislamiento, técnicas de tinción, pruebas bioquímicas y observación al microscopio.

Un medio de cultivo es una mezcla que permite manipular el crecimiento de microorganismos según su naturaleza. Este medio puede ser líquido (caldo), semisólido o sólido enriquecido con diversos nutrientes. Los medios semisólidos y sólidos se preparan con agar, el cual es un ficololide inerte que se extrae de las algas rojas, cuyas propiedades de punto de fusión permiten manejarlo para diferentes fines.

Los medios de cultivo pueden ser no selectivos y selectivos o diferenciales, los no selectivos carecen de inhibidores, y sustentan el crecimiento de la mayoría de los microorganismos que se encuentran en la muestra. Este medio se puede hacerse selectivo si se adiciona uno o más antibióticos o ciertos agentes químicos.

OBJETIVO GENERAL:

Elaborar un medio de cultivo, aislar y caracterizar una colonia bacteriana

OBJETIVOS PARTICULARES:

Preparación y esterilización de material y un medio de cultivo general para cultivar bacterias

Realizar la técnica de siembra en caja petri de una cepa bacteriana

Caracterizar y aislar alguna de las colonias presentes en el medio de cultivo

Diferenciar las bacterias por la tinción de la pared celular con la técnica de Gram

Reconocer formas bacterianas

MATERIAL:**Materiales diversos:**

Algodón
Gasa
Asa bacteriológica
Mechero de gas
Termómetro (-10 a 150°C)
Papel de estraza
Papel aluminio
Bandeja de teñido
Guantes de cirujano
Cubre boca desechable
Guantes de asbesto

Material cristalería:

Cajas Petri
Matraz Earlen Mayer de 500, 1000 ml.
Tubos de vidrio capacidad 20 ml con tapón de rosca
Porta objetos
Cubre objetos

Reactivos:

Aceite de inmersión
Agar bacteriológico o medios de cultivo selectivos
Alcohol etílico grado 96 %
Solución de cristal violeta
Lugol
Acetona
Safranina
Agua destilada

Equipo:

Autoclave
Microscopio de campo claro
Estufa bacteriológica (con control de temperatura)

Material biológico

Cepas bacterianas: *Escherichia coli*,
Bacillus subtilis etc.

PROCEDIMIENTO**1. Recolección de la muestra**

La muestra puede obtenerse de sustratos diversos: exudado faríngeo, alimentos lácteos, agua, o puede ser traída de algún cepario

2. Preparación del medio de cultivo

Preparar medio de cultivo correspondiente para un litro (ver instrucciones del fabricante para su preparación, así como los requerimientos particulares). Generalmente se usan de 15 a 20 g; calcular de 10 a 15 ml por caja o tubo.

Para su esterilización vaciar en un matraz Earlen Mayer de dos litros o hacer los cálculos correspondientes por separado para medio litro en matraces de un litro. Siempre se recomienda esterilizar en un matraz del doble de la capacidad del medio a utilizar. Colocar en la boca del matraz un tapón hecho con algodón envuelto con gasa de tal forma que quede bien sellada, esto se comprueba al levantar el matraz sólo por el tapón.

3. Esterilización del material y del medio de cultivo

En microbiología, es fundamental emplear técnicas de esterilización y desinfección que permitan asegurar el trabajo libre de agentes biológicos contaminantes.

Desinfección.- se utiliza para la limpieza de materiales o superficies inertes que se puede realizar con desinfectantes (fenol al 5% en agua). Para la limpieza de manos se pueden emplear antisépticos. En ambos casos se recomienda primero lavar con agua corriente y jabón.

Esterilización.- Es importante asegurarnos que el material y medio de cultivo que vamos a utilizar esté libre de gérmenes que alteren nuestros resultados. Para ello existen distintas técnicas para la destrucción de cualquier forma de vida: calor seco (flameado, incineración, horno seco) y calor húmedo (ebullición y vapor a presión). Con el Autoclave (Anexo I) se esterilizará el matraz que contiene el medio de cultivo y el material de cristalería previamente envuelto de manera individual en papel de estraza.

Nota: Aplique esta técnica para la destrucción total de material microbiológico que ya no utilice

4. Llenado de cajas y tubos

Se colocan un par de mecheros con una separación de 30 cm entre ellos para delimitar una zona estéril. Se vierten 10 ml del medio de cultivo en las cajas y en caso de los tubos se inclinan para aumentar el área de cultivo.

5. Sembrado bacteriológico o inoculación

Se requiere un asa de inoculación de nicrom o platino (Anexo II), con un extremo insertado en un mango cilíndrico. La superficie del medio de cultivo en una placa de petri puede ser inoculada con la muestra por distintas técnicas: punteadura, estría o picadura. El asa debe ser esterilizada entre cada inoculación. Las colonias aisladas pueden ser entonces resembradas individualmente a otros medios, para obtener cultivos puros. (Anexo II)

6. Incubación

Hecho el inóculo se procede a la incubación. Los microorganismos difieren en su temperatura óptima de incubación. La mayoría crecen a 35° C. Las fluctuaciones de temperatura pueden causar problemas en la incubación.

7. Observación de colonias bacterianas

La valoración de las características de las colonias se realiza mediante la inspección visual del crecimiento en la superficie de las placas de agar. La inspección se lleva a cabo sosteniendo la placa en una mano y observando la superficie del agar para detectar crecimiento bacteriano. Cada placa debe observarse cuidadosamente debido a que las muestras iniciales son por lo generalmente cultivos mixtos que presentan diversos tipos de colonias.

Para caracterizar una colonia de bacterias deben tomar los siguientes aspectos:

Tamaño: diámetro en milímetros.

Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, con forma de huso

Elevación: plana, elevada, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada

Margen (borde de la colonia): entero, ondulado, lobulado, lacerado filamentoso, enrulado.

Color: blanco, amarillo, negro, sepia, naranja, otros.

Superficie: brillante, opaca, lisa, rugosa, brillante.
 Densidad: opaca, translúcida, transparente, otras.
 Consistencia: butirosa, viscosa, membranosa, quebradiza, otras.
 Aspecto: mucoso y seco.
 Tamaño: grande (5 mm), mediana (2-3 mm), pequeña (1-2 mm)
 (Anexo III)

8. Tinción de la pared celular (tinción de gram)

La identificación preliminar de bacterias requiere no solo de la observación de las características, sino también de su morfología y coloración diferencial de la pared celular.

a) La estructura de la pared bacteriana tiene una importancia directa y práctica para los microbiólogos debido a su estructura y composición química que es responsable de la reacción frente a los reactivos usados en la técnica Gram. Esta tinción diferencial divide a la mayoría de las bacterias en dos grupos. Bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. (Anexo 4)

9. Caracterización de la bacteria

Se refiere a la descripción de la morfología bacteriana:

- Oval o esférica (coco)
- Cilíndrica o en forma de bastón (bacilo)
- Espiral o helicoidal (espirilo)
- Filamentosa
- Formas intermedias de algunos casos anteriores (Anexo V)

Como agrupación bacteriana pueden ser:

- Agrupaciones cocoides (diplococos, estreptococos, estafilicocos)
- Agrupaciones bacilares (diplobacilos, estreptobacilos) (Anexo V)

RESULTADOS

Se presentarán características de las principales colonias observadas que se pueden identificar en forma de cuadros sinópticos que incluyan los esquemas correspondientes.

Ejemplo

Microorganismos	FORMA	TAMAÑO	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR	SUPERFICIE

CUESTIONARIO

1. Menciona las características biológicas y morfológicas más importantes de las bacterias
2. Explique en que casos se emplean medios de cultivo líquidos y semisólidos
3. Explique los fundamentos de la esterilización por medio del autoclave
4. ¿Cuál es el fundamento de la Técnica Gram?
5. Explique la técnica de conteo de bacterias por dilución

BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey y Scott. 2004. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Panamericana. México. 1115 p.
2. Bradshaw Jack L. 1973. Microbiología de Laboratorio. Ed. El Manual Moderno. México.
3. Collins C.H. y Lén P.M. 1990. Métodos Microbiológicos. Ed. ACRIBIA. Zaragoza España. 524 p.
4. Koneman,E.W., Allen, S.D., Janda W. M., Schreckenberger P. C. y Winn W. C. 2003. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a color. Ed.Panamericana. México. 1432 p.
5. Madigan T. M., Martinoko M. J. y Parker J. 2006. Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S. A. 1011 pp.
6. Granados P. R. y Villaverde P. M. 1997. *Microbiología* . Ed. Paraninfo. España.323 p.
7. Vullo D. L. Wachsman M. B. y Alche L.E. 2000. *Microbiología en Práctica*. Ed. Atlante. Argentina.
8. Wistreich G.A. y Lechtman M.D: 1989. *Prácticas de Laboratorio en Microbiología* Ed. Limusa. México. 152 p.

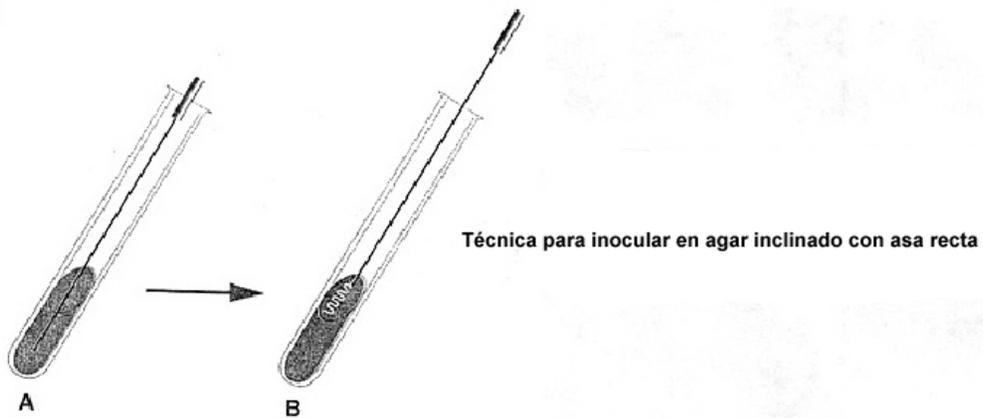
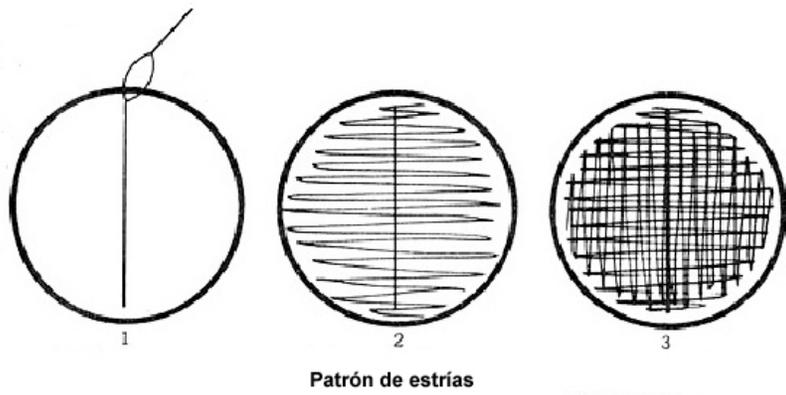
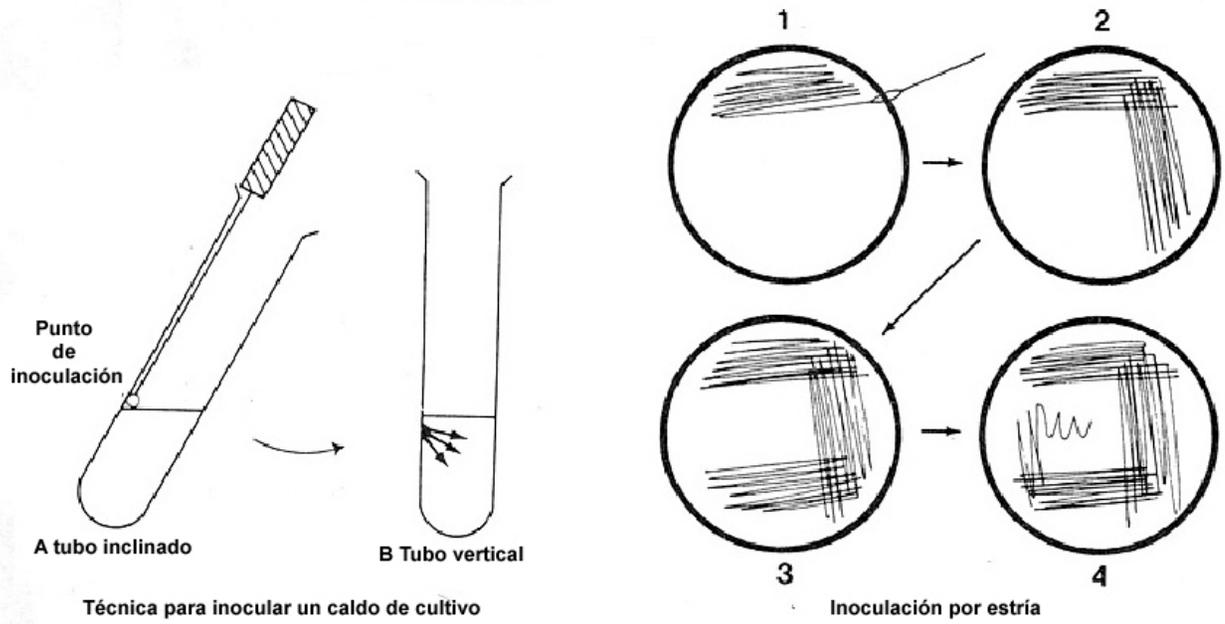
ANEXO 1
TÉCNICA PARA UTILIZAR EL AUTOCLAVE:

Resumen de las instrucciones para el manejo del autoclave

1. Comprobar el nivel de agua y la carga
2. atornillar la tapa: apretar las tuercas por parejas diametralmente opuestas, de forma que la tapa encaje perfectamente sobre la arandela.
3. abrir la válvula de vapor y encender el gas.
4. una vez que salga vapor por la válvula, esperar al menos 5 minutos para expulsar todo el aire y cerrar la válvula.
5. vigilar el manómetro y la válvula de seguridad. Cuando la válvula deje escapar vapor, comprobar la presión y disminuir la llama de gas o corriente.
6. dejar que actúe el tiempo requerido, cerrar el gas o desconectar.
7. esperar a que el manómetro descienda a cero y abrir entonces la llave de vapor.
8. esperar 5 minutos y abrir la tapa. Esperar algunos minutos antes de quitar la carga.

Para la esterilización de medios de cultivo de 107 a 121° C durante 10-15 minutos estás bien.

TÉCNICAS PARA INOCULACIÓN

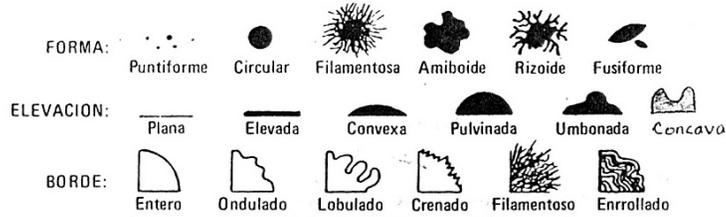


ANEXO 3

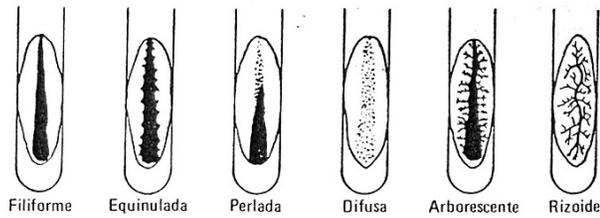
ESQUEMA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE UNA COLONIA

CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS DE BACTERIAS

COLONIAS

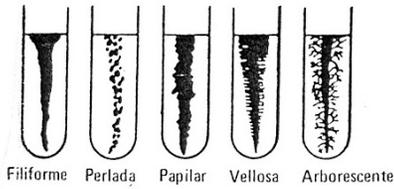


ESTRIA EN AGAR – FORMA DE CRECIMIENTO

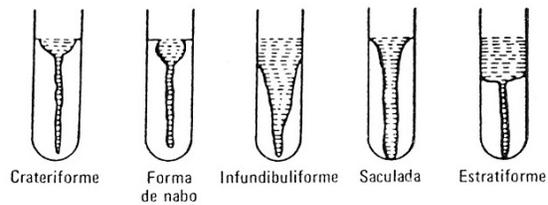


PICADURA EN GELATINA

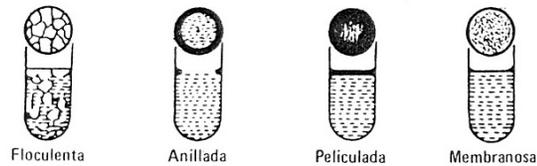
LINEA DE PICADURA:



LICUEFACCION:



CALDO DE NUTRIENTES – SUPERFICIE DE CRECIMIENTO

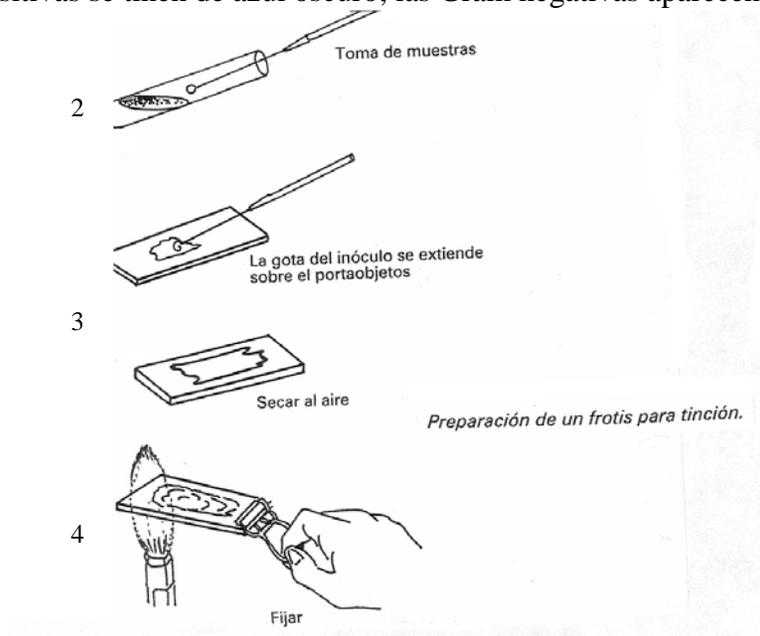


[Este esquema se debe a la cortesía de la American Society for Microbiology, Detroit, Michigan].

ANEXO 4

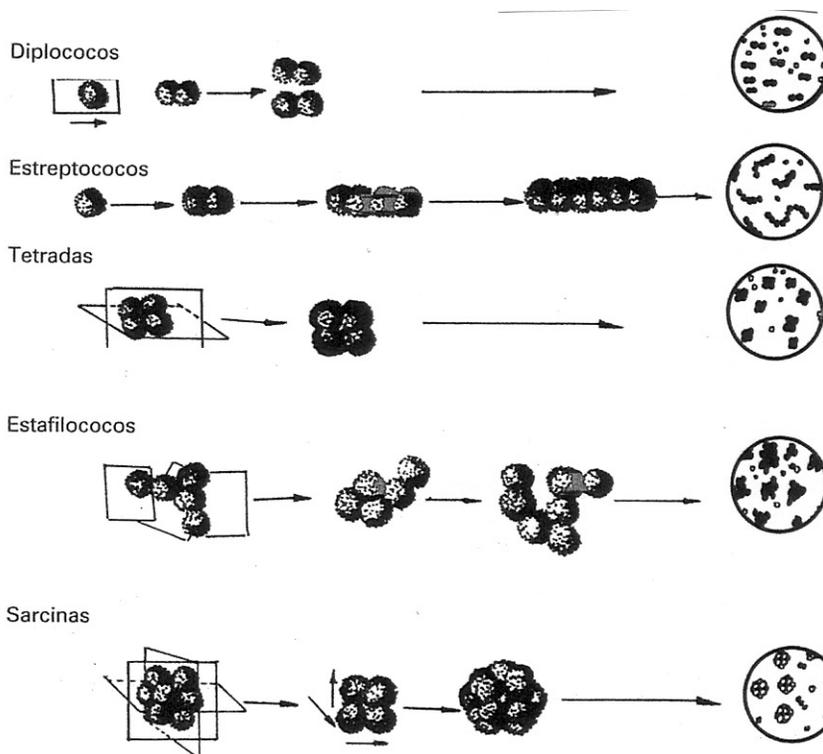
TÉCNICA DE LA TINCIÓN DE GRAM

1. Se flamea el asa
2. Toca el centro de la colonia a estudiar con el extremo de el asa
3. La porción de la colonia a examinar se emulsifica una gotita de agua o solución fisiológica en un portaobjeto para dispersar las células bacterianas, permitir que se seque al aire.
4. Fijar el material al portaobjeto, pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama de un mechero de Bunsen, de modo que el material no se lave durante el procedimiento de tinción.
5. Colocar el extendido en una bandeja para teñido, y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
6. Después de 1 minuto (con algunas soluciones puede emplearse menos tiempo) de exposición al colorante cristal violeta, lavar minuciosamente con agua destilada o buffer.
7. Cubrir el extendido con la solución de yodo para Gram durante 1 minuto. Lavar nuevamente con agua.
8. Sostener el extendido entre el pulgar y el índice, y cubrir la superficie con unas pocas gotas del decolorante alcohol acetona, hasta que no se arrastre más violeta. Esto lleva usualmente 10 segundos o menos.
9. Lavar con agua corriente y volver a ubicar el extendido sobre la bandeja de tinción. Colocar sobre la superficie safranina de contraste durante 1 minuto. Lavar con agua corriente.
10. Ubicar el extendido en posición vertical en una bandeja de tinción, permitiendo que se escurra el exceso de agua y el extendido se seque.
11. Examinar el extendido bajo un objetivo de inmersión X100 (aceite de inmersión). Las bacterias Gram positivas se tiñen de azul oscuro; las Gram negativas aparecen rosa pálidas.

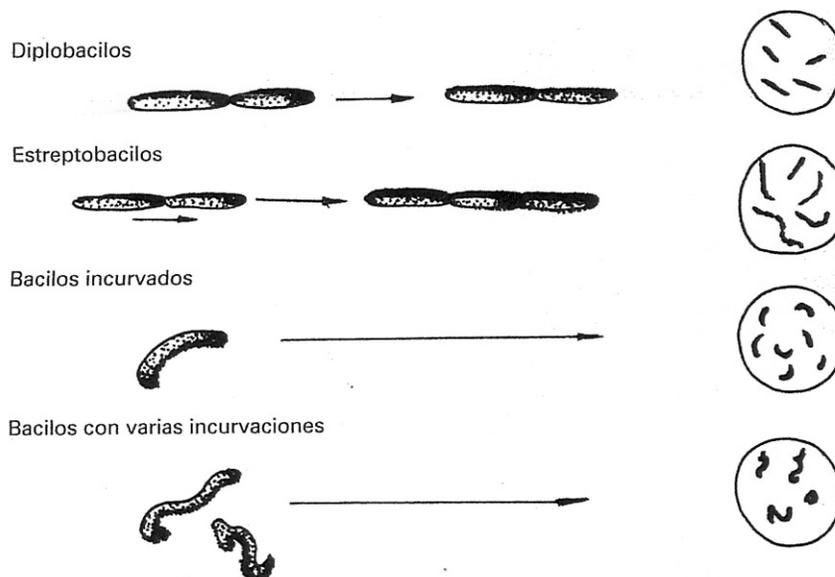


ANEXO 5

AGRUPACIONES DE TIPO BACTERIANO



Agrupaciones de tipo cocoideo.



Agrupaciones de tipo bacilar.

PRÁCTICA No. 8 OBSERVACIÓN DE ALGAS PROCARIOTAS

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias (anteriormente conocidas como algas verde-azules o cianofitas) son un grupo natural de procariotas muy antiguos. Su registro fósil se remonta al Precámbrico (estromatolitos) y son responsables del cambio de la atmósfera primitiva al incrementar el oxígeno.

Carecen de núcleo verdadero y otros organelos de doble membrana y es en el citoplasma donde se localiza el material genético o ADN dispuesto en fibrillas asociados a los cuerpos poliédricos, los cuales contienen carboxisomas que fijan el dióxido de carbono. Son fotosintéticas, presentan clorofila **a**, carotenos y xantofilas contenidos en lamelas o tilacoides, además, ficobiliproteínas en gránulos o ficobilosomas asociados a los tilacoides.

Existen otras algas procariotas, las proclorofitas a diferencia de las cianofitas, éstas contienen clorofila a y b pero no contienen ficobilinas. Desde el punto de vista evolutivo, ambas están relacionadas (Madigan, *et al.*, 2006).

La pared celular de las cianofitas es similar a las bacterias Gram negativas, lo que indica la posible relación entre ellas, está formada por peptidoglicanos o mureínas (glicopéptidos, mucopéptidos) y diaminopimélico exclusivo de los procariotas. Las células están rodeadas por un mucílago o vaina que las protege contra la desecación, está compuesta de azúcares neutros galactosa, glucosa, manosa, rhamnosa, 2-O-metil-D-xilosa, ácido glucurónico y galacturónico, también puede contener proteínas y fosfatos (Lee, 1999).

La reproducción es principalmente asexual o vegetativa mediante la producción de: nanocistes, endosporas, exosporas, hormogonios y hormocistes. Existen dos formas de intercambio genético, llamado parasexualidad: transducción y conjugación.

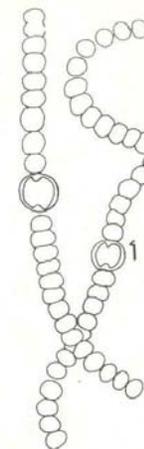
En la actualidad se han descrito unas 2000 especies, en cinco órdenes: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales y Stigonematales. Para su clasificación se consideran aspectos fisiológicos, reproductivos, morfológicos y hábitat.

Las cianofitas son unicelulares, coloniales, filamentosas y parénquimas simples (Fig. 1). Son acuáticas: agua dulce, salobres marinas y de ambiente terrestre (Hoeck C. van den *et al.*, 1995).

Las aguas que contienen Fósforo, CO₂, Nitrógeno e incremento de temperatura propician el crecimiento de cianobacterias potencialmente

toxicas, entre ellas: *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Calothrix*, *Merismopedia*, y *Leptolyngbya* (ver anexo 1).

Fig. 1 *Nostoc*
(filamento con heterocistos)



OBJETIVO GENERAL

Observar la morfología y reconocer los niveles de organización de las cianobacterias

OBJETIVOS PARTICULARES:

Elaborar preparaciones en fresco y semipermanentes con gelatina glicerinada

Reconocer caracteres morfológicos, células especializadas (heterocistes y acinetos)

Adquirir habilidad en el uso de claves para la determinación taxonómica

MATERIAL

Biológico

- Preparaciones semipermanentes de cianobacterias, muestras de agua (lago, arroyo, charca), muestra de lama.

Material diverso

- Agujas de disección
- Aceite de inmersión
- Pinzas de disección
- Franela
- Gelatina glicerinada
- Pipetas Pasteur
- Porta y cubreobjetos
- Caja Petri

Equipo:

- Microscopio compuesto de campo claro

PROCEDIMIENTO

1. Observar las preparaciones semipermanentes que sean proporcionadas por los profesores.

Elaboración de preparaciones en fresco:

a). Colocar sobre un portaobjetos una gota de la muestra de agua (usar pipeta Pasteur) y colocar un cubreobjetos. Observar.

2. La muestra de lama se disgrega con las agujas de disección en una gota de agua sobre un portaobjetos y colocar un cubreobjetos. Observar.

3. Reconocer los niveles de organización, células especializadas (heterocistes, acinetos), hormogonios, vaina y tricoma. (Anexo 1)

4. Elabore dibujos de lo que observa, indique el aumento, nombre de estructuras

5. Siga la clave para determinar los géneros observados

6. Las preparaciones que resulten interesantes, fijarlas con formol al 4% y montarlas con gelatina glicerinada. (Anexo 2)

7. Con la ayuda de bibliografía especializada elabore las diagnósticos de las especies observadas.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los niveles de organización presentes en cianofitas?
2. ¿Cuáles son las estructuras de una célula de cianofita?
3. ¿Cuál es la función de un acineto, heterociste y hormogonio?
4. ¿Qué es la vaina y qué formas presenta?
5. ¿Cuál es el habitat e importancia económica y ecológica de las cianofitas?

-Elabore un glosario de 20 términos en orden alfabético.

-Esquematice un diagrama clasificadorio con los dibujos de sus observaciones. Complemente con los dibujos del anexo 1 y algunos tomados de bibliografía (con especies no observadas).

BIBLIOGRAFÍA

1. Dawes, C. J. 1986. *Botánica Marina*. Ed. Limusa. México. México. 673 p.
2. Font Quer, P. 1985. *Diccionario de Botánica*. Ed. Labor. Barcelona. 1244 p.
3. Gaviño de la Torre G., Juárez C. y Figueroa H. 2005. *Técnicas Biológicas*. Selectas de Laboratorio y de Campo. Limusa. 308 p.
4. Graham, E. L. y Wilcox L. W. 2000. *Algae*. Prentice Hall . USA. 640 p.
5. Madigan T. M., Martinoko M. J. y Parker J. 2006. Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S. A. 1011 p.
6. Raven, H. P. , Evert R. F. y Eichhorn S. E. 2002. *Biology of plants*. W. H. Freeman and Company Worth
7. Hoeck, C. van den., Mann D. G. y Jahns H. M. 1995. *Algae. An introduction to Phycology*. Cambridge University Press, 623 p.
8. Lee, R. E. 1999. *Phycology*. Cambridge University Press USA, 614 p.
9. Ortega M. M. 1984. *Catálogo de algas continentales recientes de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 566 p.

ANEXO 1
Ejemplos de cianobacterias

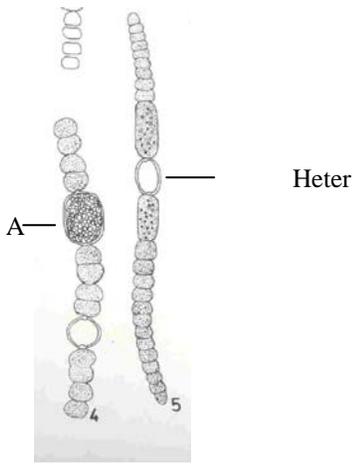


Fig. 2 *Anabaena sp.*
sp.

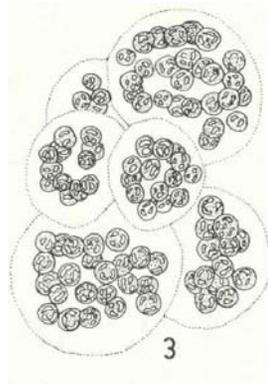


Fig. 3. *Microcystis sp.*



Fig. 4. *Phormidium*

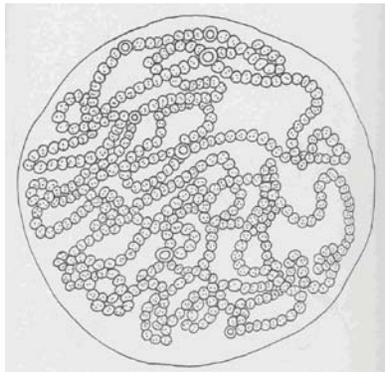


Fig. 5 *Nostoc sp.*



Fig. 6. *Lyngbya sp.*



Fig. 7 *Spirulina sp.*



Fig. 8 *Oscillatoria sp.*

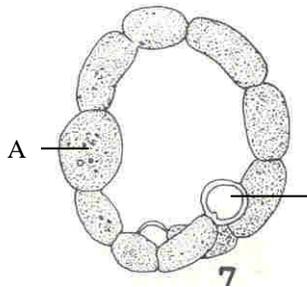


Fig. 9 *Anabaenopsis sp.*

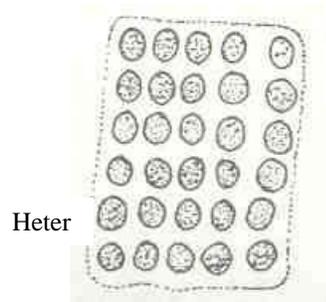


Fig. 10 *Merismopedia sp.*

(Figuras tomadas de Ortega, 1984)

ANEXO 2

Montaje de preparaciones

Gelatina glicerinada	
Gelatina en polvo	3.5 g
Agua destilada	21 ml
Glicerina	25 ml
Ácido fénico	1 g

Agregue agua a la gelatina, dejándola durante una a dos horas, y después la glicerina. Funda de inmediato la mezcla en baño maría, sin dejar de agitar. Una vez fundida, sáquela del frasco y agregue el ácido fénico. Filtre enseguida a través de un lienzo fino (Gaviño, 2005).

Elaboración de preparaciones:

1. Agregar sobre la muestra una o dos gotas de gelatina glicerinada, coloque un cubreobjetos y deje secar.

Solución fijadora (formol al 4%):

Formol	40 ml
Agua	960 ml

Nota: el agua debe ser de donde se obtuvieron las muestras algales

ANEXO 3. CLAVE PARA ALGAS PROCARIOTAS

1 a.- Células aisladas o formando colonias.....	<i>Chroococcus</i>
1 b.- Células formando filamentos uniseriados.....	2
2 a .- Sin heterocistos.....	3
2 b Con heterocistos.....	4
3 a .- Tricomas en espiral, sin que atraviesen la pared.....	<i>Spirulina</i>
3 b .- Tricomas raramente en espiral, multicelulares, pared de la célula apical ensanchada.....	<i>Oscillatoria</i>
3 c .- Un sólo tricoma dentro de la vaina, generalmente con una matriz gelatinosa.....	<i>Lyngbya</i>
4 a .- Células esféricas, tricomas dentro de o irregularmente con matriz gelatinosa.....	<i>Nostoc</i>
4 b .- Células isodiamétricas, con tricomas agregados en capas.....	<i>Anabaena</i>

PRÁCTICA No. 9 OBSERVACIÓN DE ALGAS EUCARIOTAS

INTRODUCCIÓN

Las algas están consideradas entre las talofitas (plantas que carecen de raíz, tallo y hojas). En su mayoría son fotosintéticas excepto las parásitas. Poseen clorofila a, principal pigmento fotosintético, además de carotenos y xantofilas. Comúnmente son acuáticas; agua dulce marinas y salobres, también las hay terrestres, algunas algas verdes se asocian con hongos para formas líquenes.

Las células de las algas eucariotas están rodeadas por una pared compuesta de celulosa o puede ser reemplazada por mannana, xilano o diferentes polímeros, además de polisacáridos, secretados por el Cuerpo de Golgi, la membrana plasmática es la responsable de controlar la entrada y salida de sustancias del protoplasma. Algunas especies presentan flagelos o undilopodios en células vegetativas y reproductivas para su locomoción. Los cloroplastos o cromoplastos están rodeados por dos, tres o cuatro membranas según el grupo. Los leucoplastos o amiloplastos son incoloros están adaptados al almacenamiento de material de reserva.

Las algas son unicelulares, coloniales, palmeloides, filamentosas, pseudoparenquimatosas, parenquimatosas y sifonales.

Su reproducción es asexual o vegetativa mediante; división celular, esporas, fragmentación. En la sexual, se diferencian gametos en células especializadas o gametangios.

En esta práctica se observarán ejemplares de algas verdes (División Chlorophyta), algas pardas (Clase Phaeophyceaea) y algas rojas (División Rhodophyta)



Fig. 1 *Tayloriella dictyurus* con cistocarpos

División Rhodophyta (algas rojas). El color rojo de estas algas se debe a la presencia de ficoeritrina en una mayor proporción que otros pigmentos ficobilícos (ficocianina y aloficocianina), también presentan clorofila a, carotenos y xantofilas.

Existen alrededor de 5500 especies, la mayoría son marinas, se les encuentra adheridas a diversos sustratos (plantas, algas, conchas, rocas, entre otros), algunas son parásitas y endosimbiontes. Tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis con un mínimo de luz incluso las marinas a profundidades mayores a 200 m.

La pared celular está constituida por celulosa, algunas especies presentan xilosa, manosa. En espacios intercelulares se forma un polímero sulfatado o galactano del que se extrae el agar y la carragenina, los cuales son usados para la preparación de geles. Por ejemplo el agar que tiene gran importancia en la investigación microbiológica. El agar se obtiene de varias especies de *Gelidium*, *Gracilaria* y *Pterocladia*. La carragenina es parecida al agar, es usado en la industria farmacéutica, textil y alimentaria por sus propiedades coloidales y como estabilizador de emulsiones y suspensiones. La carragenina se obtiene de *Chondrus crispus* y *Mastocarpus stellatus*, especies del género *Eucheuma* son cultivadas para la producción de este ficocoloide.

En el orden Corallinales, la pared celular tiene impregnaciones de cristales de calcita, estas algas calcificadas son abundantes en mares tropicales del mundo y contribuyen a la formación de arrecifes coralinos entre ellas se encuentran; *Lithothamnion*, *Lithophyllum* y *Jania*.

La reproducción es asexual mediante diferentes tipos de esporas y la sexual presentan ciclos de vida con alternancia de dos o tres fases.



Fig. 2 *Sargassum* sp.

Clase Phaeophyceae o (algas pardas).

Estas algas presentan clorofila a, c₁ y c₂, carotenos y xantofilas, la fucoxantina es la más importante y responsable de su color característico. El material de reserva es laminarina. No hay formas unicelulares ni coloniales, son principalmente filamentosos, pseudoparenquimatosos o parenquimatosos, por ejemplo *Sargassum* (Fig. 2). Esta clase comprende cerca de 2000 especies, la mayoría son marinas, se les encuentra en la zona intermareal hasta profundidades más de 120 m, sólo cuatro géneros se han reportado de agua dulce. La reproducción es asexual o vegetativa y sexual con dos tipos de ciclos de vida. La pared celular es de celulosa y un componente amorfo de ácido algínico y fucoidina, en algunas especies del género *Padina*, presentan carbonato de calcio en forma de cristales de aragonita en bandas concéntricas.

División Chlorophyta (algas verdes).

Estas algas presentan clorofila a y b semejante a la que se encuentra en las plantas terrestres, además de carotenos y xantofilas. El material de reserva es el almidón. Esta división comprende 8000 especies distribuidas en ambientes de agua dulce, marino y terrestre. Las formas unicelulares forman parte del plancton, mientras que las pluricelulares se encuentran formando parte del bentos. Las especies marinas son abundantes en la zona intermareal algunas adheridas a rocas por ejemplo: *Ulva* y *Enteromorpha*, que desarrollan estructuras de fijación como la célula basal en *Chaetomorpha*, estolones y rizoides en *Caulerpa* y bulbos en *Halimeda*. Otras especies crecen sobre tronco de árboles y suelo, algunas son simbiosis como *Trebouxia* que se asocia con hongos para formar líquenes. La pared celular es de celulosa u otros polisacáridos xilanos manosa entre otros.

La reproducción asexual por medio de zoosporas, aplanosporas y autosporas. En la sexual, se diferencian gametos de igual o diferente forma y tamaño, además se presentan tres diferentes tipos de ciclos de vida.



Fig. 3 *Chaetomorpha antennina*

OBJETIVO GENERAL

El alumno adquirirá la habilidad de reconocer caracteres vegetativos y reproductivos de Rhodophyta (algas rojas), Phaeophyceae (algas pardas) y Chlorophyta (algas verdes). Así como la consulta de literatura especializada para la determinación taxonómica de especímenes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Reconocerá el hábito y caracteres externos
- Aprenderá a elaborar preparaciones en fresco y semipermanentes
- Realizará cortes en plano transversal y longitudinal o disgregación de talos para reconocer caracteres internos vegetativos y reproductivos
 - Distinguirá entre talos de organización filamentososa, parenquimatosa, sifonal y polisifonal
 - Conocerá diversas claves para la determinación taxonómica de los especímenes estudiados

MATERIAL

Biológico: Preparaciones semipermanentes de algas verdes, pardas y rojas, muestras de ejemplares fijados en formol.

Equipo:

- Microscopio compuesto de campo claro
- Estereoscopio

Material diverso

- Agujas de disección (2)
- Aceite de inmersión
- Pinzas de disección (1)
- Franela
- Gelatina glicerinada
- Pipetas Pasteur (1)

- Porta y cubreobjetos (5)
- Cajas petri (3)
- Navaja de afeitar (nueva)
- Charola de disección (1)
- Guantes de cirujano
- Cubre bocas
- Piseta

Reactivos

- Lugol
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

Esta práctica será dividida en tres etapas, las cuales se cubrirán en tres o cuatro sesiones, en la primera se observarán algas rojas, en la segunda algas pardas y en la tercera algas verdes.

Primera etapa: Rhodophyta (algas rojas)

1. Observará en preparaciones semipermanentes proporcionadas por el profesor, caracteres vegetativos y reproductivos

2. Coloque en una charola de disección los ejemplares fijados en formol, agregue un poco de agua, extienda con las agujas de disección desde la base del talo hacia los extremos de las ramas (en caso de presentarlas), para observar el hábito

3. Elabore dibujos del hábito de cada uno de ellos (forma del talo completo), así como estructuras vegetativas o reproductoras, en caso de presentarlos e indicar aumento

4. Para reconocer la estructura interna del talo, tome una muestra pequeña (0.5 cm) del eje principal o ramas del talo, realice cortes en sentido transversal y observe: la diferencia entre médula y corteza, tipos de cada una de ellas (parenquimatosa o filamentososa), estructuras reproductoras (tetrasporangios, cistocarpos, espermatangios, estiquidios, entre otros).

(Anexo 1)

5. En los talos con organización polisifónica, reconozca: células centrales y pericentrales, conexiones “pit” y reproductores en caso de presentarlos.

6. Compare talos calcificados con los no calcificados.

7. Con base en los caracteres observados, determinará taxonómica los ejemplares (Anexo 2)

Segunda etapa: División Heterokontophyta. Clase Phaeophyceae (algas pardas)

1. Observará en preparaciones semipermanentes proporcionadas por el profesor, caracteres vegetativos y reproductivos
2. Coloque en una charola de disección los ejemplares fijados en formol, agregue un poco de agua, extienda con las agujas de disección desde la base del talo hacia los extremos de las ramas en caso de presentarlas, para observar el hábito
3. Elabore los dibujos del hábito de cada uno de ellos (forma del talo completo), así como estructuras vegetativas o reproductoras, indicar aumento.
4. En el caso de talos filamentosos, desprender un fragmento del talo, disgregarlo y colocarlo sobre un portaobjetos, agregar una gota de agua, observe: tipo de ramificación, zonas de crecimiento, forma de cloroplasto, plurangios y meiosporangios
5. Para otros tipos de talos, tome una pequeña muestra y proceda a realizar cortes en sentido transversal, agregue una gota de agua coloque un cubreobjeto, observe: médula y corteza así como estructuras reproductoras, indique ¿de que tipo son?
6. En talos foliosos observe: forma de las hojas, ramas fértiles (receptáculo), en caso de presentarlos y haga cortes en sentido transversal para observar conceptáculos. (Anexo 3)
7. Con base en los caracteres observados, determinará taxonómica los ejemplares. (Anexo 4)
8. Tome una muestra de suelo de jardín o maceta para observar Diatomeas. (Anexo 8 y 8 b)

Tercera etapa: Chlorophyta (algas verdes)

1. Observará en preparaciones semipermanentes proporcionadas por el profesor, caracteres vegetativos y reproductivos
2. Coloque en una charola de disección, los ejemplares fijados en formol, agregue un poco de agua, extienda con las agujas de disección desde la base del talo hacia los extremos de las ramas en caso de presentarlas, para observar el hábito
3. Elabore los dibujos del hábito de cada uno de ellos (forma del talo completo) así como estructuras, indique aumento.
4. En el caso de talos filamentosos, desprender un fragmento del filamento y colocarlo sobre un portaobjetos, agregar una gota de lugol y observe la disposición, forma de las células y cloroplastos.
5. Proceda a realizar cortes en plano transversal de talos laminares, para reconocer el número de capas celulares.
6. De los talos cenocíticos, tomar una muestra pequeña (0.5 cm), colocarlo sobre un portaobjeto, agregar una gota de agua destilada y lugol, proceda con las agujas de disección a disgregarlo, colocar un cubreobjeto y observe: cenocitos
7. Observe estructuras de una caroficea (talo, rámulas, núcula y glóbulo) (Anexo 5)
8. Con base en los caracteres observados, determinará taxonómica los ejemplares. (Anexo 6)
9. Actividad opcional: Observe muestras de agua de florero, charcas, lago, entre otros (Anexo 7 y 7b)

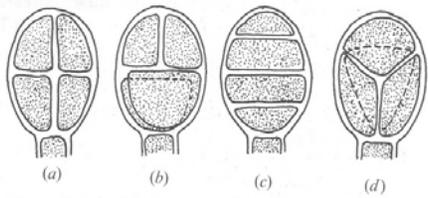
CUESTIONARIO

1. ¿En qué consiste la alternancia de fases?
2. Investigue sobre las estructuras reproductivas que se forman en un ciclo de vida trifásico ¿en qué división se presenta?
3. ¿Cuántos tipos de crecimiento se presentan en las algas pardas?
4. ¿Cuáles son las características generales de las carofíceas?
5. ¿Cuántas clases comprende la división Rhodophyta y cuales son las características más sobresalientes de cada una de ellas?
6. ¿Cuáles son las características generales de diatomeas?
-Elabore un glosario con 30 términos en orden alfabético

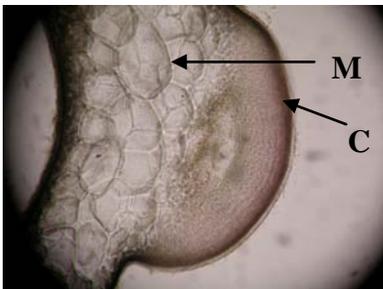
BIBLIOGRAFÍA

1. Cole, M. K. y Sheat R. G. 1990. *Biology of the red algae*. Cambridge University Press. New York. 517 p.
2. Dawes, C. J. 1986. *Botánica Marina*. Ed. Limusa. México. México. 673 p.
3. Font Quer, P. 1985. *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor. Barcelona. 1244 p.
4. González-González J. y Novelo-Maldonado E. 1986. Técnicas especiales de recolección y preparación de ejemplares de grupos selectos de plantas: *Algas*. En Lot A. y Chiang F. (eds.) Manual de herbario. Consejo Nacional de la Flora de México. A. C. México, D. F. , p. 46-54
5. Graham E. L. y Wilcox L. W. 2000. *Algae*. Prentice Hall . USA. 640 p
6. Hoeck, C. van den., Mann D. G. y Jahns H. M. 1995. *Algae. An introduction to Phycology*. Cambridge University Press, 623 p.
7. Lee, R. E. 1999. *Phycology*. Cambridge University Press USA, 614 p.
8. Littler S. D. y Littler . M. M. 2000. *Caribbean Reef Plants. An Identification guide to the reef Plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico*. Off Shore Graphics, INC. Washington, U. S. A., 542 p.
9. Ortega M. M. 1984. *Catálogo de algas continentales recientes de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 566 p.
10. Ortega, M. M., Godínez J. L. y Ruvalcaba M. M. 1993. *Una clave de campo de las algas pardas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe*. AGT Editor, México. 42 p.

ANEXO 1. Estructuras de algas rojas (Rhodophyta)

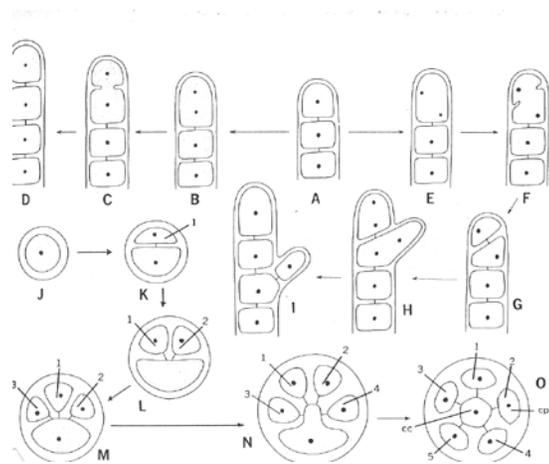


Tipos de tetrasporangio a) cruzado, b) decusado, c) zonado, d) tetraédrico

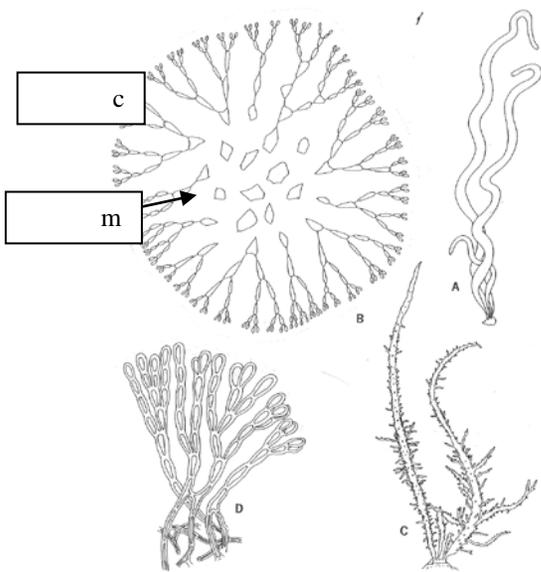


Talo con médula (m) y corteza (c) parenquimatoso

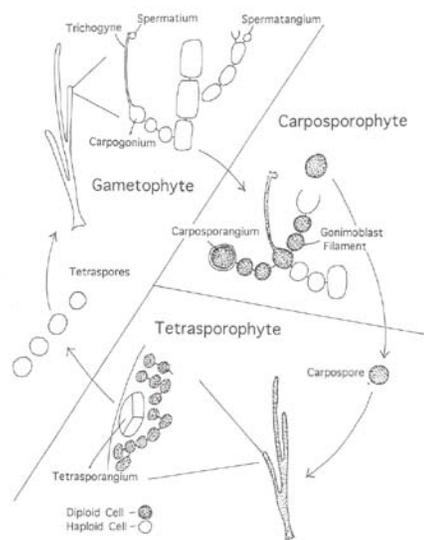
Cistocarpos



Talo polisifónico



Nemalion. Médula (m) y corteza (c) filamentosa

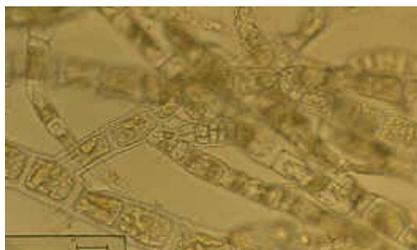


Ciclo trifásico

ANEXO 2 . Clave para la determinación taxonómica de algas rojas

1a Talo filamentosos.....	2
1b Talo de otra forma (cilíndrico, polisifónico, parenquimático).....	7
2a Talo corticado.....	5
2b Talo sin corticación.....	3
3a Talo epífito erecto.....	4
3b Talo epífito postrado, con ramas erectas irregulares.....	<i>Lejolisia</i>
4a Talo con células más anchas que largas.....	<i>Erythrotrichia</i>
4b Talo con células más largas que anchas.....	<i>Acrochaetium</i>
5a Talo totalmente corticado, espinas verticiladas a nivel denudo.....	<i>Centroceras</i>
5b Talo parcialmente corticado (ramas,ejes o nudos).....	6
6a Talo con corticación sólo en nudos.....	<i>Ceramium</i>
6b Talo con corticación en ramas y ejes.....	<i>Pleonosporium</i>
7a Talo calcificado.....	8
7b Talo no calcificado.....	9
8a Talo con genículas e intergenículas de 2 mm de diámetro y tallas de hasta 5 cm.....	<i>Amphiroa</i>
8b Talo con genículas e intergenículas con un diametro menor a 2mm y tallas de 1-2.5 cm.....	<i>Jania</i>
9a Talo monosifónico o polisifónico.....	10
9b Talo parenquimatoso.....	16
10a Talo monosifónico.....	11
10b Talo polisifónico.....	12
11a Talo con ejes monosifónico y ápices curvados.....	<i>Antithamnionella</i>
11b Talo con ramas monosifónicas y sin apices curvados.....	<i>Heterosiphonia</i>
12a Talo polisifónico con arreglo superficial de células.....	13
12b Talo polisifónico sin arreglo superficial de células.....	<i>Chondria</i>
13a Talo polisifónico de 4 células pericentrales.....	14
13b Talo polisifónico de 9-12 células pericentrales.....	15
14a Talo postrado; ramas liguladas, con una línea media.....	<i>Platysiphonia</i>
14b Talo erecto, con algunas porciones postradas, ramas erectas.....	<i>Polysiphonia</i>
15a Talo sáxicola; de 9-12 células pericentrales, ramas curvadas, con tricoblastos.....	<i>Tayloriella</i>
15b Talo epífito; de 10 -12 células pericentrales y ramas erectas, determinadas e indeterminadas con o sin tricoblastos.....	<i>Herposiphonia</i>
16a Talo con médula filamentososa	17
16b Talo con médula parenquimática.....	18
17a Talo con corteza de filamentos subdicotómicos, rodeadas de abundante mucílago y médula con filamentos no esparcidos.....	<i>Dermonema</i>
17b Talo con corteza de filamentos anastomosados, sin mucílago y médula con filamentos esparcidos entremezclados.....	<i>Grateloupia</i>
18a Talo rosado, formando matas, ramas cilíndricas con depresiones en sus ápices.....	<i>Laurencia</i>
18b Talo de color verde claro o rosado, frondoso o cespitoso, ramas complanadas, sin depresiones en ápice.....	19
19a Talo cespitoso, rosado; médula incolora parenquimatososa con células grandes y corteza con células pequeñas pigmentadas que no forman hileras.....	<i>Hypnea</i>
19b Talo no cespitoso, que forma frondas, de color verde claro, médula con células pequeñas y corteza con células que forman varias hileras de 4-12 capas, en posición anticlinal.....	20
20a Talo firme y rígido, de color verde claro, con médula parenquimatososa con células de pequeñas a grandes y corteza de células muy pequeñas en líneas anticlinales que forman 4-5 hileras.....	<i>Gymnogongrus</i>
20b Talo rígido, con médula compuesta por células grandes, isodiamétricas y corteza con células pequeñas ovoides de 2-12 capas celulares en posición anticlinal.....	<i>Gracilaria</i>

ANEXO 3. Estructuras de algas pardas (Phaeophyceae)



Hincksia sp. Talo filamentoso



Talo folioso *Sargassum* sp.



Padina sp. Talo laminar



Corte de un conceptáculo

ANEXO 4. Clave para la determinación taxonómica de algas pardas

Div. Heterokontophyta

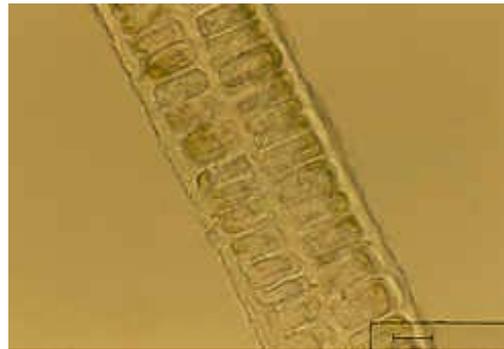
Clase Phaeophyceae

- 1a. Talo filamentoso2
- 1b. Talo de otra forma (laminar, acintado, parenquimático)3
- 2a. Formando densos penachos, ramas agudas, plurangios pluriloculares, cloroplastos en forma de banda*Ectocarpus*
- 2b. Formando densos penachos, ramas agudas o curvas, plurangios pluriloculares, cloroplastos en forma discoidal.....*Hincksia*
- 2c. Formando pequeñas matas, ramas redondeadas, con propágulos.....*Sphacelaria*
- 3a. Talo laminar parenquimático.....6
- 3b. Talo acintado.....4
- 4a. Talo con nervadura central.....*Dictyopteris*
- 4b. Talo sin nervadura central.....5
- 5a. Talo de 2-4 células de grosor.....*Dictyota*
- 5b. Talo con más de 4 células de grosor.....*Spatoglossum*
- 6a. Talo laminar plano en forma de abanico.....*Padina*
- 6b. Talo frondoso.....7
- 7a. Talo con ramas subcilíndricas poco comprimidas al ápice.....*Chnoospora*
- 7b. Talo folioso con márgenes aserrados y acuminados.....*Sargassum*

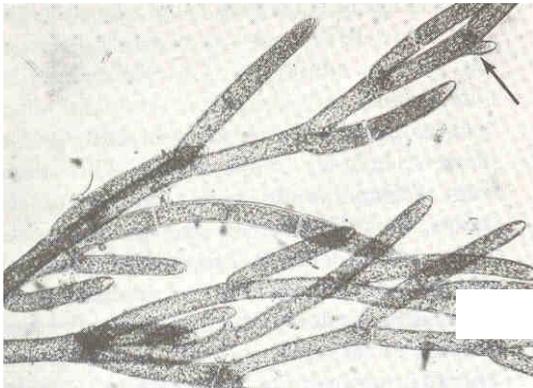
ANEXO 5 . Estructuras de algas verdes (Chlorophyta)



Talo laminar, género *Ulva* sp. Foto A. Avila



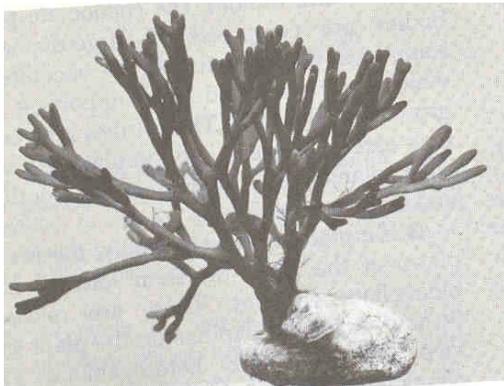
Corte longitudinal de la lámina, *Ulva* sp. Foto I. Escalante



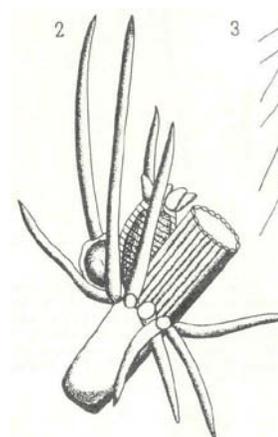
Talos cenocíticos a) *Cladophora* sp.,



b) *Caulerpa* sp.,



c) *Codium* sp



Talo pseudoparenquimatoso *Chara* sp

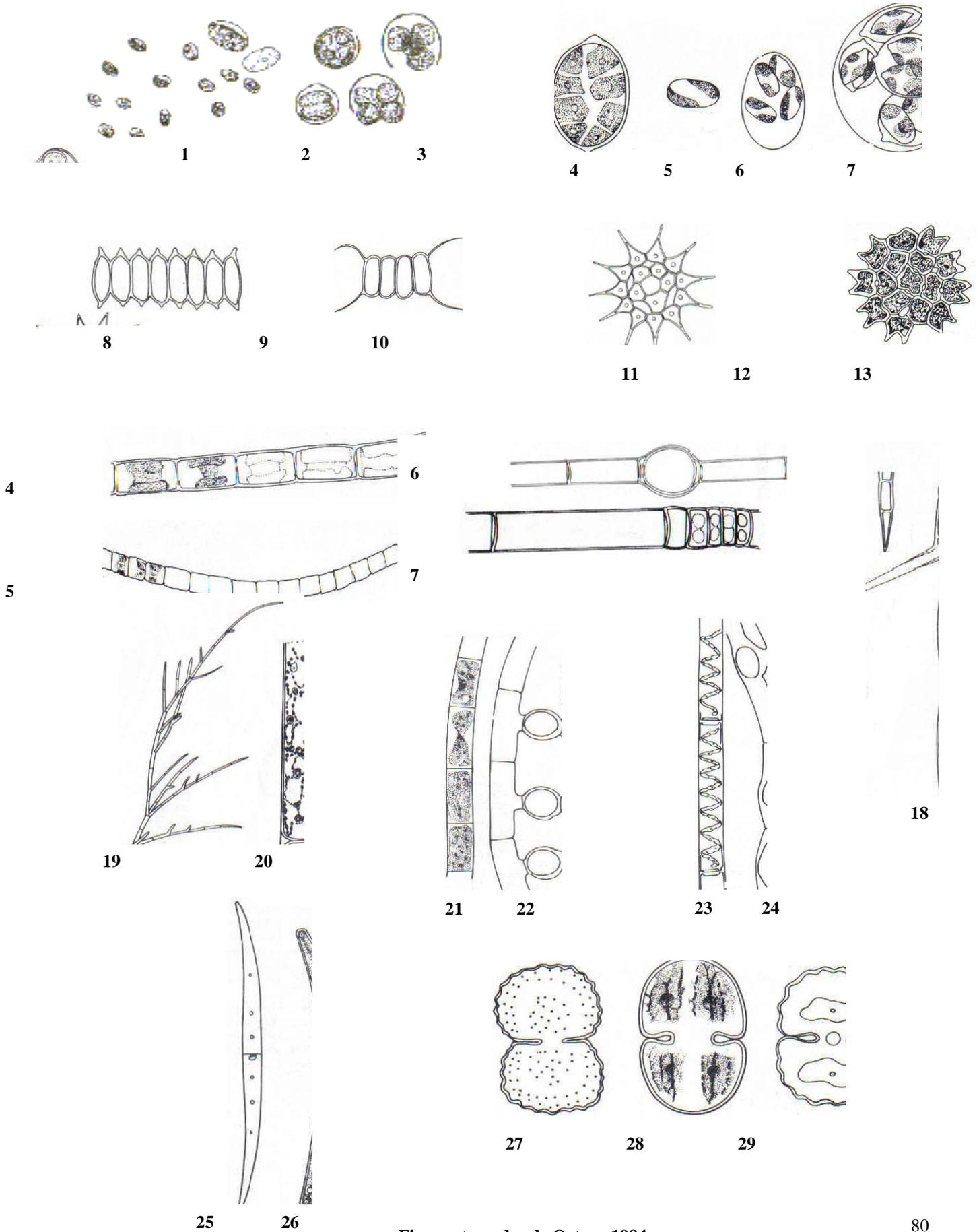
Algunas de estas imágenes fueron tomadas de los textos citados en la bibliografía

ANEXO 6. Clave para la determinación taxonómica de algas verdes

Div. Chlorophyta

1a. Talo filamentoso.....	2
1b. Talo de otra forma.....	3
2a. Talo filamentoso ramificado.....	<i>Cladophora</i>
2b. Talo no ramificado.....	<i>Chaetomorpha</i>
3a. Talo cenocítico.....	4
3b. Talo no cenocítico.....	5
4a. Talo cenocítico con trabéculas.....	<i>Caulerpa</i>
4b. Talo cenocítico sin trabéculas.....	<i>Bryopsis</i>
5a. Talo cenocítico hueco.....	6
5b. Talo cenocítico pseudoparenquimático.....	<i>Codium</i>
6a. Talo monostromático.....	<i>Enteromorpha</i>
6b. Talo distromático membranoso.....	<i>Ulva</i>

ANEXO 7. Algas verdes de cuerpos de agua continentales

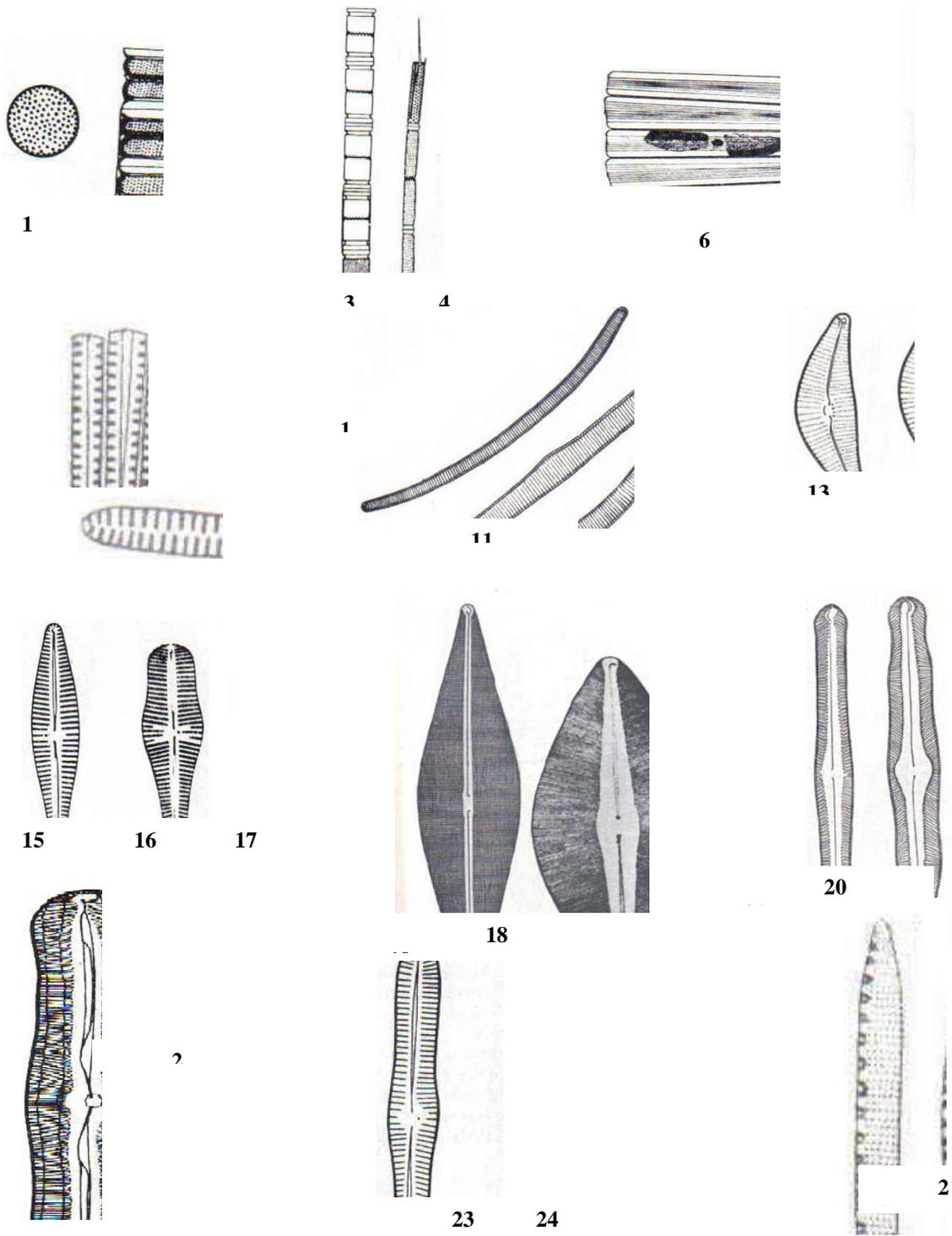


Figuras tomadas de Ortega 1984

ANEXO 7b. Pie de figuras

- Fig. 1. *Chlorella miniata* (Kützing) Oltmanns (según Oltmanns).
Figs. 2, 3. *Chlorella saccharophilla* var. *ellipsoidea* (Gerneck) Fott et Nováková in Fott.
Fig. 4. *Oocystis solitaria* Wittrock in Wittrock et Nordstedt.
Figs. 5, 6. *Oocystis pusilla* Hansgirg. **5**: célula aislada, **6**: colonia.
Fig. 7. *Oocystis lacustris* Chodat.
Fig. 8. *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing.
Fig. 9. *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina* (Chodat) G.M. Smith.
Fig. 10. *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing.
Fig. 11. *Pediastrum simplex* var. *duodenarium* (Bailey) Rabenhorst
Fig. 12. *Pediastrum duplex* var. *reticulatum* Lagerheim
Fig. 13. *Pediastrum heptactis* (Ehrenberg) Meneghini.
Fig. 14. *Ulothrix aequalis* Kützing.
Fig. 15. *Ulothrix tenerrima* (Kützing) Kützing.
Fig. 16. *Oedogonium oboviforme* Wittrock ex Hirn. Filamento con oogonio.
Fig. 17. *Oedogonium landsboroughii* Hirn. Filamento con anteridios.
Fig. 18. *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing.
Figs. 19, 20. *Cladophora glomerata* (Linnaeus) Kützing var. *kuetzingiana* (Grunow) **19**: porción del talo, **20**: estructura de la célula.
Figs. 21, 22. *Mougeotia scalaris* Hassall.
Figs. 23, 24. *Spirogyra weberi* Kützing
Fig. 25. *Closterium subulatum* Brébisson.
Fig. 26. *Closterium striolatum* var. *subtruncatum* (W. West et G.S. West) Krieger In Rabenhorst.
Fig. 27. *Cosmarium subcrenatum* Hantzsch in Rabenhorst.
Fig. 28. *Cosmarium subcucumis* Schmidle.
Fig. 29. *Cosmarium undulatum* Corda ex Ralfs var. *undulatum*

ANEXO 8. Diatomeas



Figuras tomadas de Ortega 1984

ANEXO 8b. Pie de figuras

- Fig. 1 -2 *Melosira distans* (Ehrenberg) Kützing. Vista valvar. **2** colonia en vista
conectiva
- Fig. 3. *Melosira ambigua* (Grunow) O. Müller.
- Fig. 4. *Melosira granulata* (Ehrenberg) Ralfs var. *angustissima* O. Müller
- Fig. 5. *Melosira granulata* (Ehrenberg) Ralfs var. *curvata* Grunow
- Fig. 6, 7 *Fragilaria striatula* (J. E. Smith) Lyngbye. **6.** colonia en vista conectiva. **7**
vista valvar.
- Fig. 8, 9 *Fragilaria pinnata* Ehrenberg. Colonia en vista conectiva. 9. vista valvar.
- Fig. 10. *Eunotia lunares* (Ehrenberg) Grunow.
- Fig. 11. *Eunotia formica* Ehrenberg .
- Fig. 12. *Eunotia arcus* Ehrenberg
- Fig. 13. *Cymbella cistula* (Ehrenberg) in Hemprich et Ehrenberg.
- Fig. 14. *Cymbella cistula* var. *maculate* (Kützing) Grunow in A. Schmidt.
- Fig. 15. *Gomphonema subclavatum* var. *mexicanum* (Grunow) Patrick in Hon
- Fig. 16. *Gomphonema truncatum* Ehrenberg var. *capitatum* (Ehrenberg) Patrick.
- Fig. 17. *Navicula cuspidate* (Kützing) Kützing.
- Fig. 18. *Navicula dorenbergii* Reichelt.
- Fig. 19. *Pinnularia cardinalicuslus* Cleve
- Fig. 20. *Pinnularia gibba* (Ehrenberg) Ehrenberg
- Fig. 21. *Pinnularia nobillis* (Ehrenberg) Ehrenberg
- Fig. 22 *Gomphonema lungiceps* Ehrenberg
- Figs. 23. *Gomphonema subclavatum* Grunow in Van Heurck var. *subclavatum*.
- Fig. 24. *Nitzschia amphibian* Grunow

PRÁCTICA 10

OBSERVACIÓN Y MANEJO DE HONGOS FALSOS Y VERDADEROS

INTRODUCCIÓN

Los hongos en un sentido amplio abarcan varios grupos eucariotas filogenéticamente diferentes⁶ conjuntados por presentar una fase “vegetal”, es decir, sésil con pared celular y reproducción por esporas.

Los hongos falsos se dividen en:

1. Hongos mucilaginosos: **Acrasiomicetos, Protosteliomicetos, Mixomicetos y Plasmodioforomicetos**⁷. Los tres primeros grupos son de vida libre y el último es parásito de plantas. Su nutrición es holozoica (por ingestión) y forman fases somáticas o vegetativas sin pared celular y de movimiento ameboso. Las fases reproductivas asexuales sí presentan pared de celulosa, queratina o un polímero de galactosamina. El talo de los acrasiomycetos es un pseudoplasmodio, agregación de mixamebas no fusionadas (conservan su individualidad) pero funcionan en conjunto. Los mixomicetos, protosteliomicetos y plasmodioforomicetos presentan un plasmodio, talo multinucleado (cenocítico) producto de la fusión total de mixamebas o mixozoosporas (que pueden funcionar como gametos). Las esporas se pueden formar directamente de la mixameba; solas dentro de sorocarpos o mezcladas con finos filamentos (capilicio) dentro de esporangios. El esporangio puede diferenciarse directamente del plasmodio conservando su forma reticulada (plasmodiocarpo). Un conjunto de esporangios puede compactarse conservando su individualidad (pseudoetelio) o cubrirse parcial o totalmente con un peridio (etelio). El plasmodio de los mixomicetos puede transformarse en un esclerocio, al deshidratarse y formar una estructura coriácea de resistencia.

2. Hongos acuáticos o ficomicetos⁸: **Quitridiomycetos, Hifoquitridiomycetos, Oomicetos y Cigomicetos**. Su nutrición es por absorción, presentan talo unicelular o filamentoso, en este caso son hifas cenocíticas con paredes celulares de quitina y/o celulosa y otros polímeros (quitosana y glucana). Presentan rizoides, rizomicelio y/o haustorios o bien una base de fijación. Reproducción asexual por esporas en esporangios (zoosporas o aplanosporas) y la reproducción sexual es por somatogamia o bien isogamia y anisogamia (planogametos o gametangios) u oogamia (anterozoide/oogonio o anteridio/oogonio). Forman elementos de resistencia (oosporas o cigosporas). Las células flageladas varían según el grupo: uno solo sea liso u ornamentado (quitridio- e hifoquitridio- respectivamente) o un par: un flagelo liso y el otro ornamentado (oomicetos). Los cigomicetos no presentan células flageladas.

Los hongos verdaderos son unicelulares (levaduriformes) o filamentosos (hifas septadas; septos con poros simples o doliporos) con paredes de quitina, hemicelulosa y lípidos o celulosa, quitosana y otros polímeros. Secretan enzimas degradadoras para absorber los nutrientes (heterótrofos por absorción). Tienen reproducción sexual y asexual por esporas. No presentan flagelos.

⁶ Agrupados dentro del Dominio Eucarya.

⁷ Son fitoendoparásitos y se nutren por ósmosis.

⁸ Agrupados así bajo una perspectiva tradicional debido a su morfología y hábitat. Actualmente los quitridiomycetos y los cigomicetos forman parte de los hongos verdaderos en el Reino Fungi y a los oomicetos se les reagrupa junto con los heterocontos (algas pardas y afines) dentro del Reino Protoctista *sensu* Margulis.

Ascomicetos. Levaduras o con micelio septado, forman conidios asexualmente en diversas estructuras y sexualmente ascosporas (endosporas) dentro de ascas. Forman esporomas pluricelulares (ascomas) cerrados (cleistotecio) o abiertos (peritecio o apotecio).

Basidiomicetos. Hifas septadas, presentan conexiones de grapa (fíbulas). Asexualmente forman conidios y sexualmente basidiosporas sobre basidios septados (Fragmobasidiomicetos) aseptados (Holobasidiomicetos). Pueden formar esporomas (basidiomas) pluricelulares con himenio expuesto (Himenomicetos) o cerrado (Gasteromicetos).

Deuteromicetos.⁹ Hifas septadas, su reproducción es únicamente asexual por fragmentación o formación de conidios por gemación (blastoconidios) o diferenciación celular de las hifas (taloconidios). Los conidios pueden formarse sobre conidióforos o en diversas estructuras: acérvulos, esporodoquios, sinemas, picnidios.

De amplia distribución son saprobios importantes en los ecosistemas. Pueden ser parásitos o simbiontes exitosos como las micorrizas y los líquenes. Son dañinos por atacar sustratos diversos (madera, papel, cuero y alimentos) y ser patógenos (muchas veces letales) tanto para nosotros como para vegetales y animales de importancia económica. Empleados en estudios de índole diversa (Ecología, Genética, Fisiología, Biología Molecular). Usos: alimentación; producción industrial de ácido cítrico, acético; enzimas y antibióticos entre otros.

OBJETIVO GENERAL

El alumno adquirirá la habilidad de reconocer caracteres vegetativos y reproductivos de Mixomicetos, Quitridiomicetos, Oomicetos, Cigomicetos, Deuteromicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos así como las correspondientes técnicas de recolección y cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Reconocerá caracteres externos.

Aprenderá a elaborar preparaciones en fresco y semipermanentes.

Realizará cortes o disgregaciones de los talos para observar estructuras internas.

Distinguirá los diferentes niveles de organización de los talos.

Aprenderá a manejar claves para la determinación de los organismos.

MATERIAL

Biológico: Preparaciones permanentes y ejemplares de diferentes tipos de hongos. Ficomicetos, Asco y Basidiomicetos.

⁹ Grupo artificial formado sólo por la fase asexual (anamorfo) de algunas especies de Asco y Basidiomicetes cuya fase sexual (telomorfo) se desconoce (o en su momento se desconocía).

Equipo

- Microscopio Estereoscópico
- Microscopio Compuesto

Reactivos o sustancias

- Aceite de inmersión
- Agar base o nutritivo
- Agua destilada
- Azul de metileno
- Gelatina glicerinada

Instrumental

- Agujas de disección
- Cajas de Petri
- Cristalizador
- Frascos de vidrio 250 ml con tapa de
rosca
- Matraz 500 ml
- Navajas para rasurar de doble filo
- Paño para limpiar
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Papel seda
- Pipetas Pasteur
- Porta y cubre objetos

Material diverso

- Carnadas: (semillas de ajonjolí, maíz crudo, frutos pequeños de rosáceas (piracanto); epidermis de cebolla, polen, papel para limpiar anteojos, cuerda de henequén o celofán; exoesqueleto de camarón, diversos insectos (moscas, abejas, grillos); uñas, cabello o cuerno.
 - Harina de maíz.
 - Manzana.
 - Papas
 - Sustratos varios: tierra de hoja, agua de charco.

PARA RECOLECTA DE HONGOS

- Cajas blancas pequeñas de cartón
- Canasta
- Etiquetas de recolecta (ver apéndice
7)
- Marcador de cera
- Papel encerado
- Secadora con focos

PROCEDIMIENTO

Los acrasiomicetos

Obtención: pueden aislarse de tierra negra (de bosque, parcela o maceta).

Cultivo: conservar el sustrato en una cámara húmeda: se vacía un poco de la tierra ligeramente humedecido en una caja de Petri, cristalizador o frasco de vidrio y se tapa sin sellar, para permitir oxigenación. Se cubre con papel aluminio y se deja en un lugar sombreado por unos días.

Observación: al microscopio estereoscópico buscar sorocarpos, pequeñas estructuras hialinas a veces conectadas por finos filamentos con aspecto de telaraña. Pueden verse mixamebas recuperando los sorocarpos con una aguja de disección y revolviéndolos en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos. Ya con el cubreobjetos encima, se hace ligera presión con la goma de un lápiz para romperlos (squash). En caso de haber pseudoplasmodio observar el conjunto de mixamebas. Las preparaciones se pueden teñir con una gota de azul de metileno colocando una gota de éste a un lado del cubreobjetos y absorbiendo con papel absorbente un poco de agua del lado opuesto a la gota para que penetre en la preparación.

Los mixomicetos

Obtención: son un poco más difíciles de conseguir porque requieren zonas muy húmedas y generalmente sombreadas en el bosque (sobre troncos muertos o entre la corteza u hojarasca) o sobre madera (polines, cimbras) húmedos. Se conservan con un pedazo de sustrato (tierra, madera, hojarasca) dentro de una cámara húmeda que bien puede ser un frasco con algodón humedecido.

Cultivo: preparar y esterilizar agar-harina de maíz, agar papa-dextrosa, agar nutritivo o sólo agar base. (Ver anexo 8); llenar cajas Petri. En el momento de la preparación del agar aprovechar para esterilizar hojuelas de avena envueltas en papel aluminio. Una vez solidificado el agar en las cajas Petri, en la zona estéril de un par de mecheros o en una campana extractora se inocula un pedazo de sustrato con mixomiceto (plasmodio, plasmodiocarpo o esclerocio) y se colocan unas cuantas hojuelas de avena teñidas previamente con un poco con colorante vegetal. Pueden obtenerse también a partir de esporas, en cuyo caso se revuelven (con un asa de siembra o aguja de disección) uno o dos esporangios en unas gotas de agua destilada dentro de la caja de Petri. Se envuelven las cajas con papel aluminio y se dejan por unos días en una zona fresca.

Observación: al microscopio estereoscópico se podrán apreciar las venaciones del plasmodio y en su interior las corrientes citoplasmáticas evidentes por el movimiento de la avena coloreada. Para observar esporangios es necesario inducir su formación. Esto se logra exponiendo los plasmodios a la luz hasta que se formen unas agregaciones distintivas. La obtención de esclerocios se hace colocando una porción de plasmodio sobre papel filtro y se deja secar. Las mixamebas se pueden observar siguiendo el mismo procedimiento indicado para las mixamebas de los acrasiomicetos.

Quitridiomicetos, Oomicetos y Cigomicetos

Obtención: de manera directa recolectando un poco de agua de lagos, ríos, peceras sucias, charcos, agua de florero, o bien, tierra disuelta en un poco de agua destilada para evitar el rápido crecimiento de bacterias.

Cultivo:

1. Colocar el agua o la tierra dentro de un frasco de vidrio, cristalizador o caja de Petri y agregar las carnadas o cebos¹⁰. Las carnadas pueden ser de origen vegetal como semillas de ajonjolí, maíz crudo, frutos pequeños de rosáceas (piracanto), epidermis de cebolla, polen, papel para limpiar anteojos, cuerda de henequén o celofán. De origen animal como exoesqueleto de camarón o diversos insectos (moscas, abejas, grillos), uñas, cabello o cuerno. Es indispensable esterilizar la carnada utilizada para evitar la contaminación por otros hongos de crecimiento rápido como los deuteromicetos. Esto se logra sumergiendo rápidamente la carnada en agua hirviendo o un breve lavado de ésta en una disolución de cloro casero (3%). Las carnadas sirven de alimento para los hongos y además de promover su crecimiento facilitan la ubicación y observación de los ficomicetos (talos quitridiales¹¹ y/o los micelios).

2. Para estudios acuáticos locales los quitridiomicetos, oomicetos y cigomicetos pueden obtenerse en su habitat directamente mediante la colocación de una bolsa pequeña de carnada elaborada de tela con tejido abierto (semejante a la malla de mosquitero), se rellena de carnada y unas canicas para facilitar que se hunda. Después de una semana o más se recupera y analiza. El tiempo está en función de la temperatura, así, se recomienda que a unos 20°C se deje pasar una semana y si la temperatura es menor entonces se dejan más días.

3. En el caso de los organismos que vivan en el suelo se recomienda colocar el sustrato en cámara húmeda y cuando empiecen a propagarse los talos, hacer siembras y resiembras en cajas Petri con alguno de los medios de cultivo antes mencionados. Particularmente los oomicetos del suelo pueden cultivarse en una manzana ahuecada con un sacabocado y se rellena con sustrato húmedo. Se tapa el agujero con cinta adhesiva y en 3 o 4 días se observan pequeños pedazos de manzana (sobre todo los que presenten una pudrición café y seca).

4. En el caso de los cigomicetos se pueden conservar trozos de las tortillas, pan, harina, pastas o frutas en una cámara húmeda (frasco, caja Petri o bien, una bolsa de plástico ligeramente inflada). Revisar las colonias negruzcas. Otro sustrato interesante es el estiércol de vaca o caballo. Se deja en una cámara húmeda durante algunos días se debe revisar diariamente.

5. La obtención de cultivos puros. En el caso de los hongos acuáticos deben sembrarse en agua destilada con nueva carnada, hacer esto las veces necesarias. Para los demás pueden sembrarse y reseñarse en cajas de Petri ya sea con alguno de los medios descritos anteriormente (PDA, HMA, agar nutritivo) o buscar alguno especial según sea el objetivo del estudio.

¹⁰ Para facilidad de observación no revolver diferentes tipos de carnada ni ponerlas en exceso.

¹¹ Talos unicelulares de pared gruesa, hialinos, con un poro apical y rizomicelio basal. Son muy refringentes.

Observación: Se revisan las muestras en el microscopio estereoscópico y se realizan preparaciones para revisar en el microscopio compuesto. Si es necesario teñir con azul de metileno para contrastar los talos hialinos. Si los zoosporangios están maduros pueden observarse las zoosporas uniflageladas en el caso de los quitridiomycetos o biflageladas en los oomicetos. En el caso de los cigomicetos buscar gametangios jóvenes o maduros (protuberancias hifales cercanas entre sí o en franco contacto) y la formación de zigosporas cuya coloración oscura las hace fácilmente localizables. Otras características se mencionan en los respectivos géneros listados a continuación. Se recomienda colocar sólo un poco de muestra procurando no raspar en exceso el sustrato de donde se tome ésta, así observación será más fácil.

Quitridiomycetos (ver anexo 3)

Chytridium. Parásito de algas. Talo esférico muy refringente debido a su pared gruesa, operculado apicalmente (se nota como una protuberancia) y con rizoides basales. Si las zoosporas no han sido expulsadas su contenido es granuloso y opaco, de lo contrario se observará transparente. Se recomienda obtenerlo con carnada de polen de pino.

Chytriomycetes. Muy semejante al anterior pero éste es saprobio de agua dulce y crece sobre sustratos quitinosos. Forma rizomicelio. Obtenerlo con carnada de camarón o moscas.

Allomyces. Talo filamentoso septado (seudoseptos) y ramificado dicotómicamente; presenta rizoides basales. Sus esporangios son incoloros de pared delgada o moreno rojizos de pared gruesa y punteada. Los gametangios son anaranjados o incoloros. Estas características diferencian los gametotalos de los esporotalos.

Oomicetos (ver anexo 3)

Saprolegnia. Saprobios que sobre el sustrato lucen como una masa turbia y algodonosa a simple vista sobre restos animales o vegetales. Forma esporangios alargados que contienen zoosporas. Los oogonios son globosos, y según sea su maduración, pueden estar flanqueados o rodeados por anteridios que se observan como pequeñas ramificaciones. Si están maduros y han sido fertilizados se observarán oosporas en su interior. Se recomienda emplear moscas o semillas como carnadas.

Phytophthora. Micelio hialino, ramificado en más o menos en ángulos rectos; esporangióforos ramificados, esporangios hialinos con forma de limón con una papila apical y en la base un engrosamiento que fue parte del esporangióforo. Los oogonios son esféricos. Para su cultivo se recomienda particularmente la técnica de la manzana explicada anteriormente.

Cigomicetos (ver anexo 4):

Rhizopus. Las hifas presentan estolones arqueados, éstos en los puntos que hacen contacto con el sustrato tienen rizoides que los fijan y del lado contrario surgen erectos los esporangióforos. Los esporangios presentan una apófisis inconspicua y contienen numerosas esporas. Observe si hay ornamentación en las esporas y diferencie esporangios enteros de los que han perdido la pared esporangial. Se obtiene de sustratos como las tortillas, pan, harina, pastas o frutas.

Mucor. Micelio es sencillo que no forma estolones ni rizoides especiales; sus esporangióforos nacen en cualquier sitio del micelio, el esporangio contiene muchas esporas y

una columela de diversa forma que posee un aspecto vesicular y queda a la vista al romperse la pared esporangial. Se obtiene de los mismos sustratos que la especie anterior.

Pilobolus. Talos muy hialinos que tienen un esporangióforo erecto que en su parte apical se engrosa y forma una característica vesícula transparente que porta a su vez el esporangio negruzco. Por debajo de la vesícula se distingue una zona anaranjada que es fotosensible y desencadena un mecanismo de disparo que lanza al esporangio a más de un metro de distancia. Se obtiene a partir de estiércol fresco conservado un tiempo en cámara húmeda.

Entomophthora. Parásito de moscas presenta prolongaciones alargadas irregulares cenocíticas con septos apicales que separan al “conidióforo” que a su vez forma un “conidio” globoso que en realidad es un esporangio unisporado. Se pueden obtener a partir de moscas en cámara húmeda. Las moscas infectadas son poco activas, su abdomen brilla y tienen los ojos color rojo ladrillo.

Deuteromicetos.

Obtención y cultivo: se pueden aplicar algunas de las técnicas ya descritas para los ficomicetos a partir de los sustratos en donde se encuentren: tortillas, semillas, frutas, panes, quesos etc. Si se emplea la manzana ahuecada, es necesario esperar unos ocho días y poner especial atención a la pudrición blanda. Si se necesitan cultivos puros es necesario hacer siembras y resiembras en los medio apropiados

Rhodotorula. Talo unicelular, es decir es levaduriforme (levadura) que forma colonias cremosas de color rosado, anaranjado o rojizo. Puede formarseudomicelio. Se recomienda obtenerlo a partir de tortillas.

Aspergillus. El micelio forma colonias densas. Los conidióforos terminan en un hinchamiento o vesícula de la cual surge una hilera de fiálides (especies monoseriadas) o bien, una serie de métulas de las que salen las fiálides (especies biseriadas). Las fiálides generan los conidios que pueden ser hialinos o de colores claros. En conjunto forman la llamada cabeza conidial.

Penicillium. Sus colonias también presentan micelio denso. Los conidióforos y conidios son hialinos o de colores claros. Puede presentar terminaciones ramificadas simétricas o asimétricas de métulas y fiálides verticiladas en diferentes grados que forman cadenas de conidios secos que le dan apariencia de pincel.

Macromicetos recolecta y observación.

La recolecta de macromicetos (asco y basidiomicetos) requiere el ejemplar completo desde su base. Se envuelve en papel encerado en el que previamente se anotan con un marcador de cera los datos de sustrato, tipo de vegetación y número de recolecta. Es recomendable colocar el material en una canasta para permitir la circulación del aire (esto evita que se pudran) y de ser posible fotografiar cada ejemplar. Se anotan todas las características morfológicas (ver anexo 7) poniendo especial atención a las medidas del esporoma y los colores que presente. El ejemplar debe cortarse longitudinalmente para observar tamaño de contexto e inserción laminar o de tubos y otras características internas. La manera de conservarlos es deshidratándolos completamente en una secadora cuya fuente de calor la provean una serie de focos de 100 W. Posteriormente, ejemplar y etiqueta se guardan en cajitas blancas de tamaño apropiado y a éstas se les escriben los datos principales (nombre científico, recolector, fecha, estado, número de foto entre otros.).

Ascomicetos.

Para observar levaduras se recomienda hacer preparaciones de pulque en donde la más abundante es *Saccharomyces*.

Xylaria: hacer cortes del estroma peritecual para observar peritecios, ascas y ascosporas.

Helvella, *Morchella*, *Peziza*. Hacer cortes transversales de los apotecios para observar ascas con ascosporas. (ver anexo 5)

Basidiomicetos.

En el huitlacoche (*Ustilago maydis*) se pueden apreciar los llamados soros o agallas que contienen teliosporas oscuras y ornamentadas (observe las hifas con fíbulas).

En los hongos gelatinosos es posible apreciar fragmobasidios (*Auricularia* con septos transversales, *Tremella* con septos longitudinales). (ver anexo 6)

Observar diversos tipos de himenio: con poros (*Boletus*, *Polyporus*), venoso (*Gomphus*, *Cantharellus*), laminar (*Agaricus*, *Amanita*) o liso (*Ramaria*). En hongos con gleba ver capilicio -si está presente- y esporas. (*Lycoperdon*, *Scleroderma*)

Es fácil evidenciar holobasidios con basidiosporas en cualquiera de los ejemplares mencionados siempre y cuando estén maduros.

En el caso de *Russula* y *Lactarius* se puede acentuar la ornamentación de las esporas con solución de Melzer (anexos 6 y 8).

En ambos casos hacer uso de claves taxonómicas especializadas para determinar algunos ejemplares (ver bibliografía).

CUESTIONARIO

1. Dibuje el ciclo de vida de un mixomiceto, anote las condiciones naturales que requiere cada fase.
2. Dibuje y explique los diferentes tipos de talo presentes en los ficomicetos
3. Explique qué es un conidio y haga un cuadro comparativo de los diferentes tipos de conidios en los deuteromicetos.
4. Busque 15 ejemplos para cada caso: hongos de importancia industrial; hongos de importancia médica; hongos de importancia alimentaria.
5. Explique por qué los hongos forman un gran grupo artificial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexopoulos C. J. y Mims C. W. 1985. *Introducción a la Micología*. Omega, Barcelona, 638 p.
2. Bresinsky A. y Besl H. 1990. *A colour Atlas of poisonous fungi*. Wolfe Publishing Ltd. Londres. 245 p.
3. Bold H. C., Alexopoulos C. J. y Delevoryas T. 1980. *Morphology of plants and fungi*. 4a ed. Harper & Row, Nueva York, 819 p.
4. Delgado F. A., M. Villegas y J. Cifuentes. 2004. *Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar*. Facultad de Ciencias UNAM. 84 p.
5. Fassatióvá O. 1986. *Moulds and filamentous fungi in technological microbiology*. Progress in industrial microbiology. Vol. 22 Elsevier N. Y. 233 p.
6. Guzmán G. 1977. *Identificación de los hongos: comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de madera*. Limusa, México D. F. 236 p.
7. Herrera T. y Ulloa M. 1990. *El Reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica, México D. F. 550 p.
8. Moore-Landecker E. 1982. *Fundamentals of the fungi*. 2a ed. Prentice Hall, Engelwood Cliffs.
9. Lincoff C. H. 1981. *The Audubon field guide to North American Mushrooms*. Chanticleer Press, Nueva York, 926 p.
10. Margulis L. y K. V. Schwartz. 1982. *Five kingdoms. An illustrated guide to the Phyla of life on Earth*. W. H. Freeman, San Francisco, 338 p.
11. Moser M. 1983. *Keys to Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales)*. En: Games, H. (Ed.), *Kleine Kryptogamenflora*. Phillips, 535 p.
12. Müller E. Y W. Loeffler. 1976. *Micología*. Omega, Barcelona, 345 p.
13. Perry J. W. y D. Morton. 1998. *Photo Atlas for Botany*. Wadsworth Publishing Co. N.Y. 141 p.
14. Singer R. 1975. *The Agaricales in the modern Taxonomy*. 3a ed. J. Cramer, Weinheim, 912 p.
15. Smith H. V. y Smith A. H. 1973. *How to know the non-gilled fleshy fungi*. Wm. C. Brown, Duburque, 402 p.

16. Steciow M. M., Elíades L. A. y Arambarri A. M.. 2001. Nuevas citas de Blastocladiales en ambientes contaminados de Ensenada (Argentina) *DARWINIANA* **39**(3-4): 231-237.

17. Ulloa M. y R. Hanlin. 1978. *Atlas de Micología básica*. Concepto, México D. F. 158 p.

Sitios en internet.

<http://bama.ua.edu>

http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/

<http://micol.fcien.edu.uy/atlas>

<http://www.apsnet.org/education/K->

12PlantPathways/TeachersGuide/Activities/WaterMold/diagrams.htm

<http://www.botany.utoronto.ca>

<http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/oomycota.html>

ANEXO 1 Cuadro comparativo de los diversos grupos fúngicos (*sensu lato*)

HONGOS FALSOS			
MYXOMYCETES hongos mucilaginosos			
Dentro del esquema de los cinco reinos (Margulis, 1982) se los ubica en PROTOCTISTA			
Protosteliomicetos	Acrasiomicetos	Mixomicetos	Plasmodioforomicetos
No forman pseudoplasmodios Mixamebas que esporulan directamente. O forman plasmodios microscópicos y esporocarpos. Alimentación holozoica.	Seudoplasmodios (mixamebas no fusionadas) y sorocarpos. Alimentación holozoica.	Mixamebas y mixozoosporas se fusionan en plasmodios verdaderos. Forman esporangios. Alimentación holozoica.	Fitoendoparásitos. Plasmodio asexual (esporangiógeno) y plasmodio sexual (cistógeno). Mixamebas y mixozoosporas. Alimentación por ósmosis.
FICOMICETOS -nombre que se les da por su parecido con algunas algas- (bajo esta consideración se incluye a los cigomicetos)			
Margulis los ubica en PROTOCTISTA (no incluye a los cigomicetos)			
Hifoquitridiomicetos	Quitridiomicetos	Oomicetos	Tricomietos
Talo unicelular/ filamentosos. Paredes de quitina, celulosa y glucanas. Zoosporas uniflageladas, mastigonemado apical.	Talo unicelular (quitridial)/ filamentosos. Pared de quitina y glucanas. Copulación planogamética. Zoosporas uniflageladas, mastigonemado posterior.	Talo unicelular o micelio cenocítico. Paredes de celulosa u quitina. Zoosporas biflageladas (uno liso y el otro barbulado) mono o dimórficas. Oogamia. Anteridios fecundan oosferas.	Talo cenocítico o septado. Paredes de galactosamina y galactosa. Comensales o simbioses obligados del tracto intestinal de artrópodos. Reproducción asexual por esporas, células ameboides o tricosporas. Sexual por cigosporas.
		<i>Considerados Heterocontos en diversas clasificaciones</i>	
HONGOS VERDADEROS (quedan incluidos los quitridiomicetos según análisis moleculares actuales)			
Margulis los ubica en FUNGI			
Cigomicetos	Ascomietos	Basidiomicetos	Deuteromicetos
Hifas aseptadas (cenocíticas) Reproducción sexual por cigosporas.	Hifas septadas, Reproducción sexual por endosporas (ascosporas) generadas dentro de ascas. Forman esporomas pluricelulares (ascomas) cerrados (cleistotecio) o abiertos (peritecio y apotecio).	Hifas septadas. Reproducción sexual por exosporas (basidiosporas) generadas sobre basidios (septados o no). Esporomas pluricelulares (basidiomas) con himenio cerrado (gleba) o expuesto.	<i>Grupo artificial conservado por tradición.</i> Contiene sólo la fase asexual (anamorfo) de Asco y Basidiomicetos los que en su momento se desconocía su contraparte sexual (telomorfo). Anamorfo + Telomorfo = Holomorfo.

ANEXO 8 ETIQUETA GENERAL DE RECOLECTA PARA MACROMICETOS

<p>Herbario FEZA Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM HONGOS Nom. cient. _____ Recol. _____ No. _____ Fecha _____ Loc. _____ _____ Mpio. _____ Edo. _____ Vegetación _____ Alt. _____ m Sustrato: terrícola() húmicola() lignícola() parásito() coprófilo() otro: _____</p>
<p>ESPOROMA: Ascoma() Basidioma() gasteroma(): Tamaño _____ - _____ mm Forma _____ _____ _____ Margen _____ Superficie: seca() húmeda() cerosa() aceitosa() viscosa() glutinosa() Higrófono() Color _____ Ornamentación (forma, tamaño, color) _____ _____ Otras _____ Contexto: tamaño _____ mm Color (¿cambia?) _____ _____ Consistencia: carnoso() fibroso() correoso() esponjoso() cartilag() olor: _____ sabor(probar y escupir): _____</p>
<p>Himenio: Apotecio() Peritecio() LÁMINAS() POROS() LISO() VENAS() GLEBA () Descripción (forma, consistencia, borde): _____ _____</p>
<p>ESTÍPITE: tamaño _____ - _____ X _____ - _____ mm Forma, superficie, base, color, contexto, olor: _____ _____ Ornamentación: (forma, tamaño, color, olor) _____ _____ ANILLO, VELO, VOLVA (tipo, color, posición): _____</p>
<p>ESPORADA _____ No. FOTO _____</p>

ANEXO 9

Medios de cultivo y solución Melzer.

1 - H.M.A. (harina de maíz-agar)

Composición:

- 20 g harina de maíz
- 15 g de agar
- 20 g dextrosa
- 20 g peptona
- agua destilada 1000 ml

Hervir la harina en medio litro de agua por 30 minutos a fuego lento, filtrarla y desechar los sólidos. Completar con agua destilada a un litro. Agregar el agar, la dextrosa, la peptona y mezclar todo en un matraz de dos litros, hacerle un tapón ajustado con algodón y gasa (de tal forma que el tapón soporte el peso del matraz y su contenido al levantarlo en vilo tan solo sosteniéndolo del tapón). Esterilizar en el autoclave (15 lb/120°C) 15 min o en olla de presión por 30 min. Puede omitirse la dextrosa y la peptona para forzar esporulación. En caso de que el matraz no quepa en el autoclave o la olla de presión, entonces hacer por separado dos mezclas con la mitad de las cantidades y ponerlas en matraces de un litro.

2 - P.D.A. (papa-dextrosa-agar)

Composición:

- 250 g de papas sin cáscara (puede usarse puré en polvo)
- 15 g de agar
- 20 g dextrosa

Lavar las papas y hervirlas 30 minutos. Filtrar el resultado y desechar las papas. Aforar con agua destilada a 1 l, agregar agar, dextrosa y mezclar todo. Seguir los mismos pasos que el caso anterior.

3- Agar base (puede usarse agar nutritivo que ya viene preparado)

- agar base 15 g
- agua destilada 1000 ml

Mezclar ingredientes y esterilizar en el autoclave según lo indicado anteriormente.

Solución MELZER

Cristales de Yodo	0.5 g
Yoduro de potasio	1.5 g
Hidrato de cloral	20 g
Agua destilada	20 ml

Disolver los cristales de yodo en el agua (pueden disolverse primero en un poco de alcohol 96°) después el yoduro de potasio y el hidrato de cloral. Guardar en frasco ámbar.

Las reacciones obtenidas al aplicarlo en las muestras pueden ser variadas en función de la coloración adquirida por las estructuras (hifas, esporas, ascas) y tienen la siguiente terminología.

Amiloide: desde tonos azules hasta negruzcos.

Seudoamiloide o dextrinoide: café amarillenta a café rojiza, tener cuidado en diferenciarlas de la coloración del reactivo Melzer.

Inamiloide: si la reacción es negativa.

PRÁCTICA 11

OBSERVACIÓN, PRUEBAS QUÍMICAS Y DE CRISTALIZACIÓN DE LÍQUENES.

INTRODUCCIÓN

El líquen es un tipo de “organismo” muy especial en la naturaleza¹², ya que es producto de la asociación mutualista entre un hongo (micobionte) y una alga o una cianobacteria (fotobionte) en combinaciones variables cuyo resultado es un talo liquénico característico. En proporción las hifas del micobionte constituyen más del 90% de la biomasa del líquen; casi el 30% de todas las especies de hongos que existen liquenizadas y de éstas el 98% son ascomicetos (ascolíquenes) y el resto lo forman basidiomicetos (basidiolíquenes) y algunos deuteromicetos (deuterolíquenes). Sólo el micobionte tiene reproducción sexual mediante asco o basidiosporas y asexual por la producción de conidios.

Los fotobiontes son cianobacterias o pueden ser algas clorofitas unicelulares o filamentosas y constituyen aproximadamente el 10% de la biomasa del líquen. De todas las especies de líquenes (se estiman 18,000 especies distribuidas en 500 géneros) el 90% contiene clorofitas (clorolíquenes) y el 10% restante cianobacterias (cianolíquenes). Su reproducción es sólo asexual por bipartición o fragmentación.

La estratificación del talo liquénico es variable, ya que las células algales pueden estar distribuidas de manera uniforme entre las hifas (talo homómero), o se restringen a una zona más o menos central en el talo y en ese caso se diferencia una corteza superior y una inferior (donde se forman los órganos de fijación: las rizinas), y el tejido central (médula) donde se encuentran mezclados los fotobiontes con las hifas (talo heterómero). Existe un estrecho contacto entre las hifas del hongo y las células del alga, en algunos casos las hifas pueden penetrar la célula algal pero no es condición necesaria para que las sustancias sean transferidas entre los simbioses.

La morfología del talo liquénico va desde costras firmemente unidas al sustrato, extensiones dorsiventrales más o menos foliáceas y de consistencia gelatinosa o coriácea hasta talos erectos ya sean columnares o bastante ramificados y de apariencia arbustiva o acintada (fruticasas). Aunque es el micobionte quien provee la estructura de sostén, el fotobionte es quien determina la morfología del talo liquénico. Fisiológicamente forman ácidos liquénicos (compuestos alifáticos o fenólicos) que son metabolitos secundarios exclusivos del grupo. Son cristales extracelulares (atranorina, ácidos úsnico, salazínico, giropórico, norstíctico y lecanórico entre otros). Su papel fisiológico es discutido y depende de su distribución en el talo. En el caso de las sustancias corticales pueden ser auxiliares en el control de absorción de agua y pérdida de humedad o bien filtros auxiliares en caso de alta intensidad luminosa y tienen efecto antibiótico en contra de bacterias y hongos; actúan como sustancias alelopáticas y evitan la depredación de muchos animales que encuentran desagradable el sabor del talo. Por ser algunas repelentes al agua permiten crear cámaras de aire en la médula para el intercambio de gases. La identificación de estas sustancias mediante diversos reactivos, microcristalización o cromatografía tiene relevante importancia taxonómica.

¹² Se estiman cerca de 18,000 “especies” distribuidas en 500 géneros.

En esta interacción el micobionte aprovecha las sustancias elaboradas por la fotosíntesis, especialmente azúcares simples y el oxígeno liberado mientras que el fotobionte recibe protección contra la insolación, pérdida de humedad y daños mecánicos; aprovecha el CO₂ desechado en la respiración y el agua y sales minerales captadas por el talo. En el contexto de la cadena trófica el líquen en sí mismo es un ecosistema en donde coexisten tanto productores como consumidores.

Los líquenes contribuyen con el reciclaje del carbono y la fijación de nitrógeno (cianolíquenes); son refugio de pequeños animales; alimento de gusanos e insectos incluyendo hasta grandes herbívoros como los renos e incluso el hombre. Son colonizadores primarios importantes: intemperizan rocas, forman suelo y contribuyen a la sucesión vegetal. Sus usos son diversos ya sea como fijadores de perfume, como colorantes textiles, ornamentos y son fuente potencial de antibióticos en el área médica.

OBJETIVO

Conocer las técnicas de recolecta y determinación de líquenes así como aplicar pruebas químicas y de cristalización para algunas sustancias liquénicas.

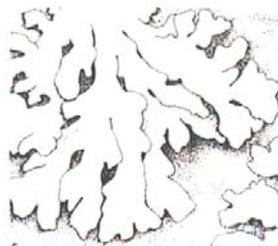
MATERIAL

Talos de diversas especies de líquenes. Preparaciones permanentes. En la sección correspondiente se mencionan algunos géneros comunes.

Porta y cubre objetos
Navajas para rasurar de doble filo
Mechero bunsen
Paño para limpiar
Papel absorbente
Papel seda
Microscopio Estereoscópico
Microscopio Compuesto
Agua destilada
Acetona
Glicerina
Ácido acético
Alcohol 96°
O-toluidina

PARA RECOLECTA DE LÍQUENES

Morral
Botes de plástico de diversos tamaños
Papel encerado
Marcador de cera
Cajas blancas pequeñas de cartón
Etiquetas de recolecta (ver apéndice)
Formol



PROCEDIMIENTO

Recolecta

Durante la recolecta se necesita llevar un registro en una libreta de campo con los siguientes datos: número de recolecta de cada ejemplar, localidad, altitud, tipo de vegetación, tipo de suelo, sustrato, fecha y datos complementarios. El material se puede tomar directamente o con cuchillo o martillo y cincel según el sustrato donde se encuentre. Colocar el material liquénico en botes de plástico (diferentes tamaños de manera individual o colectiva pero en este caso cada ejemplar envuelto en papel encerado) anotando número de registro; esto se tiene la ventaja de que si se van a tomar fotografías del material en el laboratorio o zona de trabajo, éste no estará decolorado por la deshidratación. Incluso con esta técnica el material se puede trabajar dos o tres días después de recolectado. Es aconsejable una bolsa de lona para cargar la recolecta.

Se deben deshidratar y colocar en cajitas rotuladas (ver metodología en la práctica 10 del presente manual ya que es la misma usada en macromicetos). En el caso de los líquenes gelatinosos generalmente tienen adheridos diversos cuerpos extraños. Para eliminarlos se recomienda lavarlos con agua destilada y después secarlos (procedimiento que modifica bastante su aspecto) o bien, se introducen en formol-aceto-alcohol (FAA) como fijador dentro de frascos de vidrio con tapa de plástico (ver anexo 5). Cuando se requiera de la elaboración de preparaciones para observaciones con el microscopio compuesto, es conveniente efectuar el procedimiento anterior y continuar con las técnicas de microscopía convencionales, empleadas para tejidos vegetales.

Morfología.

Trabajar los especímenes liquénicos recolectados. Revisar la morfología de cada ejemplar (ver anexo 1) y mediante el uso de las claves para identificación de los anexos 2, 3 y 4 determinar a nivel de género. Aplicar algunas de las pruebas químicas y de cristalización que se explican a continuación (ver anexo 5). Se recomienda trabajar los siguientes géneros:

Costrosos: *Caloplaca*, *Candelaria*, *Candelariella*, *Graphis*, *Lecanora* y *Lepraria*.

Foliáceos: *Evernia*, *Everniastrum*, *Flavoparmelia*, *Flavopunctelia*, *Heterodermia*, *Hypotrachyna*, *Parmelia*, *Parmotrema*, *Peltigera*, *Pseudevernia*, *Punctelia*, *Sticta*, *Xanthoparmelia* y *Xanthoria*.

Fruticosos: *Cladonia*, *Cora*, *Ramalina*, *Teloschistes* y *Usnea*.

Pruebas químicas.

Se utilizan los siguientes reactivos: hidróxido de potasio; hipoclorito de sodio o de calcio y Parafenilenediamina conocidos por convención por las siglas K, C y P respectivamente (ver anexo 5).

Se recomienda hacer las pruebas sobre un trozo de papel filtro o en una cápsula de porcelana para contrastar bien la coloración de la reacción. Use sólo un fragmento pequeño de talo por cada

prueba. Puede hacerse también una combinación KC o CK cuidando ese orden al verter la gotas (ambas de manera continua e inmediata sobre el mismo trozo de líquen). Debe observarse la reacción con lupa o en el microscopio estereoscópico para lo cual es necesario tener los reactivos a la mano ya que algunas reacciones son fugaces.

Aplicar K y observar la reacción positiva de: *Caloplaca* y *Teloschistes* (púrpura). Aplicar C y observar la reacción positiva de: *Flavopunctelia* (médula roja); *Flavoparmelia* (negativa).

Aplicar P y observar la reacción positiva o negativa de: *Usnea*.

Cristalización

Para observar cristales es necesario tomar un pedazo pequeño de talo, colocarlo sobre un portaobjetos y cortarlo muy finamente con navaja. Reunir todos los pedacitos en el centro del portaobjetos y añadir unas gotas de acetona repetidamente según se evapore. Una vez seco, retirar los pedacitos para dejar sólo el concentrado seco. Añadir una gota del agente cristizador (GE; GAW, GAQ o GaoT descritos en el anexo 5).

Colocar el cubreobjetos. Calentar en el mechero suavemente hasta apreciar burbujeo. Observar a 40X y 100X en el microscopio compuesto, describirlos y comparar los cristales con la guía de Hale, 1975.

CUESTIONARIO

1. Analice cuidadosamente al líquen como una especie.
2. Enliste algunos de los principales géneros de micobiontes y fotobiontes.
3. Indique cuáles son las estructuras características de un líquen, defina cada una de ellas.
4. Enliste algunos compuestos liquénicos.
5. Investigue algunos otros usos aparte de los mencionados en este manual.

BIBLIOGRAFÍA

1. -Ahmadjian, V. 1993. **The lichen symbiosis**. John Wiley & Sons, INC. New York.
2. -Brodo, I. M., Sharnoff, S. D. y Sharnoff, S. 2001. **Lichens of North America**. Yale University Press. New Haven.
3. -Galun, M. 1988. **Handbook of Lichenology** vol.I, II y III , CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 287, 173 y 141 pp respectivamente.
4. -Álvarez, Y. y L. Guzmán-Dávalos. Nuevos registros de líquenes de Jalisco. **Rev. Mex. Mic. 4**: 89-96, 1988.
5. -Brizuela, F. y G. Guzmán. Estudio sobre los líquenes de México II. **Bol. Soc. Méx. Mic. 5**:79-103, 1971.
6. -Coutiño, B y A. Mojica. Estudio de líquenes corticícolas de bosque mesófilo de montaña y de coníferas del estado de Hidalgo. **Bol. Soc. Méx. Mic. 17**: 166-180, 1980.
7. -Dávalos de Guzmán, L.F. Brizuela y G. Guzmán. Estudio sobre los líquenes de México I. Notas sobre algunas especies. **An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Méx. 19**: 9-20, 1972.
8. -Dobson, F. 1979. **Lichens: An illustrated Guide**. The Richmond Publishing Co. Ltd. Richmond. 317 pp.
9. -Hale, M. E. 1979. **How to know the Lichens**. 2a ed. The Pictured Key Nature Series. Wm. C. Brown Company Publishers, Dubuque Iowa. 246 pp.
10. -Hale, M. E. 1983. **The Biology of lichens**. 3a ed. Edward Arnold, Baltimore. 190 pp.

11.-Hawksworth, D. L. y D. J. Hill. 1984. **The lichen-forming fungi**. Blackie, Chapman & Hall, New York.

12.-Vicente Córdoba, C. 1975. **Fisiología de las sustancias liquénicas**. Alhambra, Madrid. 162 pp.

ANEXO 5 Soluciones empleadas en liquenología

FIJADOR FAA: (para preparar 50 ml de solución).

- formol comercial 10 ml
- agua destilada 35 ml
- ácido acético glacial 5 ml
- etanol (alcohol 96⁰)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Reactivo K

KOH el necesario

Agua destilada 30 ml

Preparar solución concentrada.

Reactivo C

Solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial) usado directamente.

Reactivo P (mucho cuidado ya que es cancerígeno y además daña papel y tela)

Cristales de para fenil enediamina

Alcohol

Colocar un pequeño cristal sobre un papel filtro y en éste el pedazo del ejemplar a probar.

Agregar una gota de alcohol. O bien preparar una pequeña cantidad de solución en alcohol y usarlo en gotas.

Agentes recristalizantes:

GE glicerol : ác. acético (1 : 3)

GAW glicerol : etanol : agua (1: 1: 1)

GAoT glicerol : etanol : o-toluidina (2: 2: 1)

GAQ glicerol : etanol : quinolina (2: 2: 1)

Criterios de Evaluación para la Unidad 3

Esta unidad representa un 25% del total de la calificación del laboratorio y se considerarán los siguientes aspectos:

a) Reportes de prácticas	30 %
b) Asistencia	10 %
c) Reporte de campo	30 %
d) Examen	30 %

1. Los protocolos de prácticas incluyen cuestionario y glosario, los cuales deben entregarse resueltos **al inicio** de cada sesión, anotar el o los nombres de quienes lo elaboraron.

2. Los reportes deben entregarse **manuscritos y completos** con: carátula (título de la práctica, No. de equipo, nombre de los integrantes que participaron), introducción (una cuartilla con citas bibliográficas) objetivo, material y método o procedimiento, resultados (esquemas, figuras, estructuras, aumento, diagnosis, etc.) discusión de resultados, conclusión (es) y bibliografía consultada.

3. Los reportes deben entregarse durante las **dos sesiones siguientes** con un **máximo de una semana** después de realizada la práctica.

4. La asistencia es importante para que se tomen en cuenta: cuestionarios glosarios y reportes

5. Presentarse al laboratorio con el material que se le solicite (bata, muestras, instrumental u otros materiales).

6. Durante la práctica de campo, en caso de cometer una falta, se suspenderá de inmediato y se regresará a la FES-Zaragoza.

Unidad 4

Proyecto de investigación

En esta unidad se realizará un proyecto de docencia-investigación, con los siguientes lineamientos:

El proyecto lo realizará el equipo que ha venido trabajando desde inicio del semestre.

Cada profesor se hace cargo de un tercio de los equipos existentes en el grupo.

El proyecto debe involucrar al menos dos de las unidades del laboratorio.

Una de esas dos unidades debe ser la del profesor que les asesora.

El tema será propuesto por los alumnos integrantes del equipo

El proyecto debe incluir una parte experimental viable en el laboratorio