



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Biología

Ciclo Básico

Manual de Laboratorio de Investigación Formativa II

Aprobado por: en revisión por el Comité Académico de Carrera



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	2 /222

Laboratorio de Investigación Formativa II

AUTORES	ACTUALIZACIÓN
<p>Aguñiga Sánchez Itzen Alvarado Domínguez María Cristina Ávila Ortiz Alejandrina Graciela Bautista Reyes Carlos Castillo Chaires Irene Díaz Martínez Sergio Espitia Licea Rocío Hernández Anaya Lisandro Hernández Muñoz Marco Antonio Jiménez Encarnación María Estela Longares Méndez Dora Alicia Luna Vásquez Alfonso Niño de Rivera Oyarzabal María del Carmen Ramos Velázquez José Rigoberto Rivera Martínez Ana Rocío Roldán Reyes Elia Saíto Quezada Verónica Mitsui Soriano Martínez Ana María Zapata Cruz Aida</p>	<p>Aguñiga Sánchez Itzen Alvarado Domínguez María Cristina Ávila Ortiz Alejandrina Graciela Bautista Grande Araceli Castillo Chaires Irene Cornejo Silva Yadira Corona Ortega María Teresa Díaz Martínez Sergio Espitia Licea Rocío Hernández Anaya Lisandro Hernández Muñoz Marco Antonio Longares Méndez Dora Alicia Luna Vásquez Alfonso Ramos Velázquez José Rigoberto Rivera Martínez Ana Rocío Roldán Reyes Elia Saíto Quezada Verónica Mitsui Soriano Martínez Ana María Zapata Cruz Aida</p>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	3 /222

CONTENIDO

Introducción	3
Objetivo General	6
Criterios de evaluación de la asignatura	7
Reglamento general del laboratorio	8
Reglamento de campo	8
Consideraciones generales para el manejo de residuos	9
Unidad I. Química orgánica	11
Propedéutica	14
Experimento 1. Aislamiento de sustancias orgánicas a partir de fuentes naturales, mediante extracción sólido-líquido y líquido-líquido	17
Experimento 2. Separación de los componentes de la mezcla extraída mediante las técnicas de cromatografía en capa fina y columna	17
Experimento 3. Separación de sustancias orgánicas mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua y purificación por cristalización	24
Criterios de evaluación de la unidad	31
Anexo I. Química orgánica	34
Unidad II. Genética	46
Práctica 1. Leyes de Mendel y herencia ligada al sexo	48
Práctica 2. Aislamiento, purificación e identificación de ADN	67
Práctica 3. Cromosomas gigantes	76
Práctica 4. Observación de cromatina sexual	85
Práctica 5. Cultivo de linfocitos humanos u Observación de cromosomas de médula ósea de ratón	94
Criterios de evaluación de la Unidad	100
Manejo de residuos	103
Unidad III. Bacterias, algas y hongos	106
Práctica 6. Preparación y manejo de medios de cultivo bacterianos	107
Práctica 7. Aislamiento, siembra, técnica de tinción y observación de bacterias	107
Anexo 1. Técnica para utilizar el autoclave	120
Anexo 2. Técnica de la tinción de Gram	121
Práctica 8. Observación de cianobacterias	123
Anexo 3. Ejemplos de cianobacterias	129
Anexo 4. Montaje de preparaciones	130



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	4 /222

Anexo 5. Clave para algas procariotas.	131
Práctica 9. Observación y determinación de algas eucariotas	132
Anexo 6. Estructuras de algas verdes	145
Anexo 7. Clave para la determinación taxonómica de algas verdes	146
Anexo 8. Algas verdes de cuerpos de agua continentales	147
Anexo 9. Estructuras de algas rojas	150
Anexo 10. Clave para la determinación taxonómica de algas rojas	151
Anexo 11. Estructuras de algas pardas	154
Anexo 12. Clave para la determinación taxonómica de algas pardas	155
Anexo 13. Diatomeas	156
Práctica 10. Observación de hongos. Determinación taxonómica de macromicetos	159
Anexo 14. Etiqueta general de recolecta para macromicetos	170
Anexo 15. Medios de cultivo y solución Melzer	171
Anexo 16. Cigomicetos	172
Anexo 17. Grupos principales de macromicetos	174
Práctica 11. Observación, pruebas químicas y determinación taxonómica de líquenes	179
Anexo 18. Etiqueta para la recolección de líquenes	188
Anexo 19. Soluciones empleadas en liquenología	189
Anexo 20. Clave para determinar líquenes a nivel de género	191
Anexo 21. Guía de imágenes para el reconocimiento de cristales liquénicos	195
Anexo 22. Estructuras de líquenes	196
Criterios de evaluación de la unidad	197
Manejo de Residuos	198
Unidad IV. Proyecto de investigación	200
Criterios de evaluación de la unidad	218



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	5 /222

INTRODUCCIÓN

La filosofía y la misión de la FES Zaragoza establece que sus egresados deberán tener una actitud crítica y creativa, además de 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 funciona 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, aprender leyes, teorías y principios, entre otras cuestiones. Aunado a esto, el estudiante debe desarrollar un espíritu de colaboración y conocimientos, habilidades, actitudes, aptitudes y valores que le permitan la realización de diversas tareas, en diferentes ámbitos académicos, laborales o de la vida cotidiana, en donde el alumno:

1. Escucha, interpreta y emite mensajes pertinentes en distintos contextos mediante la utilización de medios, códigos y herramientas apropiadas.
2. Piensa crítica y reflexivamente, desarrolla innovaciones y propone soluciones a problemas, a partir de métodos establecidos.
3. Sustenta una postura personal sobre temas de interés y relevancia general, considera, otros puntos de vista de manera crítica y reflexiva.
4. Aprende de forma autónoma, por iniciativa e interés propio.
5. Trabaja en forma colaborativa, participa y colabora de manera efectiva en equipo.
6. Participa con responsabilidad en la sociedad, mantiene una actitud respetuosa hacia la interculturalidad y la diversidad de creencias, valores, ideas y prácticas sociales.

Asimismo, el alumno aplicará los métodos y procedimientos de las ciencias experimentales para la resolución de problemas cotidianos y para la comprensión racional de su entorno, razón por la cual:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	6 /222

1. Adquirirá un enfoque práctico, para desarrollar acciones que favorezcan el respeto hacia el ambiente, sus compañeros y hacia sí mismo.
2. Establecerá la interrelación entre la ciencia, la tecnología, la sociedad y el ambiente en contextos históricos y sociales específicos.
3. Compartirá opiniones sobre los impactos de la ciencia y la tecnología en su vida cotidiana, asumiendo consideraciones éticas.
4. Identificará problemas, formulará preguntas de carácter científico y planteará las hipótesis necesarias para responderlas.
5. Obtendrá, registrará y sistematizará la información para responder preguntas de carácter científico, consultando fuentes relevantes y realizando experimentos pertinentes.
6. Contratará los resultados obtenidos en una investigación, práctica o experimento con hipótesis previas y comunicará sus resultados y conclusiones.
7. Hará explícitas las nociones científicas que sustentan los procesos para la solución de problemas cotidianos.
8. Explicará el funcionamiento de equipos y materiales de uso común en la investigación científica.
9. Diseñará modelos o prototipos para resolver problemas, satisfacer necesidades o demostrar principios científicos.
10. Relacionará los niveles de organización química, física, biológica y ecológica de los seres vivos.
11. Aplicará normas de seguridad e higiene en el manejo de sustancias, instrumentos, material biológico y equipo en la realización de actividades experimentales.

OBJETIVO GENERAL

Introducir a los alumnos 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	7 /222

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA ASIGNATURA

Cada unidad que constituye el LIF II, tiene una duración de cuatro semanas. En todas y cada una de ellas se debe cubrir al menos el 80% de asistencia. En caso de no cumplir este requisito no se tendrá derecho a calificación.

Sí alguna o algunas de las unidades, 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 recursarlo (si le asiste ese derecho), o bien presentará el examen extraordinario.

Para el caso del proyecto, seguirá los criterios que indique el asesor con el cual trabaje y depende de las áreas que concurran en su proyecto, la disponibilidad de material y equipo, así como, del tiempo que se otorgue para la presentación de éste y obtenga la aprobación del asesor para la realización de la parte experimental.

Si al término del tiempo dedicado al proyecto no obtiene una calificación aprobatoria, 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 acreditará el LIF II.

El alumno deberá obtener una calificación aprobatoria (mínimo de seis), en cada una de las unidades y en el proyecto que desarrolle. Cada unidad tendrá su propio mecanismo de evaluación y aportará el 25% a la calificación final, igual que el proyecto de investigación. La evaluación final será el promedio aritmético de todas las unidades.

El LIF II esta regido por el Reglamento General del CERFyS
<https://coordinacionlaboratorios2.blogspot.com/>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	8 /222

Condiciones generales para el trabajo en el laboratorio:

1. Uso obligatorio de bata blanca cerrada y de algodón.
2. Uso obligatorio de calzado cerrado.
3. No trabajar solo.
4. Trabajar con asesoría continua.
5. Uso obligatorio de identificación (Credencial del CERFyS y de seguridad)
6. Prohibido fumar.
7. Prohibido usar audífonos.
8. Prohibido consumir bebidas y alimentos.
9. Prohibido correr y jugar dentro del laboratorio.
10. Es obligatorio cumplir con el reglamento interno de cada laboratorio y del CERFyS.
11. Es obligatorio cumplir con el reglamento de salidas a campo y lineamientos adicionales de seguridad disponibles en la página de la FES-Zaragoza.

REGLAMENTO DE CAMPO

Chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefindmkaj/https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Reglamentos/reglamento_practicas_campo.pdf

CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos químicos derivados de las prácticas, deben etiquetarse como lo muestra la siguiente figura, además de colocarlos en el área de color amarillo destinada en cada laboratorio.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	9 /222



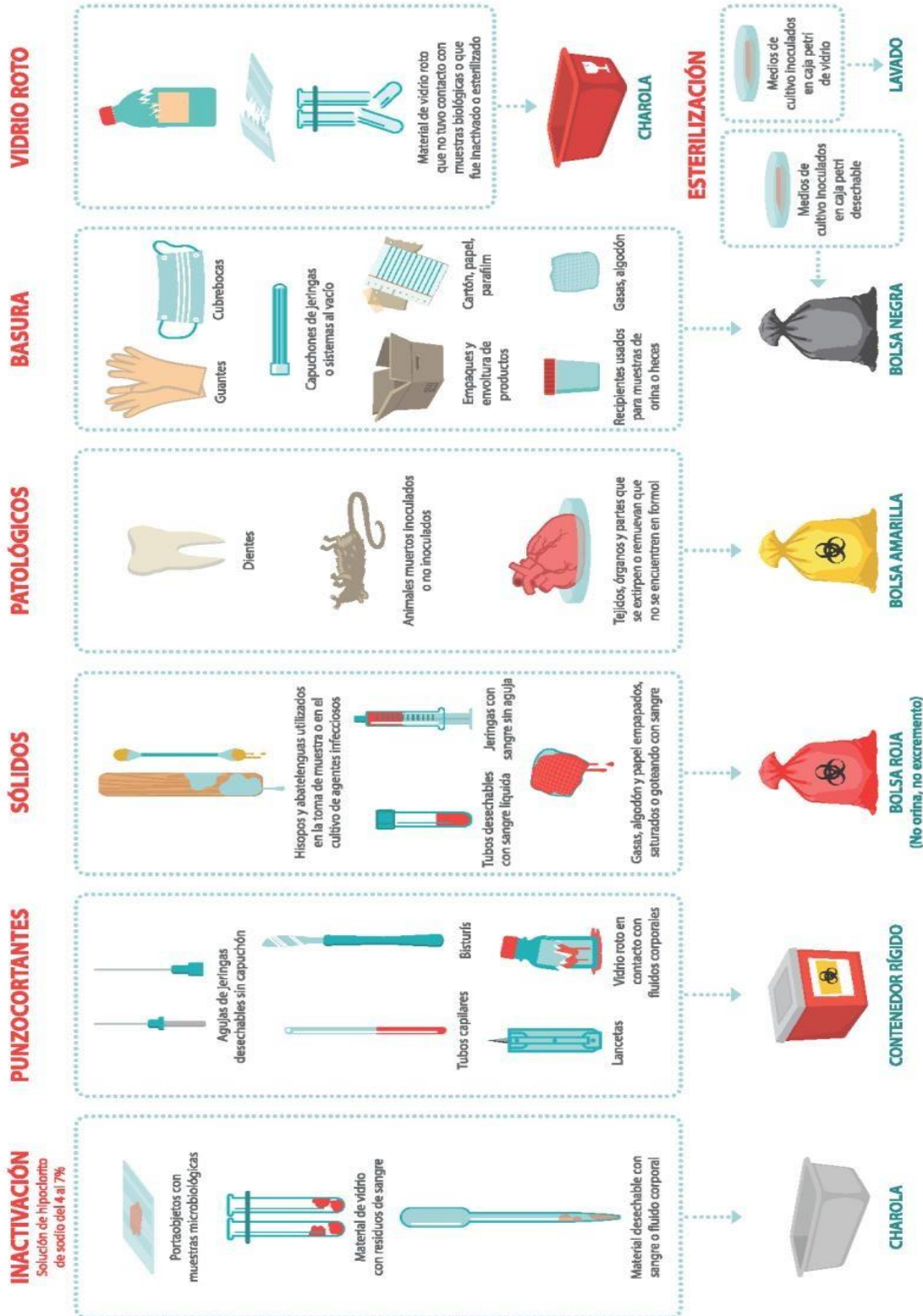
El sobrante de semillas, vegetales o plantas no contaminados deberá colocarse en el área de composteo. Los materiales contaminados o tóxicos serán colocados en bolsas selladas. La bolsa deberá estar etiquetada señalando su procedencia.

El confinamiento de los residuos punzocortantes será de acuerdo a la figura siguiente. Los contenedores rojos deben mantenerse en el área de residuos en la sección roja. Las bolsas rojas y amarillas deben solicitarse al interlaboratorio y en su defecto a la coordinación del ciclo.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	10 /222

MANEJO DE RESIDUOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	11 /222

UNIDAD 1

QUÍMICA ORGÁNICA

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	12 /222

QUÍMICA ORGÁNICA

INTRODUCCIÓN DE LA UNIDAD

La Química Orgánica tiene actualmente un papel importante para la formación profesional del Biólogo, puesto que su actividad la desarrollará tanto en la industria, la investigación, la docencia y el sector público; donde empleará 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, con un enfoque práctico donde se apliquen conceptos y contenidos en la asignatura teórica de Química Orgánica.

Durante el desarrollo de la actividad práctica, se espera que el estudiante conozca, comprenda, analice y aplique toda aquella información relacionada con el uso y manejo de sustancias orgánicas, así como los métodos y técnicas más comunes, equipos y materiales que se emplean para extraer, separar, identificar compuestos orgánicos presentes en productos naturales.

OBJETIVOS DE LA UNIDAD

- a. Aplicar el Método Científico en los experimentos que desarrolle en la unidad.
- b. Investigar previamente al desarrollo del experimento, los métodos y los fundamentos teóricos de cada una de las técnicas que se emplean.
- c. Desarrollar las técnicas más comunes de la química orgánica en cada experimento:
 - c.1. Extraer una sustancia orgánica
 - c.2. Aislar una sustancia orgánica.
 - c.3. Purificar el producto aislado.
 - c.4. Identificar el producto purificado.
 - c.5. Almacenar adecuadamente el producto identificado.
 - c.6. Recuperar en lo posible los reactivos empleados en las operaciones anteriores.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	13 /222

HABILIDADES Y DESTREZAS

1. Desarrolle la habilidad de aprendizaje e innovación.
2. La habilidad en el manejo de medios y tecnologías de información.
3. La capacidad para solucionar problemas y toma de decisiones.
4. La habilidad de desarrollar el pensamiento crítico.
5. Habilidad comunicativa: oral y escrita.
6. Habilidad del manejo conceptual de cada experimento.
7. Desarrollar la destreza para el manejo de material, equipo de laboratorio y reactivos.

CONOCIMIENTOS PREPARATORIOS PARA EL TRABAJO EN EL LABORATORIO

OBJETIVOS

- Conocer los reglamentos y metodologías experimentales a usar para evitar los accidentes más comunes en un laboratorio.
- Adquirir un criterio sobre prevención de accidentes y aplicar las normas de seguridad para trabajar en el laboratorio.
- Administrar los primeros auxilios en caso de un accidente.
- Conocer e identificar los materiales, aparatos y equipos de uso común en el laboratorio de química orgánica.
- Reconocer los diferentes tipos de incendios y extintores
- Aplicar las técnicas de lavado y secado de material.

FUNDAMENTO

Se denomina propedéutica a los conocimientos previos que se necesitan estudiar o saber para poder realizar alguna actividad. Se define también, como el conjunto de conocimientos que permiten hacer del trabajo experimental una disciplina científica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	14/222

En el caso de LIF II, estos conocimientos son:

Las normas de seguridad e higiene en el laboratorio, prevención de accidentes, primeros auxilios, manipulación de sustancias (anexo 1, fig. 2), extintores y su manejo (anexo 1, fig. 3), material (anexo 1 fig. 4-10), equipo y aparatos que se emplean en los procesos de separación, purificación e identificación de sustancias.

PRIMEROS AUXILIOS

Son las medidas y precauciones que deben adoptarse inmediatamente para socorrer a las víctimas de un accidente hasta que llegue la asistencia médica.

Ante una situación de emergencia es importante: tener calma, examinar rápidamente y pensar que hacer (CONAPRA, 2013).

ACCIDENTES DE TRABAJO

Los principales accidentes en un laboratorio de química (Cuadro 1.).

Cuadro 1. Principales accidentes en el laboratorio de química.

I. Incendios	Ocasionadas por corto circuito y sustancias inflamables.
II. Quemaduras	Ocasionadas por fuego, ácidos, bases fuertes y otras sustancias corrosivas.
III. Envenenamiento	Derrame, fugas, vapores, reacciones secundarias.
IV. Cortaduras	Ocasionadas por objetos punzantes y cortantes.

ACTIVIDADES PREVIAS

El alumno realizará una investigación bibliográfica de los siguientes temas:

1. Normas fundamentales para trabajar en el laboratorio.
2. Manejo de sustancias, material y equipo.
3. ¿Cuáles son los primeros auxilios en caso de un accidente?
4. ¿Qué es un extintor?, tipos y usos.
5. Técnicas de lavado de material.
6. Definición de los siguientes términos: deliquescente, higroscópico y efluorescente.
7. Grado de pureza de los reactivos químicos.
8. ¿Cómo se redacta una cita y una referencia según APA?
9. Ficha de seguridad e higiene y sus características.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	15 /222

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Ault, A. (1997). *Techniques and Experiments for Organic Chemistry* (6th ed). Illinois: Waveland: Prospect Heights.
- CONAPRA, (2013) Consejo Nacional para la Prevención de Accidentes.
- Durst H. D., G. W. Gokel. (2021). *Química Experimental* Editorial Reverté, S.A., Edición Ebook (PDF), Barcelona España.
- Eaton, D. C. (1989). *Laboratory investigations in Organic Chemistry*. USA: Mc Graw Hill.
- González R. M. E., J. I. B. Bueso, E. G. Castillo. (2020). *Organic chemistry laboratory manual*. Psylicom Distribuciones Editoriales.
- Grande T. C. D. (2013). *Manual de Prácticas de Química Orgánica Aplicada*. Editorial Bonaventura, Universidad de San Buenaventura, Colombia.
- Keese, R., Muller, R. K., y Toube, T. P. (1990). *Métodos de Laboratorio de Química Orgánica*. México: Limusa.

. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Lamarque, Alicia (Editora), 2008. Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica, Editorial Brujas. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbps/detail.action?docID=3185981>.
- Lehman, J.W. (1990) *Operational Organic Chemistry: A Laboratory Course Second USA*: Prentice Hall.
- Pavia, L. and Lampman, G.S. (1995). *Introduction to Organic Laboratory techniques. Amicroscale Aproach* (3rd ed). U.S.A: Saunders College Publishing
- Robards K., R. Danielle 2021, Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, ELSEVIER Academi Press.
- Rodríguez Y. M.S. y Gómez C. F. (2008). *Curso Experimental en Química Orgánica*. Editorial Síntesis. Madrid España.
- Sánchez y García Figueroa F.L., (Editora), 2018. *Técnicas Básicas del laboratorio de Química Orgánica*, UNAM, FES Zaragoza.
- Skoog, D. A., Holder, F.J., y Stanley P.C., 2012. *Principles of Instrumental Analysis*. (6th ed), Thomson Broocks/Cole USA.
- Angarita Ruiz M. P., 2019, Obtención de Aceite Esencial de Semilla de Durazno por Método Soxhlet y Arrastre de Vapor. Tesis de Licenciatura, Fundación Universidad de América, Facultad de Ingenierías, Bogotá, Colombia,



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	16 /222

Cedeño A, C. Moreira, J. Muñoz, A. Muñoz, S. Pillasaguay & M. A. Riera, 2019, Comparación de métodos de Destilación para la Obtención de Aceite Esencial de Eucalipto, Revista Colón, Tecnología y Negocios, vol.6, No.1, pag 1-13.

Cruz S. F., I. López y Célis, J A. Haro Castellano, J.M.A. Barba Chávez, 2012, *Manual de Prácticas del Laboratorio de Química Orgánica*, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM, México CdMx.

Cubillos Castañeda. L. N. y L. Y. Pava-Mora, 2019. Evaluación de extracción de pigmentos a partir de frutos silvestres para uso alimenticio. Tesis de licenciatura, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia: 161 p.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	17 /222

EXPERIMENTO 1

EXTRACCIÓN DE SUSTANCIAS ORGÁNICAS A PARTIR DE UN VEGETAL, MEDIANTE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO Y LÍQUIDO-LÍQUIDO

OBJETIVO GENERAL

- Extraer sustancias orgánicas mediante técnicas de extracción sólido-líquido y líquido-líquido.

OBJETIVO PARTICULAR

- Extraer sustancias orgánicas por métodos de extracción sólido-líquido y líquido-líquido.
- Aislar la sustancia orgánica por métodos líquido-líquido.
- Identificar la sustancia obtenida por método organoleptico

FUNDAMENTO TEÓRICO

El término “pigmento” es utilizado para describir una molécula que absorbe luz y presenta un color. Las plantas contienen una gran variedad de pigmentos que dan lugar a los colores que en ellas observamos. Obviamente, las flores y los frutos contienen muchas moléculas orgánicas que absorben luz. Las hojas, tallos, y raíces también contienen muchos pigmentos, que incluyen las antocianinas, flavonoides, flavinas, quinonas y citocromos. Sin embargo, ninguno de éstos debe ser considerado como un pigmento fotosintético. Los pigmentos fotosintéticos son los únicos que tienen la capacidad de absorber la energía de la luz solar y hacerla disponible para el aparato fotosintético. En las plantas terrestres hay dos clases de pigmentos fotosintéticos: las clorofilas y los carotenoides (Núñez-González *et al.*, 2021)

El uso de los pigmentos vegetales es una práctica ancestral, para todo tipo de propósitos desde artesanales hasta rituales pasando por alimenticios y cosméticos, en la Botánica tiene importancia taxonómica.

Los pigmentos se obtienen por métodos de extracción los cuales se utilizan dentro de la Química Orgánica.

Entonces, la extracción es un método que busca recuperar o purificar, mediante un solvente orgánico, una sustancia analito dentro de la muestra; separándolo de las impurezas y de los demás componentes que no son requeridos, existen numerosos métodos de extracción y además son complementarios entre ellos (Colorado y Álvarez, 2011) los que vamos abordar en esta unidad son:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	18 / 222

La extracción Líquida-Líquida es una técnica en la cual una solución (generalmente acuosa) se pone en contacto con un segundo solvente (generalmente orgánico), básicamente inmiscible con el primero, para efectuar una transferencia de uno o más solutos dentro del solvente (Jeffery *et al.*, 1989).

La extracción Sólido-Líquido tiene por objeto la separación de un componente de una muestra sólida con un disolvente, normalmente orgánico, en el cual los demás disolventes son insolubles (Solano *et al.*, 1991).

Por sus características la extracción puede ser: **discontinua** en la cual se agita una solución acuosa con una solución orgánica en un embudo de separación o **continua** que consiste en agitar un sólido con un disolvente y después separarlos por filtración o también someter a reflujo un sólido con un disolvente en un aparato Soxhlet (Domínguez y Domínguez, 1982).

Además, dentro del proceso de la extracción se aplica la ley de Distribución o ley de Partición (K_d): Si a un sistema de dos fases líquidas (A y B) inmiscibles o parcialmente miscibles, se le agrega un tercer componente (Z), soluble en ambas fases, este se distribuirá en cada una de las fases líquidas de manera tal que el coeficiente que resulte de dividir las concentraciones logradas en cada fase será una constante que sólo dependerá de la temperatura (Lamarque *et al.*, 2008)

Si C_A y C_B son concentraciones de la sustancia Z en las fases líquidas A y B, a una temperatura determinada, se cumple que:

$$K_d = \frac{C_A}{C_B}$$

También, cuando una sustancia está en contacto con dos fases líquidas, inmiscibles entre sí, se establece un equilibrio de distribución de la misma entre dichas fases, este proceso de distribución depende de una las siguientes variables: partición o adsorción.

La partición indica una disolución selectiva, con solubilidades diferentes para los componentes de la mezcla, entre las fases de dos disolventes inmiscibles.

La adsorción se refiere a una adherencia selectiva, con desorciones diferentes, para los componentes de la mezcla entre la fase sólida del adsorbente y la fase líquida del eluyente (Lamarque *et al.*, 2008).

Así mismo, la extracción es uno de los pasos más importantes en el pretratamiento de muestras, aunado a que, su resultado determinará la liberación de los analitos desde la matriz vegetal hacia el medio, y esto a su vez permitirá la separación de los pigmentos del extracto, para la cromatografía en capa fina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	19 /222

ACTIVIDADES PREVIAS

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo experimental:

1. Método de extracción sólido-líquido, líquido-líquido (continuo y discontinuo), fundamento teórico.
2. Material empleado para la extracción líquido-líquido discontinua.
3. Concepto de reflujo, cuándo se usa y esquema del aparato.
4. ¿Qué es una emulsión? Y las diversas formas de romperlas.
5. Extracción con el Aparato Soxhlet; cuándo se usa y esquema.
6. Fuentes de calentamiento directo e indirecto y sus usos.
7. Diferentes tipos de cuerpos de ebullición y sus usos.
8. Tipos de lubricantes empleados en el laboratorio para las juntas esmeriladas.
9. ¿Qué es un agente desecante? Y tipos de desecantes.
10. ¿Qué es un pigmento y cuántos tipos existen?

MATERIAL Y REACTIVOS

- Aparato Soxhlet (ver anexo 1, fig. 11)
- Aparato de extracción líquido-líquido (ver anexo 1, fig. 14)
- Papel filtro
- Frascos con tapa
- Probetas
- Vasos de precipitado de volúmenes variados
- Pipetas graduadas de volúmenes variados
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos con nuez
- Matraz balón
- Algodón
- Mangueras



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	20 /222

REACTIVOS

Hexano ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

- Tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)
- Cloroformo (CHCl_3)
- Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- Alcohol metílico (CH_3OH)
- Acetato de etilo $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$.
- Acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$)
- Cloruro de metilo o diclorometano (CH_2Cl_2)
- Éter etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$)
- Isopropanol $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)

EQUIPO

- Bomba de vacío
- Rotavapor
- Parrillas de calentamiento
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Canastillas de calentamiento con reóstato de 500 mL
- Estufa eléctrica
- Recirculadores

SERVICIOS

- Gas
- Sistema de extracción en el laboratorio y campanas
- Vacío
- Energía eléctrica
- Agua
- Drenaje
- Lámpara de luz de emergencia



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	21 /222

PROCEDIMIENTO

Desarrollo experimental

El alumno desarrollará la parte experimental considerando lo siguiente:

Obtener los compuestos de un material vegetal seleccionado, por medio de alguna técnica de extracción.

Una vez obtenido el extracto, se procede a concentrarlo, recuperando la mayor cantidad de disolvente, aplicando técnicas de destilación.

Identificara el extracto con algunas propiedades físicas.

RESULTADOS

Deberá incluir en su informe:

1. Las características físicas (color y consistencia) del extracto obtenido.
2. El Porcentaje de rendimiento del extracto.
3. Las figuras (los aparatos empleados).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Colorado V. D., Álvarez T., 2011, Extracción: Aislamiento de Trimiristina a partir de nuez moscada, universidad ICESI, Facultad de Ciencias Naturales, Laboratorio de química

Dominguez X.A, X. A. Domínguez S. 1982, Química Orgánica Experimental. Ed. LIMUSA. México

Jeffery G. H., J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney. 1989. VOGEL´s Textbook of Quantitativa Chemical Analysis. Longman Scientific & Technical. New York USA.

Lamarque A., j. Zygadlo, L. López, M. Torres, D. Maestri. 2008. Fundamentos Teóricos-Prácticos de Química Orgánica, ENCuentro, Córdoba Argentina

Núñez-González M., J.G. Baez-González, M.E. Castañeda-Garza, J.A. Heredia-Rojas. 2010 Pigmentos extraídos de las plantas del estado de Nuevo León. Alvarado Vázquez M.A., A.

Solano O. E., E. Pérez Pardo, F. Tomas Alonso, 1991, Técnicas de laboratorio de química orgánica, Universidad de Murcia, España, pag. 177.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Ault, A. (1997). *Techniques and Experiments for Organic Chemistry* (6th ed). Illinois: Waveland: Prospect Heights.

Durst H.D., G.W. Gokel, 2021 Química Experimental Editorial Reverté, S.A., Edición Ebook (PDF), Barcelona España.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	22 /222

- Eaton, D. C. (1989). *Laboratory investigations in Organic Chemistry*. USA: Mc Graw Hill.
- González R.M.E., J.I.B. Bueso, E.G. Castillo, 2020. *Organic chemistry laboratory manual*. Psylicom Distribuciones Editoriales.
- Grande T. C. D., 2013. *Manual de Prácticas de Química Orgánica Aplicada*. Editorial Bonaventura, Universidad de San Buenaventura, Colombia.
- Keese, R., Muller, R. K., y Toubé, T. P. (1990). *Métodos de Laboratorio de Química Orgánica*. México: Limusa.
- Lamarque, Alicia (Editora), 2008. Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica, Editorial Brujas. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbsp/detail.action?docID=3185981>.
- Landgrebe, J.A. (1992). *Theory and Practice in the Organic laboratory with microscale and Standard Scale Experiments* 4th ed. Brooks/Cole. U.S.A.
- Lehman, J.W. (1990) *Operational Organic Chemistry: A Laboratory Course Second* USA: Prentice Hall.
- Lenga, R.E. (1998) *The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data*. Milwaukee.W.I. Sigma Aldrich. USA.
- Pavia, L. and Lampman, G.S. (1995). *Introduction to Organic Laboratory techniques. A microscale Approach* (3rd ed). U.S.A: Saunders College Publishing
- Robards K., R. Danielle 2021, Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, ELSEVIER Academi Press.
- Rodríguez Y. M.S. y Gómez C. F. (2008). *Curso Experimental en Química Orgánica*. Editorial Síntesis. Madrid España.
- Sánchez y García Figueroa F.L., (Editora), 2018. *Técnicas Básicas del laboratorio de Química Orgánica*, UNAM, FES Zaragoza.
- Skoog, D. A., Holder, F.J., y Stanley P.C., 2012. *Principles of Instrumental Analysis*. (6th ed), Thomson Brooks/Cole USA.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	23 /222

EXPERIMENTO 2

SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA EXTRAÍDA MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA Y COLUMNA

OBJETIVO GENERAL

- Separar la mezcla extraída por el método de cromatografía aplicando las técnicas de cromatografía en capa fina y columna.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Separar mediante cromatografía en capa fina los componentes de una mezcla o extracto
- Calcular el R_f de los compuestos separados
- Separar con la técnica de cromatografía en columna las sustancias orgánicas aisladas.
- Verificar la separación de las sustancias del extracto por cromatografía en capa fina.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El empleo de los colorantes es un arte muy antiguo. Existen pruebas, en efecto, de que los tintes vegetales eran conocidos antes de que el hombre empezara a registrar su historia por escrito. Antes de este siglo, todos los colorantes se obtenían de fuentes naturales, ya fueran plantas o animales (Pavia *et al.*, 1978).

Años después se despertó el interés de separar esos colorantes (ej. pigmentos vegetales), de manera que, en 1903, el botánico ruso Mikhail Tswett (1871-1919) descubrió que al filtrar colorantes de plantas a través de una columna de carbonato de calcio era posible separarlos. A este procedimiento se le conoce como "cromatografía". Más tarde, en los años 40s, Izmailov y Shraiber describieron el principio de la cromatografía en capa fina y posteriormente en 1958 Egon Stahl la nombró como una técnica que utiliza láminas de vidrio con capas más delgadas de alúmina y estandarizó los equipos y las sustancias involucradas (adsorbentes) (Sánchez *et al.*, 2018).

Según Domínguez (1982), la cromatografía es la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución diferencial de dos fases, una estacionaria y otra móvil. Existen varias técnicas de cromatografía, según la naturaleza de las fases involucradas y si los compuestos son retenidos en la fase estacionaria por adsorción o partición.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	24 /222

Sin embargo, más tarde, en 1993, un comité especial de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada consideró a la cromatografía como "... un método, utilizado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el que los componentes se distribuyen entre dos fases, uno de los cuales es estacionario mientras que el otro se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido-líquido soportado sobre un sólido o un gel y puede empaquetarse en una columna, esparcirse como una capa o distribuirse como una película... La fase móvil puede ser gaseosa o líquida" (Robards y Ryan, 2022).

Durante el desarrollo de la cromatografía, se da un equilibrio dinámico en el cual las moléculas constantemente se adsorben a la fase estacionaria y se desorben en el eluyente; se trata de un equilibrio de distribución en dos fases.

El eluyente pasa por la fase estacionaria en la que se ha colocado a la muestra y contribuirá al desplazamiento de los componentes de la mezcla en función de la afinidad de las moléculas con el eluyente (Sánchez *et al.*, 2018).

Por consiguiente, en la cromatografía se llevan a cabo dos procesos los cuales son: **adsorción** que es la capacidad de una sustancia sólida llamada adsorbente, para detener o concentrar selectivamente sobre su superficie estacionaria gases líquidos que van en una disolución en movimiento (Domínguez y Domínguez, 1982). Por otra parte, la **absorción** se da cuando una sustancia se introduce en la estructura de otra, como el agua en una esponja; existe una penetración física de una fase en la otra (Sánchez *et al.*, 2018).

Las sustancias interactúan con el adsorbente mediante interacción dipolo-dipolo o mediante enlaces de hidrógeno si es que lo presentan, el disolvente (eluyente) en función de su polaridad hará que los compuestos se muevan a lo largo de la fase estacionaria a diferentes velocidades, con el que se logra la separación (Sánchez *et al.*, 2018).

ACTIVIDADES PREVIAS

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo experimental:

1. Cromatografía, tipos, técnicas, fundamento teórico de la cromatografía de adsorción y partición.
2. Cromatografía en capa fina y columna, fundamento teórico.
3. Cromatografía de capa fina y cromatografía de columna, material que se utiliza y esquema de los sistemas.
4. Precauciones al preparar cada tipo de cromatografía.
5. Preparación de las placas, activación y cámaras de elusión en la cromatografía en capa fina.
6. Conceptos de polaridad, eluyente y adsorbente.
7. Reveladores empleados en cromatografía.
8. Definición de los términos R_f y R_x . Usos y aplicaciones.
9. Aplicaciones de la cromatografía en capa fina y en columna.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	25/222

MATERIAL Y REACTIVOS

- Portaobjetos
- Papel filtro
- Frascos con tapa
- Buretas
- Probetas
- Vasos de precipitado de volúmenes variados
- Pipetas graduadas de volúmenes variados
- Columna cromatográfica
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos con nuez
- Pinzas de bureta
- Matraz balón

REACTIVOS

Hexano ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

- Tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)
- Cloroformo (CHCl_3)
- Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- Alcohol metílico (CH_3OH)
- Acetato de etilo $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$.
- Acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$)
- Cloruro de metilo o diclorometano (CH_2Cl_2)
- Éter etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$)
- Isopropanol $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
- Gel de sílice (SiO_2)

EQUIPO

- Parrillas de calentamiento
- Estufa eléctrica
- Lámpara de luz ultravioleta



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	26 /222

SERVICIOS

- Gas
- Sistema de extracción en el laboratorio y campanas
- Vacío
- Energía eléctrica
- Agua
- Drenaje
- Lámpara de luz de emergencia

PROCEDIMIENTO

Realizar la cromatografía en capa fina del extracto obtenido en el Experimento 1, para determinar el eluyente ideal en la separación.

Efectuar la separación por cromatografía en columna.

Corroborar la separación y purificar por medio de cromatografía en capa fina los compuestos obtenidos de la separación en cromatografía en columna.

RESULTADOS

1. El registro de resultados de la elución en las placas cromatográficas, especificando eluyente y adsorbente utilizado.
2. Determinar los valores de R_f y R_x en su caso.
3. Las figuras y cuadros de resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pavia, L. and Lampman, G.S. (1978). *Introduction to Organic Laboratory techniques. A microscale Approach* (3rd ed). U.S.A: Saunders College Publishing
- Robards K. and Ryan D., (2022). *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. 2nd Ed. Ebook, Academic Press Elsevier, United Kingdom. P 1612.
- Sánchez y García Figueroa F.L., (Editora), 2018. *Técnicas Básicas del laboratorio de Química Orgánica*, UNAM, FES Zaragoza.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

- Ault A. (1997). *Techniques and Experiments for Organic Chemistry* (6th ed). Illinois: Waveland: Prospect Heights.
- Christian, G. D. (2009). *Química analítica*. McGraw Hill/Interamericana Editores.
- Browning, D.R. (1971). *Cromatografía*. Barcelona: Toray•Masson.
- Colorado V. D., Álvarez T., 2011, Extracción: Aislamiento de Trimiristina a partir de nuez moscada, universidad ICESI, Facultad de Ciencias Naturales, Laboratorio de química



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	27 /222

Durst H.D., G.W. Gokel, 2021 Química Experimental Editorial Reverté, S.A., Edición Ebook (PDF), Barcelona España

Eaton, D. C. (1989). *Laboratory investigations in Organic Chemistry*. USA: Mc Graw Hill.

González R.M.E., J.I.B. Bueso, E.G. Castillo, 2020. *Organic chemistry laboratory manual*. Psylicom Distribuciones Editoriales.

Grande T. C. D., 2013. *Manual de Prácticas de Química Orgánica Aplicada*. Editorial Bonaventura, Universidad de San Buenaventura, Colombia.

Jeffery G. H., J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney. 1989. *VOGEL's Textbook of Quantitativa Chemical Analysis*. Longman Scientific & Technical. New York USA.

Keese, R., Muller, R. K., y Toubé, T. P. (1990). *Métodos de Laboratorio de Química Orgánica*. México: Limusa.

amarque A., j. Zygadlo, L. López, M. Torres, D. Maestri. 2008. *Fundamentos Teóricos-Prácticos de Química Orgánica*, ENCUESTRO, Córdoba Argentina

Landgrebe, J.A. (1992). *Theory and Practice in the Organic laboratory with microscale and Standard Scale Experiments* 4th ed. Brooks/Cole. U.S.A.

Lehman, J.W. (1990) *Operational Organic Chemistry: A Laboratory Course Second* USA: Prentice Hall.

Lenga, R.E. (1998) *The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data*. Milwaukee.W.I. Sigma Aldrich. USA

Núñez-González M., J.G. Baez-González, M.E. Castañeda-Garza, J.A. Heredia-Rojas. 2010 *Pigmentos extraídos de las plantas del estado de Nuevo León*. Alvarado Vázquez M.A., A.

Robards K., R. Danielle 2021, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, ELSEVIER Academi Press.

Rodríguez Y. M.S. y Gómez C. F. (2008). *Curso Experimental en Química Orgánica*. Editorial Síntesis. Madrid España.

Seamus P.J.H. (2008). *Analytical Chemistry*. USA: Oxford University Press.

Skoog, D. A., Holder, F.J., y Stanley P.C., 2012. *Principles of Instrumental Analysis*. (6th ed), Thomson Brooks/Cole USA.

Solano O. E., E. Pérez Pardo, F. Tomas Alonso, 1991, *Técnicas de laboratorio de química orgánica*, Universidad de Murcia, España, pag. 177.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	28 /222

EXPERIMENTO 3.

SEPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE UN VEGETAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA.

OBJETIVO GENERAL

- Extraer y separar el aceite esencial de un material vegetal mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor de agua.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aplicar la destilación por arrastre de vapor en la separación de un aceite esencial.
- Separar el aceite esencial contenido en el codestilado por medio de la extracción líquido-líquido discontinua y concentrar el aceite extraído.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los aceites esenciales o esencias vegetales son productos contenidos en las plantas, formados biosintéticamente por vías del metabolismo secundario, se les cataloga como monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenil propanos. Los aceites esenciales se encuentran normalmente en los espacios intercelulares y vesículas de los tejidos vegetales y pueden estar distribuidos por toda la planta (flores, hojas, tallos, semillas, frutos, corteza) (Keese *et al.*, 1990; Landgrebe, 2005).

Los aceites esenciales, por lo general son menos densos que el agua, su densidad varía de 0.759 a 1.96 g mL^{-1} ; las características de cada aceite son específicas dependiendo de la fuente de la que se trate.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	29 /222

La destilación en corriente de vapor o arrastre con vapor de agua, es una técnica para la separación de sustancias insolubles o ligeramente solubles en agua y en algunos casos volátiles, con elevados puntos de ebullición.

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 éste.

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 éste caso, la presión del sistema es la suma de las presiones parciales de los componentes (Ley de las Presiones Parciales de Dalton).

ACTIVIDADES PREVIAS

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo experimental:

1. Fundamento teórico de la destilación por arrastre con vapor.
2. Usos de la destilación por arrastre con vapor.
3. Características de los compuestos para poder ser arrastrados con vapor.
4. Material y equipo empleados para la destilación por arrastre con vapor. Anexar esquema.
5. Ventajas que presenta adicionar cloruro de sodio a la fase acuosa donde se encuentra el producto en una destilación por arrastre de vapor de agua (efecto salino).
6. ¿Por qué el vapor que se condensa durante la destilación por arrastre con vapor es generalmente turbio?
7. ¿Qué es un disolvente activo?
8. ¿A qué se le llama codestilado en una destilación por arrastre con vapor?
9. ¿Cuál es la diferencia que existen entre un codestilado y un destilado puro?
10. Investigar pruebas de identificación físicas y químicas de aceites esenciales.
11. ¿Qué es un derivado, cuál es su utilidad práctica y cómo se prepara en función del compuesto a trabajar?
12. ¿Cuál es la influencia que tienen los puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares en una destilación por arrastre con vapor de agua?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	30 /222

- ¿Qué ventajas presenta la destilación por arrastre con vapor sobre la destilación a presión reducida?
- Uso de rotavapor, esquema y fundamento.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Aparato de arrastre con vapor de agua (ver anexo 1, fig. 13)
- Aparato de extracción líquido-líquido (ver anexo 1, fig. 14)
- Probetas
- Vasos de precipitado volúmenes variados
- Pipetas graduadas volúmenes variados
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos con nuez
- Matraz balón
- Portaobjetos
- Papel filtro
- Frascos con tapa

REACTIVOS

- Cloroformo (CHCl_3)
- Cloruro de metilo o diclorometano (CH_2Cl_2)
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
- Agua H_2O
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Iodo
- Permanganato de potasio (KMnO_4)

EQUIPO

- Parrillas de calentamiento
- Bomba de vacío
- Rotavapor
- Parrillas de calentamiento y agitación
- Canastillas de calentamiento con reóstato
- Estufa eléctrica
- Recirculadores



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	31 /222

SERVICIOS

- Gas
- Sistema de extracción en el laboratorio y campanas
- Vacío
- Energía eléctrica
- Agua
- Drenaje
- Lámpara de luz de emergencia

PROCEDIMIENTO

Desarrollo experimental

El alumno desarrollará la parte experimental considerando lo siguiente:

El aislamiento del aceite esencial de un material vegetal por el método de destilación y la técnica de arrastre de vapor de agua, realizará su recuperación mediante la técnica de extracción líquido-líquido, concentrar por una destilación simple y realizará una recuperación del aceite esencial.

La realización de las pruebas de identificación del aceite obtenido.

RESULTADOS

Deberá incluir en su informe:

1. Las características del aceite esencial obtenido.
2. El registro de resultados de la elusión en las placas cromatográficas, especificando eluyente y adsorbente utilizado.
3. Rendimiento teórico y experimental



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	32 /222

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Keese, R., Muller, R. K., y Toubé, T. P. (1990). *Métodos de Laboratorio de Química Orgánica*. México: Limusa.

Landgrebe, J.A. (2005). *Theory and Practice in the Organic laboratory with microscale and Standard Scale Experiments* 4th ed. Brooks/Cole. U.S.A.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

Ault A. (1997). *Techniques and Experiments for Organic Chemistry* (6th ed). Illinois: Waveland: Prospect Heights.

Christian, G. D. (2009). *Química analítica*. McGraw Hill/Interamericana Editores.

Colorado V. D., Álvarez T., 2011, Extracción: Aislamiento de Trimiristina a partir de nuez moscada, universidad ICESI, Facultad de Ciencias Naturales, Laboratorio de química

Durst H.D., G.W. Gokel, 2021 *Química Experimental* Editorial Reverté, S.A., Edición Ebook (PDF), Barcelona España

Eaton, D. C. (1989). *Laboratory investigations in Organic Chemistry*. USA: Mc Graw Hill.

González R.M.E., J.I.B. Bueso, E.G. Castillo, 2020. *Organic chemistry laboratory manual*. Psylicom Distribuciones Editoriales.

Grande T. C. D., 2013. *Manual de Prácticas de Química Orgánica Aplicada*. Editorial Bonaventura, Universidad de San Buenaventura, Colombia.

Jeffery G. H., J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney. 1989. *VOGEL's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*. Longman Scientific & Technical. New York USA.

Lamarque A., j. Zygadlo, L. López, M. Torres, D. Maestri. 2008. *Fundamentos Teóricos-Prácticos de Química Orgánica*, ENCUENTRO, Córdoba Argentina

Lehman, J.W. (1990) *Operational Organic Chemistry: A Laboratory Course Second* USA: Prentice Hall.

Lenga, R.E. (1998) *The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data*. Milwaukee.W.I. Sigma Aldrich. USA

Núñez-González M., J.G. Baez-González, M.E. Castañeda-Garza, J.A. Heredia-Rojas. 2010 *Pigmentos extraídos de las plantas del estado de Nuevo León*. Alvarado Vázquez M.A., A.

Pavia, L. and Lampman, G.S. (1995). *Introduction to Organic Laboratory techniques. A microscale Approach* (3rd ed). U.S.A: Saunders College Publishing

Robards K., R. Danielle 2021, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, ELSEVIER Academi Press.

Rodríguez Y. M.S. y Gómez C. F. (2008). *Curso Experimental en Química Orgánica*. Editorial Síntesis. Madrid España.

Sánchez y García Figueroa F.L., (Editora), 2018. *Técnicas Básicas del laboratorio de Química Orgánica*, UNAM, FES Zaragoza.

Seamus P.J.H. (2008). *Analytical Chemistry*. USA: Oxford University Press.

Skoog, D. A., Holder, F.J., y Stanley P.C., 2012. *Principles of Instrumental Analysis*. (6th ed), Thomson Brooks/Cole USA.

Solano O. E., E. Pérez Pardo, F. Tomas Alonso, 1991, *Técnicas de laboratorio de química orgánica*, Universidad de Murcia, España, pag. 177.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	33 /222

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA UNIDAD.

1. Lista de cotejo

CRITERIO	%
Actividades previas Anteproyecto	20
Trabajo experimental	30
Examen (aprobatorio)	30
Informe	20
TOTAL	100

NOTA: Todos los puntos deberán ser aprobados.

2. Deberá realizar **TODAS** las actividades previas.

3. Anteproyecto o Plan de Trabajo.

GUÍA PARA LA ELABORACIÓN DEL ANTEPROYECTO

- Título.
- Objetivo.
- Hipótesis.
- Variables.
- Características del material vegetal a trabajar (nombre científico, origen, endemismo, nombre científico del compuesto a extraer).
- Metodología (desarrollada en prosa y lógicamente redactada, con esquemas del o los aparatos a emplear).
- Listado de material, reactivos (hojas de seguridad).
- Diagrama de flujo del procedimiento.
- Bibliografía consultada, reportada en formato APA.

NOTA: El anteproyecto es indispensable para poder iniciar el experimento.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	34 /222

4. INFORME FINAL.

Guía para la Elaboración del Informe.

4.1 Portada

Autor o autores.

Título.

Asesor.

Grupo.

Fecha.

4.2 Resumen

Incluye lo que se hizo y los resultados obtenidos comparados con los informados en la literatura. 2 puntos.

4.3 Introducción

Comentarios breves sobre el tema	0.5 PUNTO
Fundamento teórico	0.5 PUNTO
Objetivo (finalidad del experimento)	0.5 PUNTO
Hipótesis	0.5 PUNTO

4.4 Parte experimental

Técnica lógicamente redactada	0.5 PUNTO
Listado de material y reactivos	0.5 PUNTO
Diagrama de flujo	0.5 PUNTO
Esquema de los aparatos y equipos	0.5 PUNTO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	35 /222

4.5 RESULTADOS

Cálculos, rendimiento teórico y práctico, gráficas, esquemas, fotografías, todo lo obtenido.
2 PUNTOS.

4.6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Con base en el análisis de los resultados se contrasta la hipótesis señalando aciertos, errores y sugerencias que sirvan para mejorar el experimento. Además, se incluye en su caso las reacciones y mecanismos. 2 PUNTOS.

4.7 BIBLIOGRAFÍA

Reportada en formato APA.

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	36 /222

ANEXO 1. QUÍMICA ORGÁNICA

Rombo NFPA 704

La NFPA (National Fire Protection Association) es una entidad internacional voluntaria creada para promover la protección y prevención contra el fuego (Figura 2 y 3).

La Norma NFPA 704 establece un sistema de identificación de riesgos para que en un incendio o emergencia, las personas afectadas puedan reconocer los riesgos de los materiales y su nivel de peligrosidad respecto del fuego y diferentes factores. Establece a través de un rombo seccionado en cuatro partes de diferentes colores (Figura 2), indica los grados de peligrosidad de la sustancia a clasificar.



FIGURA 2. Rombo de peligrosidad de las sustancias (Tomado de: <https://www.logismarket.cl/carse/letrero/4690600978-2709082548-p.html>).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	37 /222



FIGURA 3. Manejo del extintor

(Tomada y modificada de <https://es.pinterest.com/pin/479492691554774042/>).

APAGUE EL FUEGO	
TIPO DE FUEGO	TIPO DE EXTINGUIDOR
Madera, Papel, Tela, Plástico	A ABC
Aceites, Grasa, Gasolina, Solventes	B BC ABC
Equipo eléctrico	BC ABC
Metales altamente flamables: Potasio, Sodio, Magnesio, Aluminio	D Especial

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	38 /222

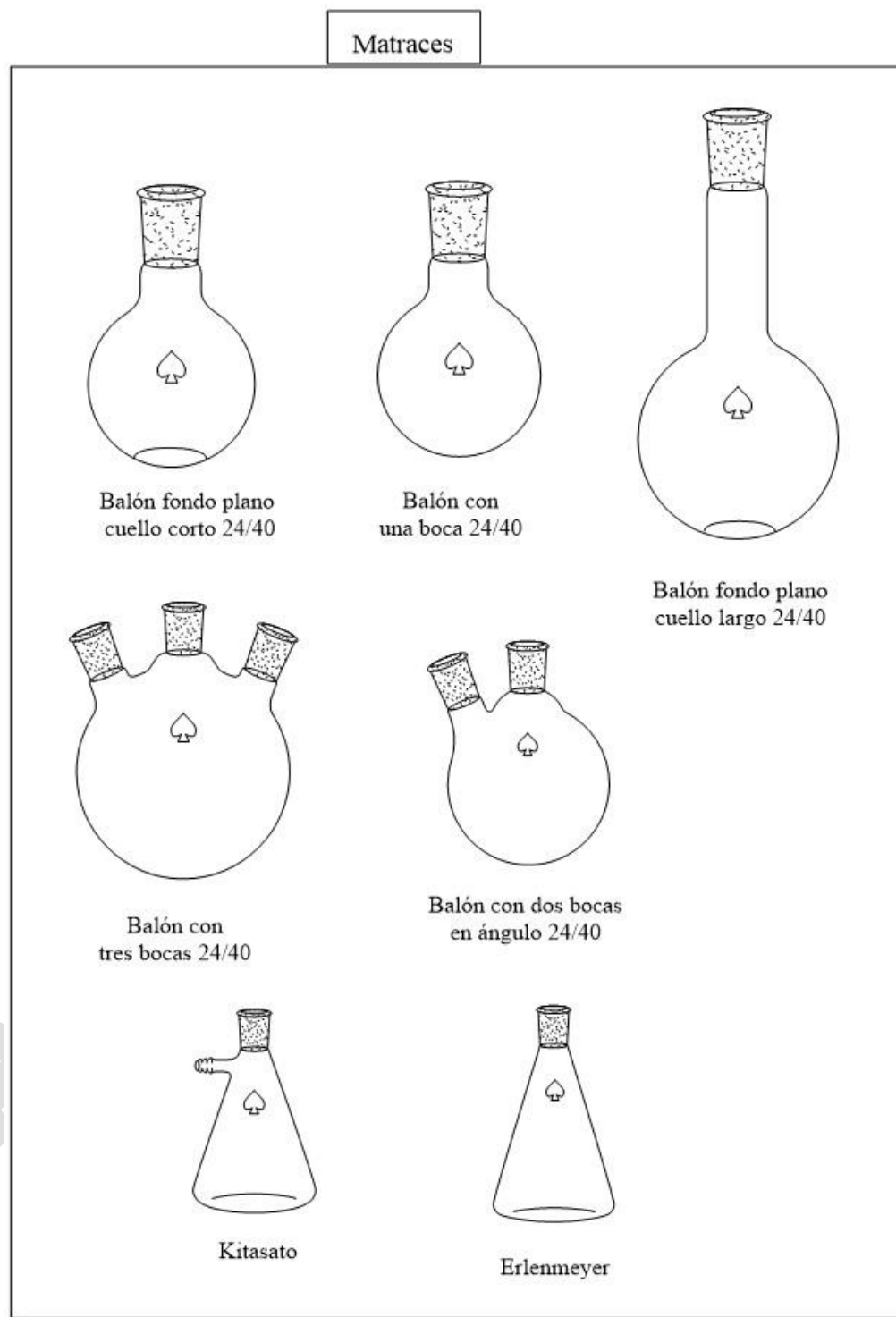


FIGURA 4. Tipos de Matraces (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	39 /222

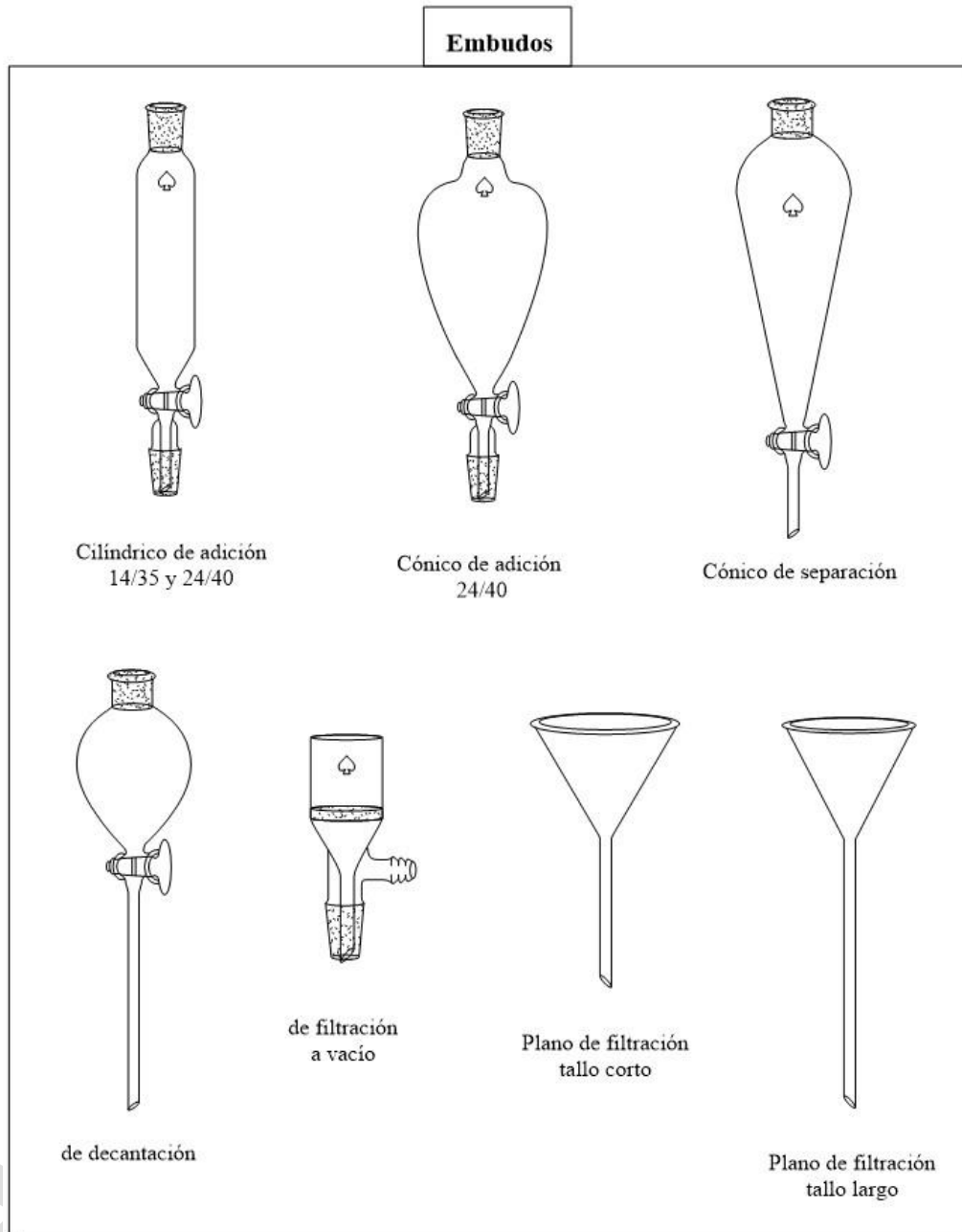


FIGURA 5. Tipos de embudos (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	40 /222

Refrigerantes

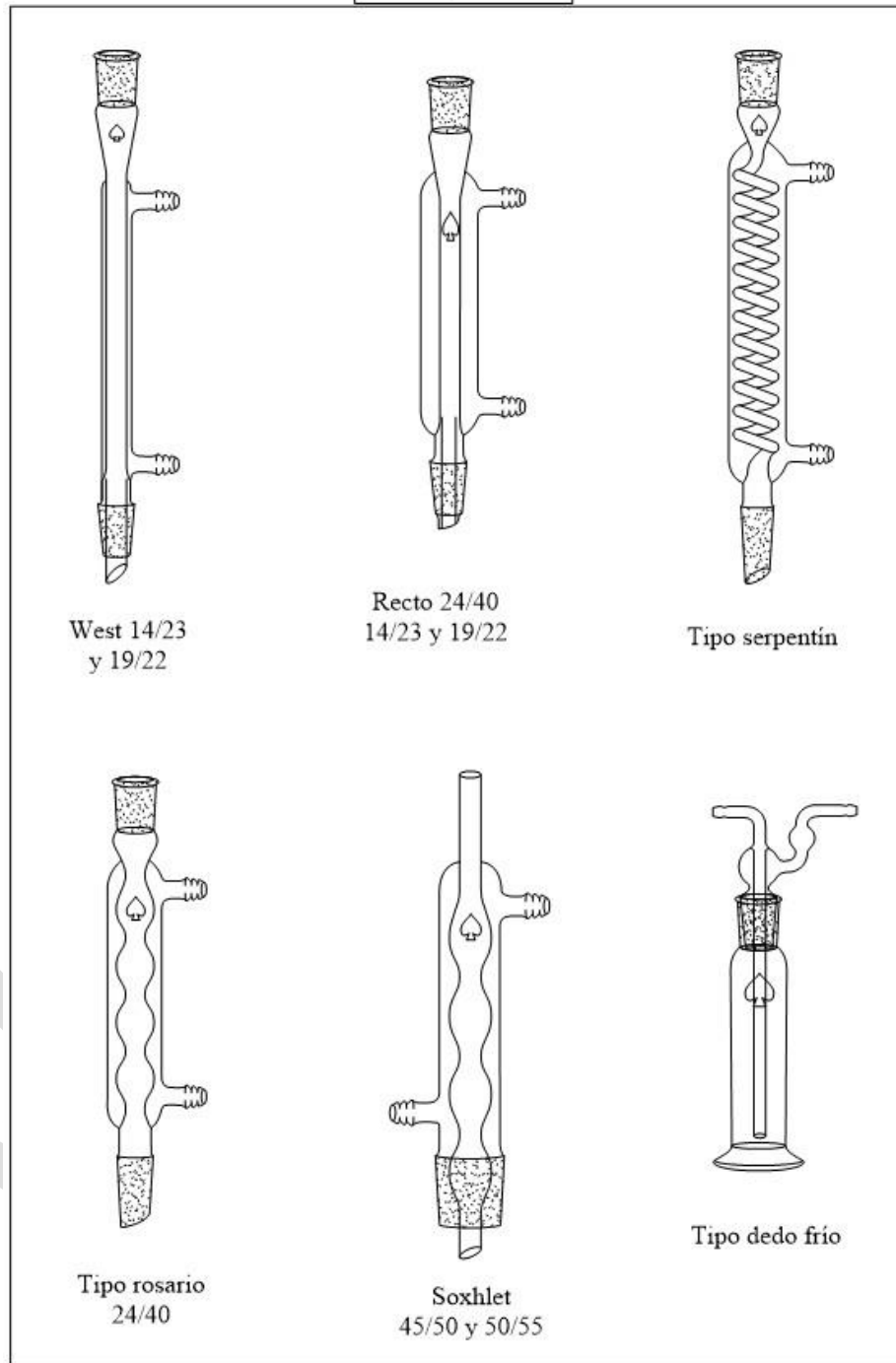


FIGURA 6. Tipos de refrigerantes o condensadores (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	41 /222

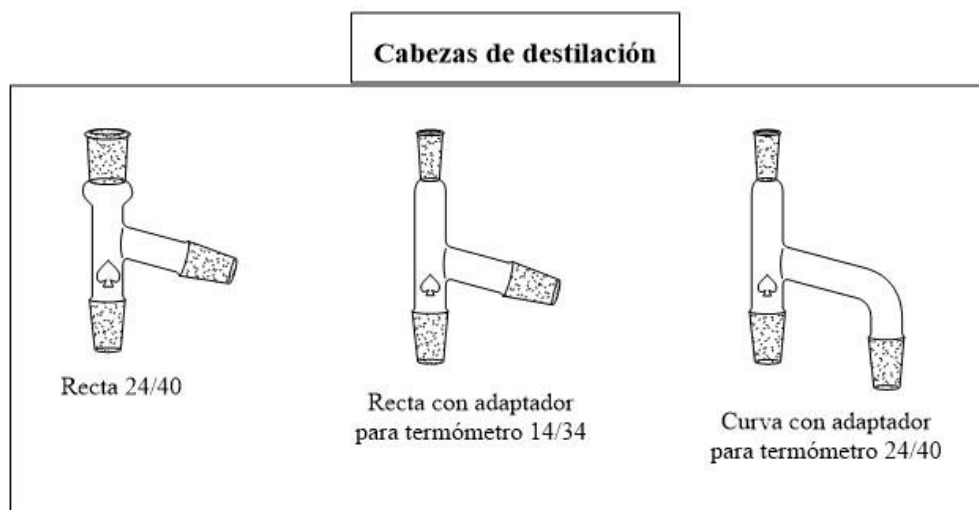


FIGURA 7. Tipos de cabezas de destilación (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

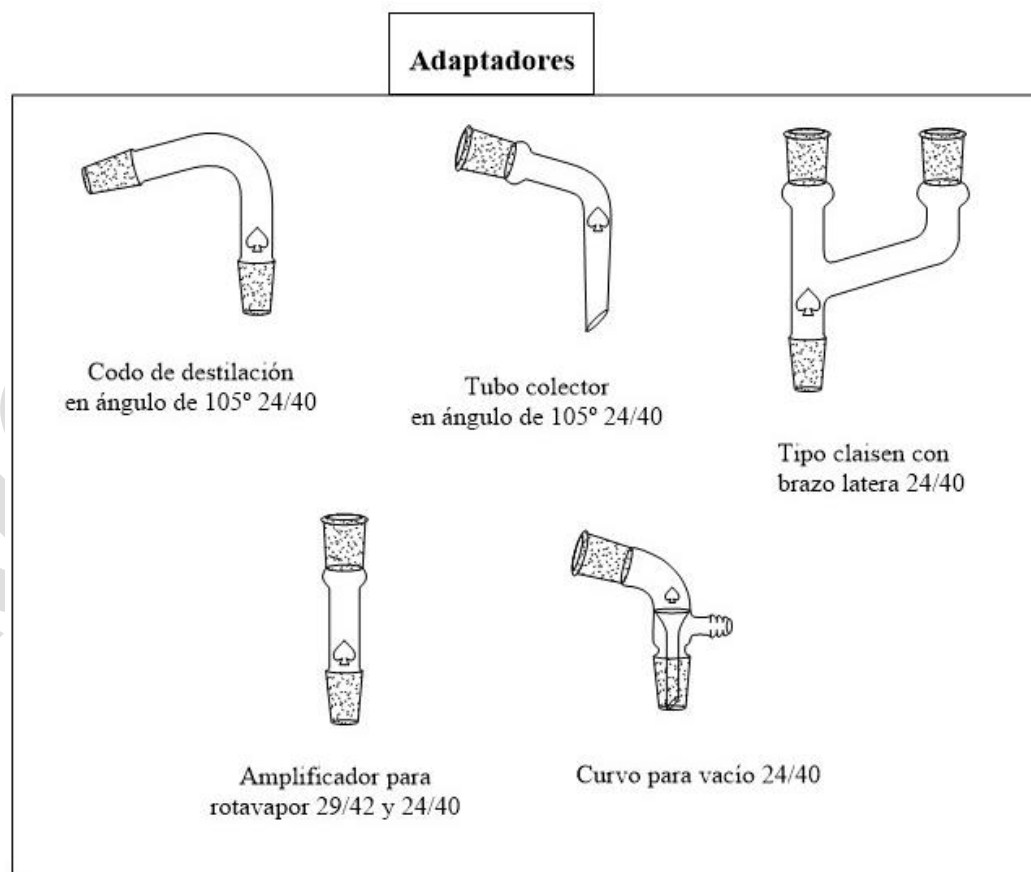


FIGURA 8. Tipos de adaptadores (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	42 /222

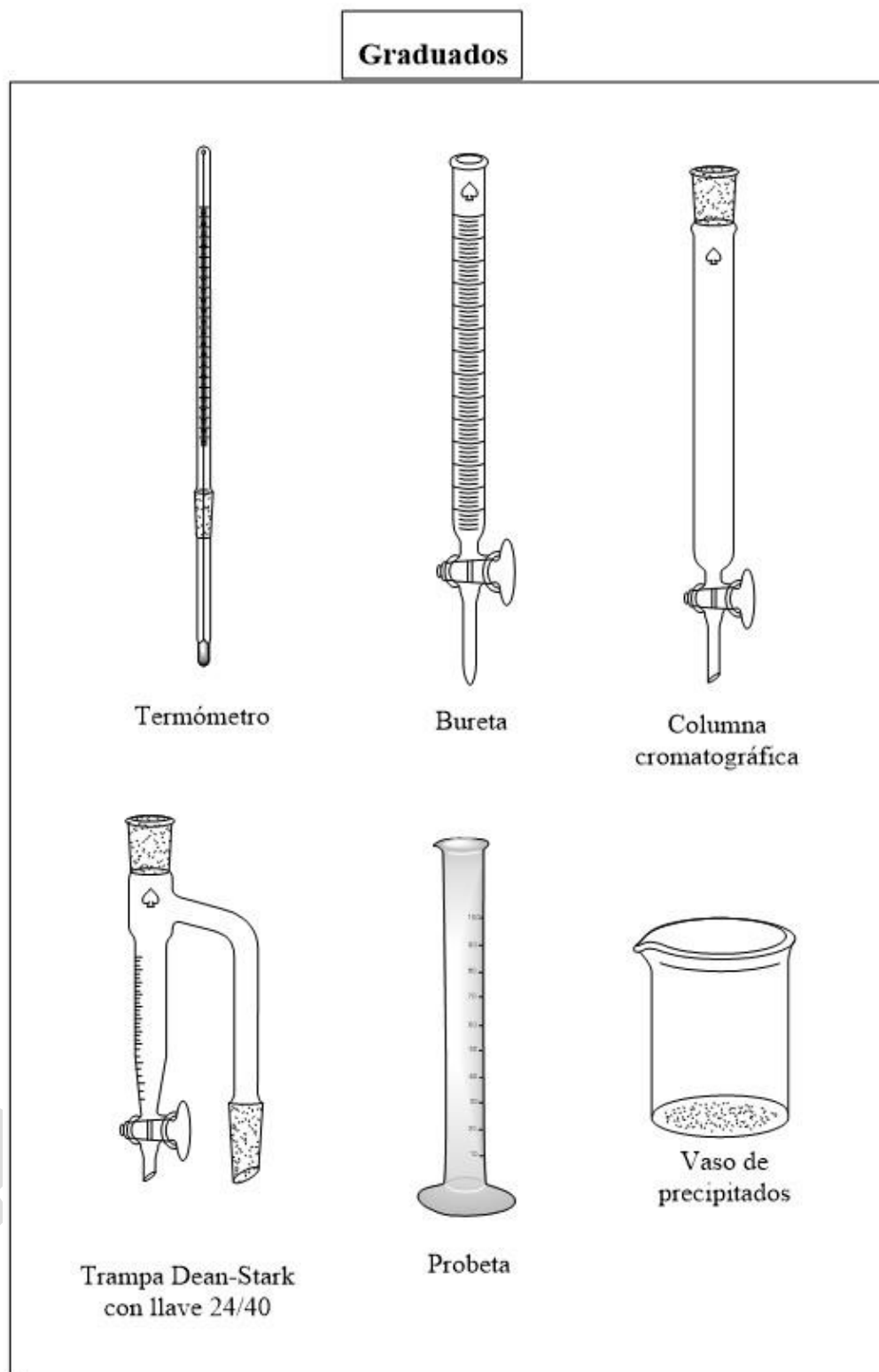


FIGURA 9. Tipos de material graduado (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	43 /222

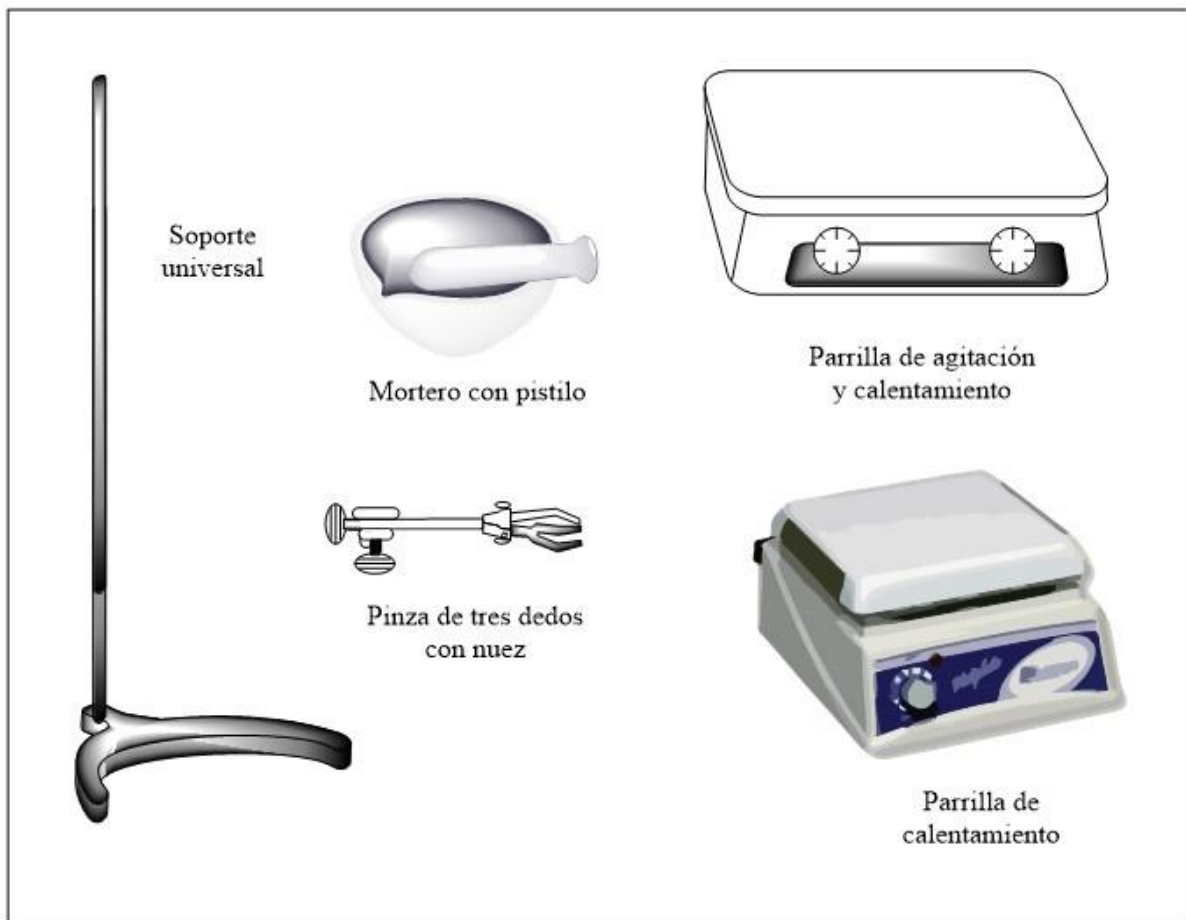


FIGURA 10. Materiales diversos (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

BAJO

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	44 /222

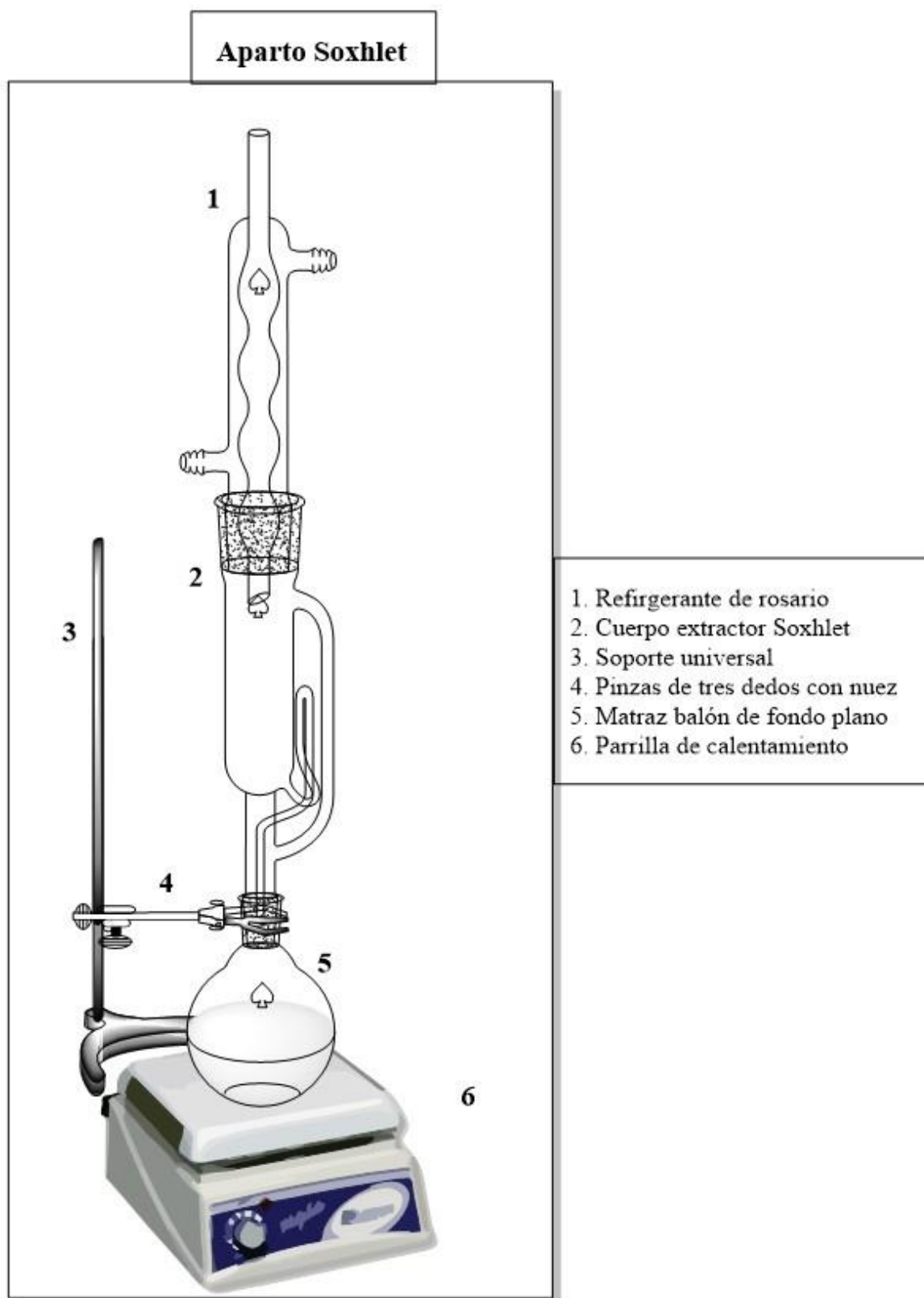
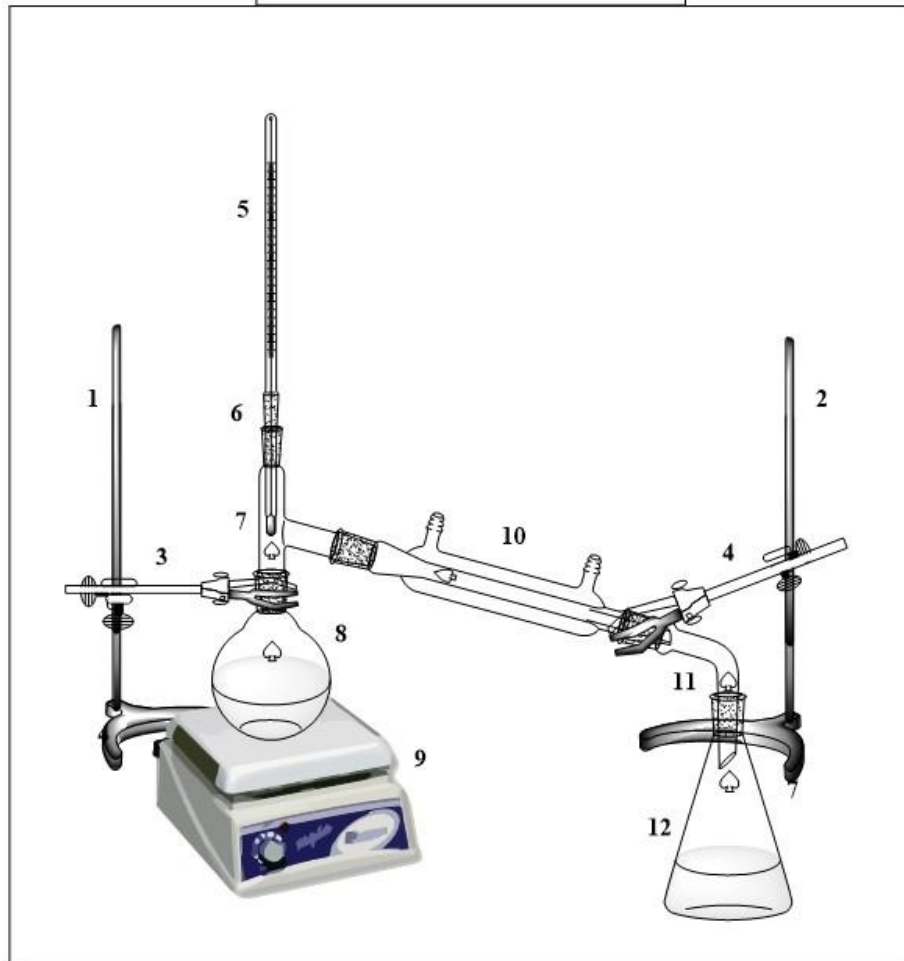


FIGURA 11. Aparato Soxhlet (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	/222

Aparato de destilación simple

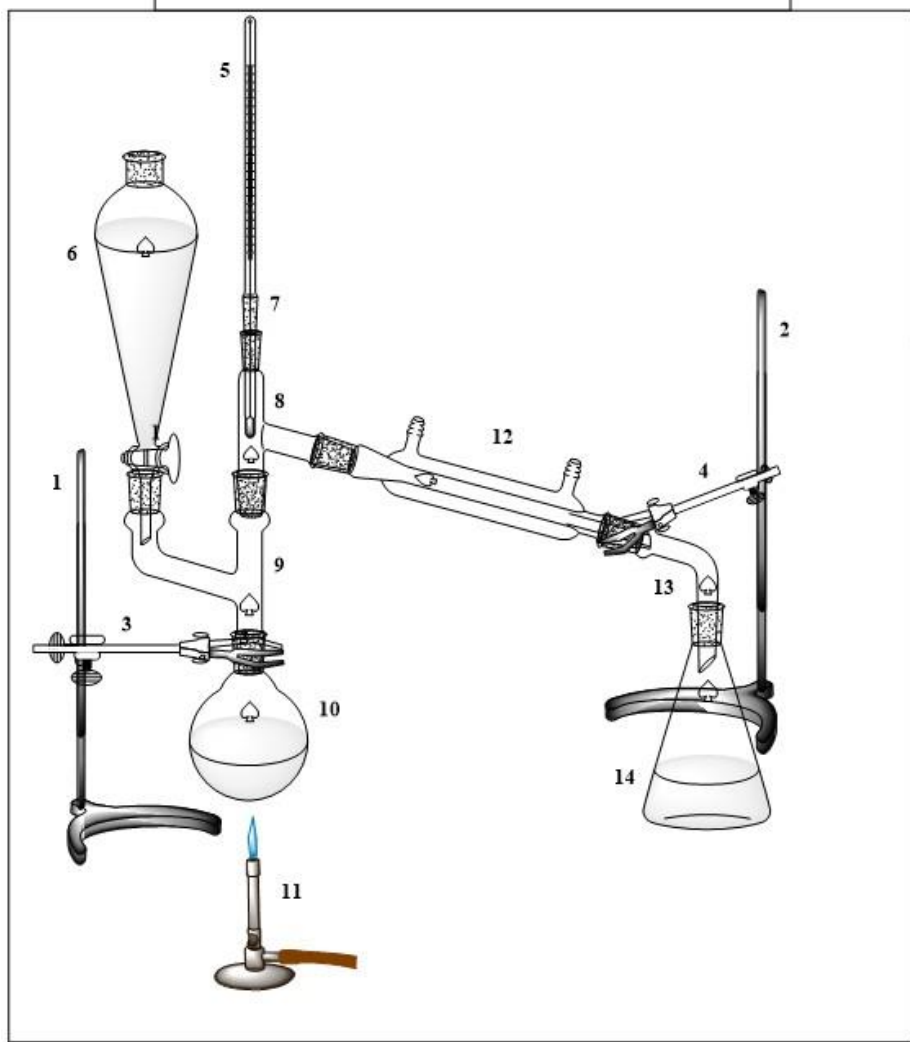


- 1, 2. Soporte universal
- 3, 4. Pinza de tres dedos con nuez
5. Termómetro
6. Adaptador para termómetro con neopreno
7. Cabeza de destilación
8. Matraz bola
9. Parrilla de calentamiento
10. Condensador recto
11. Tubo colector en ángulo 105°
12. Matraz Erlenmeyer

FIGURA 12. Aparato de destilación simple (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	/222

Aparato de destilación por arrastre con vapor de agua



- 1, 2. Soporte universal
- 3, 4. Pinza de tres dedos con nuez
5. Termómetro
6. Embudo de adición
7. Adaptador para termómetro con neopreno
8. Cabeza de destilación
9. Adaptador tipo Claysen
10. Matraz balón
11. Mechero Bunsen
12. Condensador recto
13. Tubo colector con ángulo 105°
14. Matraz Erlenmeyer

FIGURA 13. Aparato de destilación por arrastre con vapor de agua (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	/222

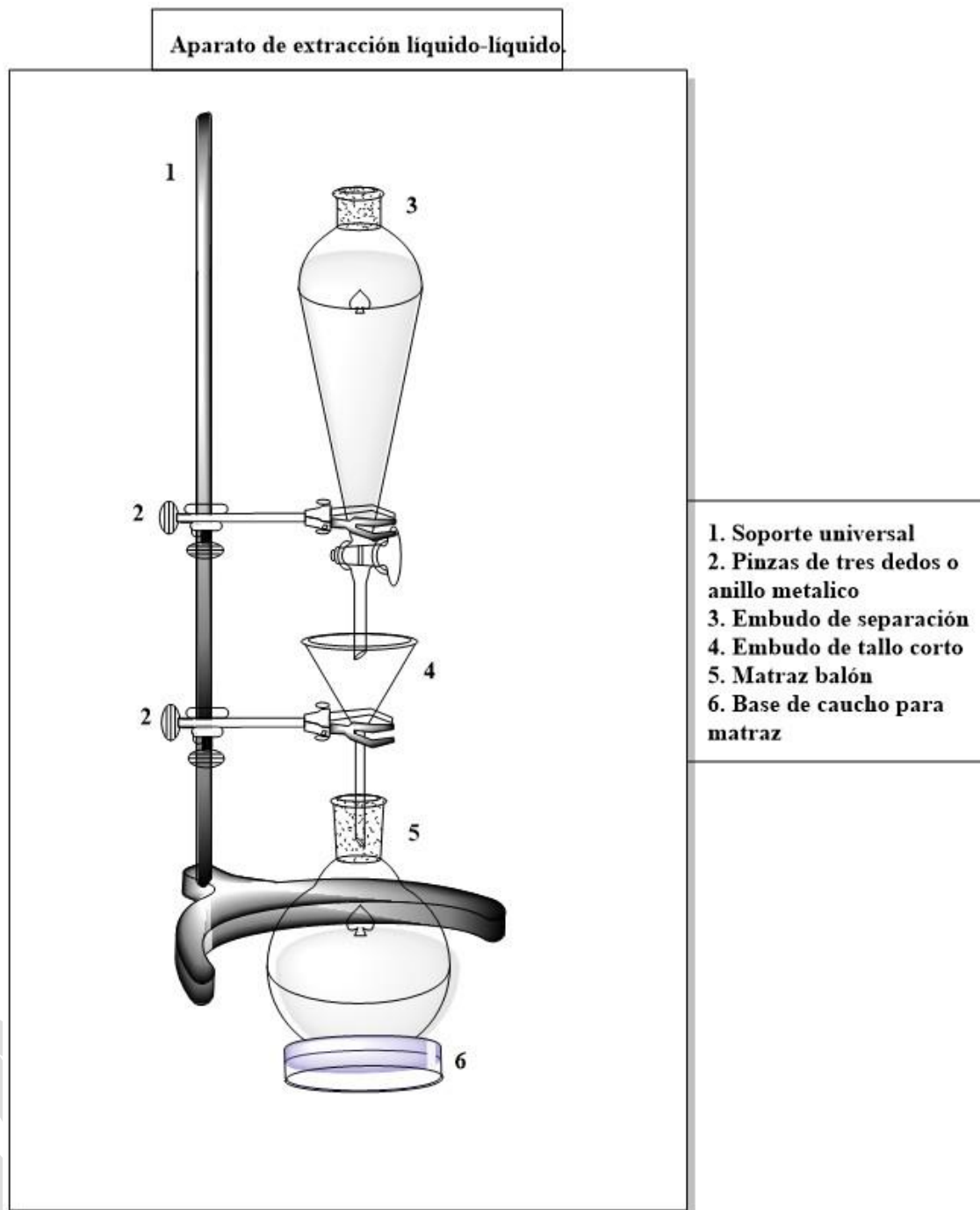
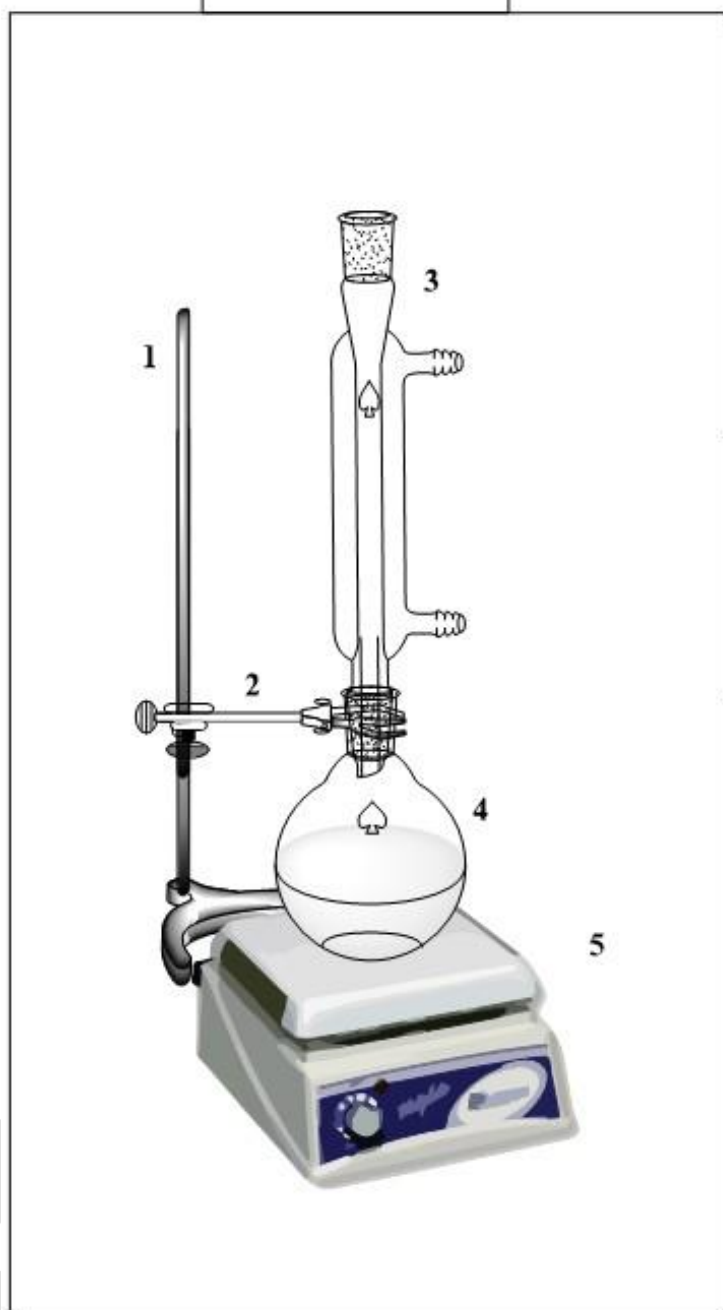


FIGURA 14. Aparato de extracción líquido-líquido (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	/222

Aparato de reflujo



1. Soporte universal
2. Pinza de tres dedos con nuez
3. Refrigerante recto
4. Matraz balón
5. Parrilla de calentamiento

FIGURA 15. Aparato de reflujo (Elaborados con el software ChemBioDraw Ultra 14.0).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	45 /222

UNIDAD 2 GENÉTICA

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	46 /222

GENÉTICA

INTRODUCCIÓN DE LA UNIDAD

Bienvenidos al estudio de la genética, campo de la Biología que resulta sumamente interesante y fascinante. El conocimiento de la información genética permite comprender el funcionamiento de la célula, el fenotipo de un organismo y la transmisión de la información a través de las generaciones en todas las especies; procesos necesarios para el entendimiento de la vida y la biosfera, que contribuyen de manera importante en el desarrollo y 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, la etología que determinan un mejor y completo entendimiento de éstas.

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 décadas, nos hemos visto obligados a actualizar nuestros conocimientos de forma constante. Cada avance se convierte en piedra angular en la que se basa el progreso posterior. Por lo tanto, es estimulante encontrarse inmerso en estos progresos ya sea como alumno, docente e investigador de la genética.

OBJETIVOS DE LA UNIDAD



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	47 /222

Introducir al alumno en el manejo de técnicas que se aplican en los procesos genéticos básicos, que van desde la identificación de fenotipos y manejo de cruza que da una aproximación a 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 Observación de cromosomas metafásicos (de médula ósea de ratón o de linfocitos humanos). 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 óptimo desarrollo de las mismas, logrando la adquisición de conocimientos y habilidades por parte de los estudiantes que cursan el segundo semestre de la carrera de Biología.

BAJO CONCEPTE



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	48 /222

PRÁCTICA 1. LEYES DE MENDEL Y HERENCIA LIGADA AL SEXO

OBJETIVOS GENERALES

- Adquirir la información y destreza necesaria para manipular, mantener y reconocer las cepas de *Drosophila melanogaster* que se le entreguen al alumno para experimentos posteriores.
- Adquirir la habilidad de identificar las diferencias fenotípicas entre hembras y machos de *Drosophila melanogaster*.
- Desarrollar de manera teórica el manejo de las leyes de Mendel, utilizando como base los diferentes genotipos de *Drosophila melanogaster*.

FUNDAMENTO TEÓRICO

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 Gregorio Mendel (Figura 1), quién describió en 1865 las reglas que gobiernan la transmisión de los caracteres hereditarios, al realizar sus experimentos sobre la hibridación en plantas de chícharo (*Pisum sativum*), en el huerto aldeaño a su monasterio.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	49 /222

FIGURA 1. Gregorio Mendel

(Tomado de nih.gov/popup_htm/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 una por una y 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 la interpretación biológica correcta; las células germinales contienen los factores hereditarios (Bruce *et al.*, 2011).

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 melanogaster*. Un gen había experimentado un cambio que resultó en una alteración fenotípica. Este cambio se

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	50 /222

expresó como ojos blancos en lugar de los ojos rojos normales. El macho de ojos blancos que se descubrió, primero se cruzó con una hembra de ojos rojos. Todas las moscas de la generación F_1 tenían ojos rojos, pero la F_2 incluyó 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 F_2 fueron machos. Alrededor de la mitad de los machos de la F_2 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 llegó a una explicación asociando a este gen con el cromosoma X (Valpuesta, 2008).

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 cruzaas reciprocas producen resultados en la progenie diferentes; la expresión fenotípica de los genes ligados al sexo es más frecuente en los machos que en las 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 porqué 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.

Drosophila es un género cosmopolita del cual existen alrededor de 1500 spp., siendo la más utilizada en los laboratorios de investigación (Figura 2). Esta mosca es un insecto holometábolo, su ciclo vital consta de 4 estadios: huevo, larva de primero, segundo y de tercer estadio, pupa y el imago adulto.



FIGURA 2. Cepas de *Drosophila melanogaster* (Tomado de <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/Drosophila/Drosophila.htm>)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	51 /222

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.
- Abundante en todo el mundo.
- El cultivo en el laboratorio es fácil y económico.
- 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 ha acumulado bastante literatura a la cual podemos remitirnos para solucionar dudas y tener bases sólidas para estudios posteriores.
- Las mutaciones son comunes y fácilmente inducibles.
- Pueden observarse y manejarse muchos caracteres externos.
- Su embriología y ciclo de vida han sido perfectamente estudiados.

Clasificación taxonómica

Phylum: Artropoda

Subphylum: Hexápoda

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Familia: Drosophilidae

Género: *Drosophila*

Especie: *Drosophila melanogaster*

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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	52 /222

Ciclo de vida

Tiene cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3). La duración de estos estadios varía con algunos factores, de los cuales el más importante es la temperatura. A 20°C, transcurren 8 días de huevo a larva y el estado pupal dura 4 a 4.5 días.

Huevo: Las moscas hembra 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 (Pierce, 2009).

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. (Figura 4). Viven aproximadamente 1 mes y mueren.



FIGURA 3. Ciclo de vida (Tomada de www.educa.madrid.org).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	53 /222

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.

Medios de cultivo

Drosophila melanogaster crece sobre frutos suaves como la uva, el plátano y la ciruela, especialmente cuando éstos están demasiado maduros y la fermentación se ha iniciado. Los adultos y las larvas se alimentan con los jugos de las frutas fermentadas y de ahí que las



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	54 /222

levaduras parecen ser un factor fundamental de su dieta. Pueden crecer prácticamente en cualquier medio de fermentación.

Los componentes del medio de cultivo son: harina de maíz, levadura de cerveza seca activa, miel de maíz, agar-agar y nipagín, todo esto se emplea para obtener un medio semisólido, rico en nutrientes y libre de contaminación de hongos, que favorecen el desarrollo y propagación que se requieren en las etapas sucesivas del cultivo de *Drosophila* (Demerec *et al.*, 1975).

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

- Moscas *Drosophila melanogaster* tipo silvestre en sus diferentes estadios de desarrollo.
- Cepas mutantes de *Drosophila melanogaster* en sus diferentes estadios de desarrollo: White, Vestigial, Yellow, Ebony o Brown.

Materiales diversos

- Probetas de 50 y 1000 mL
- Vidrio de reloj
- Pipeta de 5 mL
- Agujas de disección
- Recipiente de 500 mL de peltre o aluminio
- Pincel de cerdas finas
- Tapones de esponja de 5 cm de espesor
- Eterizador
- Frascos de 250 mL de boca ancha
- Cajas Petri
- Frascos y bolsas para residuos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	55 /222

REACTIVOS

- Éter etílico ((C₂H₅)₂O)
- Medio de cultivo: Preparar 300 mL
 - Agar-agar 3 g
 - Harina de maíz 18 g
 - Levadura seca activa 9 g
 - Miel de maíz 42 g
 - Agua potable 300 mL
 - Nipagin (CH₃(C₆H₄(OH)COO)) 10% P/V en etanol al 96% 3mL

EQUIPO

- Balanza granataria
- Parrilla de calentamiento
- Microscopio estereoscópico

SERVICIOS

- Agua
- Vacío
- Gas
- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	56 /222

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

1. ¿Qué ventajas presenta utilizar *D. melanogaster* en estudios de genética?
2. Descripción del ciclo de vida de *D. melanogaster*.
3. Características que permiten diferenciar el sexo en *D. melanogaster*.
4. ¿Cuáles son los elementos básicos del medio de cultivo? Indique su función.
5. Significado de los conceptos: gen, alelo, cromosoma, homocigoto, heterocigoto, locus, fenotipo, genotipo, cruce monohíbrido y dihíbrido.
6. Realizar diagramas que ejemplifiquen 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?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	57 /222

Desarrollo de la práctica

Preparación del medio de cultivo

En un recipiente de peltre o aluminio colocar 200 mL de agua potable, adicionar el agar- agar lentamente y agitando para evitar la formación de grumos (la disolución completa del agar- agar se logra en el momento en que la mezcla toma un aspecto transparente), póngalos a calentar en una parrilla eléctrica. Los 100 mL de agua restantes ocúpelos para disolver en frío los componentes sólidos del medio y asegurarse de no dejar residuos en el recipiente e incorporar todo al medio. Añadir la miel mezclando hasta su disolución completa; posteriormente agregar la levadura y harina ya disueltas en agua, mantenga en agitación hasta ebullición, hervir de 10 a 20 min (tener cuidado de agitar durante toda la ebullición para que no se pegue el medio al recipiente).

Lavar con agua y jabón los frascos, secarlos perfectamente y humedecer las paredes internas con solución de nipagín.

Dejar enfriar el medio de cultivo un poco (hasta tolerar con el dorso de la mano) agregue la solución de nipagín y agitar, inmediatamente después, vaciar el medio de cultivo a los frascos, vierta en ellos aproximadamente 2 cm de altura de medio en cada frasco, tapar con la esponja de 5 cm de espesor.

Manejo de las moscas

Para el examen y selección de las moscas el primer paso es anestesiarlas, 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 una caja Petri para observarlas en el estereoscopio y analizarlas (para transferir las moscas anestesiadas, ayúdense con el pincel de cerdas finas). 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 sobrealergia que mataría a las moscas.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	58 /222

Comparación entre cepas mutantes y el tipo silvestre de *D. melanogaster*

Para el desarrollo de esta práctica se utilizarán algunas de las siguientes cepas de *Drosophila melanogaster* (Figura 5).



FIGURA 5. Cepas de *Drosophila melanogaster*

(Tomada de <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/Drosophila/Drosophila.html>).

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

Anestesiar 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 los esquemas adjuntos.

En caso de que las moscas se recuperen de la anestesia durante la observación proceder a reanestesiarlas utilizando un algodón que contenga unas gotas de éter, máximo por tres ocasiones para no sobre anestesiadas. Al terminar la observación regresar las moscas al frasco original.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	59 /222

Manejo de moscas

Los alumnos deberán anestesiar las moscas como se planteó anteriormente, colocar las moscas anestesiadas en una caja Petri y observar al microscopio, teniendo los cuidados necesarios mencionados con anterioridad. La diferenciación sexual se realizará con los criterios siguientes:

Para la identificación y diferenciación del sexo de *D. melanogaster*, esta especie presenta un claro dimorfismo sexual (Figura 6):

Características de las hembras:

- Es ligeramente más grande en comparación con el macho.
- Abdomen acabado en punta y más grueso que el del macho.
- Dorso del abdomen con bandas transversales oscuras y separadas unas de otras hasta el final del mismo.
- Presenta siete bandas a lo ancho de su cuerpo.

Características de los machos:

- Menor tamaño que las hembras.
- Extremo del abdomen redondeado.
- Las últimas bandas transversales del abdomen están fusionadas, lo que da una apariencia oscura al final del mismo, visible a simple vista.
- Presenta cinco bandas en lo ancho de su cuerpo, ya que las últimas están fusionadas y se ve una sola oscura.
- Poseen un peine sexual (quetas modificadas) en el primer segmento tarsiano del primer par de patas (Figura 6).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	60 /222

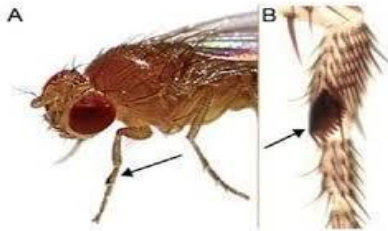


FIGURA 6. Morfología de *Drosophila melanogaster* y peine sexual del macho (Tomada de <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/Drosophila/Drosophila.html>).

Para la primera Ley de Mendel

Los alumnos guiados por el maestro deberán:

- En un frasco con medio de cultivo sembrar 5 hembras silvestres vírgenes y 5 machos mutantes, 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 mutantes, 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 (F₁), observarlas al estereoscopio 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 (F₂) observarlas, contar y anotar el número de hembras y machos de cada fenotipo.
- Elaborar el reporte de la práctica.

Para la segunda Ley de Mendel

- En un frasco con medio de cultivo, sembrar 5 hembras silvestres vírgenes Ebony con alas vestigiales y 5 machos silvestres. Rotular con la simbología adecuada la cruz e incluir la fecha de siembra y el nombre del alumno con marcador indeleble.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	61 /222

- En un segundo frasco realiza la cruce inversa sembrar 10 machos Ebony con alas vestigiales y 10 hembras silvestres. Rotular con la simbología adecuada la cruce 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 estereoscopio contar y anotar el número de hembras y machos y el fenotipo que presenten.
- Sembrar 5 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

Para herencia ligada al sexo

- Realizar una cruce 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 un frasco con medio de cultivo nuevo toda la F_1 .
- Al quinto día eliminar a los progenitores y esperar que emerja la F_2 . Observar con ayuda del estereoscopio, los fenotipos de las hembras y de los machos.
- Anotar las observaciones en la hoja de registro.

RESULTADOS

Con base a las cepas trabajadas en el laboratorio conteste las siguientes preguntas:

- Registre las diferencias fenotípicas de las cepas mutantes y tipo silvestre observadas.
- Registre las características fenotípicas que permiten diferenciar el sexo de las moscas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	62 /222

- Esquematice de las moscas observadas, las características fenotípicas que permiten diferenciar cepas mutantes y el sexo de las mismas.
- Esquematice las moscas observadas, anotar las características fenotípicas que permiten diferenciar las 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 F ₁	
Sembrar F ₁ x F ₁	
Retirar a los progenitores	
Emerge F ₂	



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	63 /222

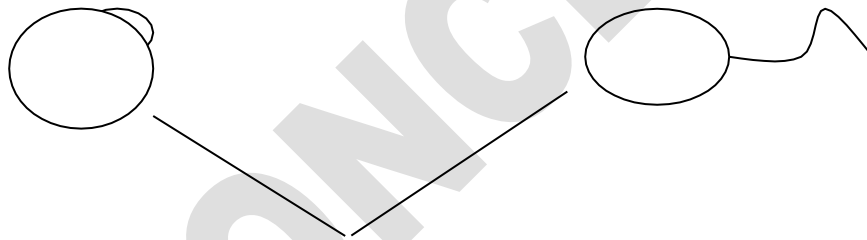
GUÍA DE CRUZAS EN EL LABORATORIO

Escriba en los espacios vacíos con la nomenclatura adecuada el producto de cruce monohíbrida.

P ♂ _____ x ♀ _____
 Fenotipo Fenotipo

Genotipo _____ x _____

Gametos

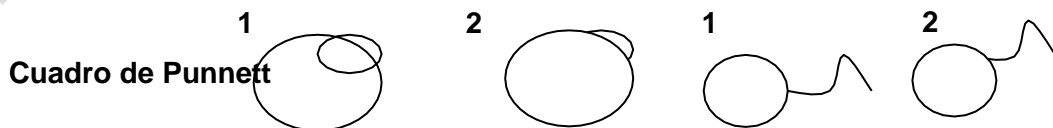


Genotipo F₁ _____

Fenotipo _____

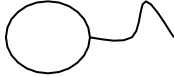

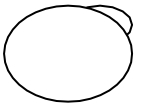
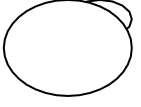
F₁ X F₁ ♂ _____ x ♀ _____
 Fenotipo Fenotipo

Gametos





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	64 /222

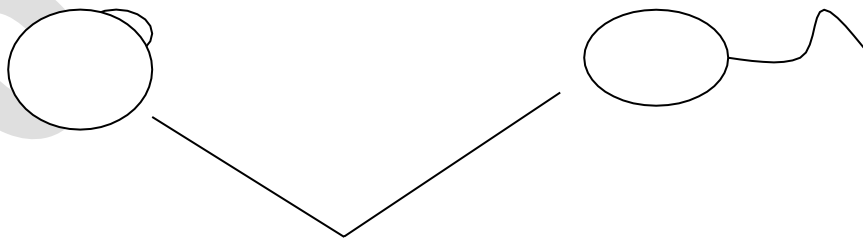
♀	♂	 1	 2
 1			
 2			

Escriba en los espacios vacíos con la nomenclatura adecuada el producto de cruce dihíbrida.

P ♂ _____ x ♀ _____
Fenotipo Fenotipo

Genotipo _____ x _____

Gametos



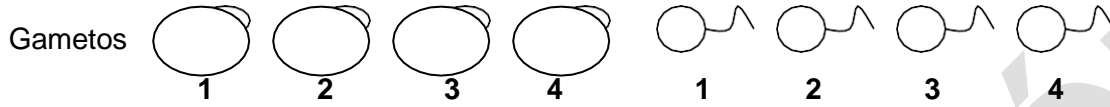
Genotipo F₁ _____

Fenotipo _____




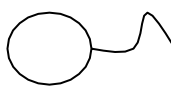






F₁ X F₁ ♂ _____ x ♀ _____
Fenotipo Fenotipo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	65 /222



Cuadro de Punnett

 	 1	 2	 3	 4
 1				
 2				
 3				
 4				



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	66 /222

BIBLIOGRAFÍA

Bruce, A., Bray, D., Hopkin, K., Lewis, J., y Johnson, A. (2011). *Introducción a la Biología Celular*. (3ª ed.), Buenos Aires, Argentina; Editorial Médica Panamericana.

Demerec, M., Petersen, B., y Félix, R. (1975). *Guía de Drosophila: introducción a la genética y citología de Drosophila melanogaster*. D.F., México; Instituto Nacional de Energía Nuclear.

Pierce, B. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. (3ª ed.), Madrid, España; Editorial Médica Panamericana.

Valpuesta, J. (2008). *A la búsqueda del secreto de la vida: Una breve historia de la Biología Molecular*. Madrid, España; Editorial Hélice.

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	67 /222

PRÁCTICA 2.

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ADN

OBJETIVO GENERAL

- Obtener, purificar e identificar el ácido desoxirribonucleico (ADN) de una muestra de material vegetal seco, mediante una técnica sencilla y de fácil aplicación.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El ácido desoxirribonucleico (DNA 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. Una de las propiedades que destacan al ADN es su elevada viscosidad en soluciones acuosas, así como su fragilidad (Hardin, 2001).



FIGURA 1. Watson y Crick
(Tomada de <http://physicsweb.org>).

En cuanto a la estructura del ADN, Watson y Crick (Figura 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 (Figura 2), en la parte interna de las hélices solo se complementa el apareamiento de bases entre adenina y timina o entre guanina y citosina (Figura 3) (Karp, 2013). Los ácidos nucleicos se encuentran en su mayoría asociados

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	68 /222

a nucleoproteínas, complejos formados por proteínas básicas (protaminas e histaminas).

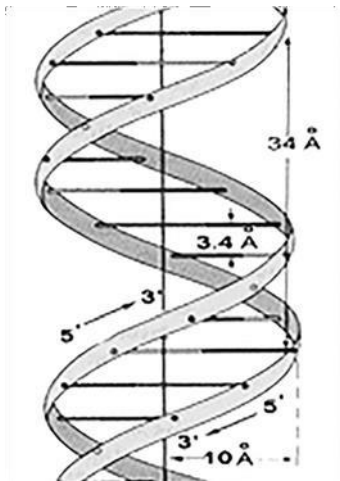


FIGURA 2. Estructura secundaria del ADN (Tomada de Karp, 2013).

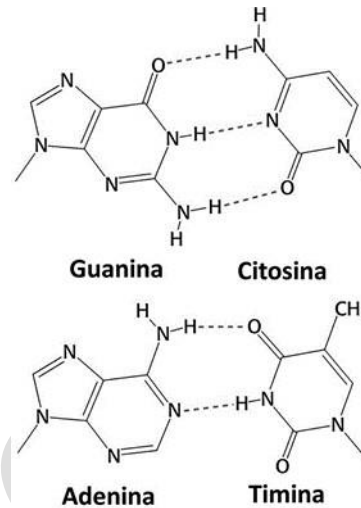


FIGURA 3. Estructura primaria, apareamiento de bases en el ADN (Tomada de Krebs *et al.*, 2017).

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 (Krebs *et al.*, 2017). 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, en este caso la desoxi-D-ribosa con la difenilamina (Pierce, 2009).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	69 /222

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

- Muestra de material vegetal seco (2.5 g de germen de trigo).

Materiales diversos

- Espátula
- Vidrio de reloj
- Mortero con pistilo
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Vasos de precipitados de 250 mL
- Agitador de vidrio
- Probeta de 50 mL
- Tubos de ensaye de 13 x 100
- Tubos de ensaye de 16 x 150
- Tubos de ensaye de polipropileno de 15 mL
- Pipetas de 5 mL
- Frasco con tapón esmerilado de 1000 mL
- Pipetas de 1 mL
- Gasa
- Bolsa de plástico nueva
- Guantes de látex
- Termómetro
- Cubrebocas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	70 /222

REACTIVOS

- Hielo seco o usar ultracongelación
- Buffer CSC
 - Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0.15 M.
 - Cloruro de sodio (NaCl) 1.5 M.
- Buffer SAS.
 - Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) 0.01 M.
 - Sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 0.30 M.
 - Cloruro de Magnesio (MgCl_2) 0.005 M.
- Mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) 0.005 M. (PM 78 $d=1.114 \text{ gmL}^{-1}$) *se adiciona al momento de usar el buffer.
- EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) Salino pH 8.0
 - EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) 0.1 M.
 - NaCl 0.15 M.
- TRIS 0.4 M. pH 8.5
- Lauril sulfato de sodio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_3\text{Na}$) al 4% en agua P/V
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96° frío
- DSC Dilución 1:100 del buffer CSC
 - Cloruro de sodio (NaCl)
- Mezcla Sevag
 - Cloroformo (CHCl_3) 24 partes
 - Alcohol isoamílico ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$) 1 parte
- Ácido tricloroacético ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) al 10%
- Difenilamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}$)

Disolver 1.5 g. de difenilamina en 100 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH), agregar 1.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Guardar en frasco ámbar y en la oscuridad.

EQUIPO

- Centrífuga clínica
- Parrilla eléctrica



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	71 /222

- Balanza de dos platos
- Balanza analítica

SERVICIOS

- Agua
- Vacío
- Gas
- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	72 /222

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

1. ¿Qué azúcar forma parte de los ácidos nucleicos?
2. ¿Cuáles son las bases nitrogenadas características del ADN?
3. ¿Cómo está formado un nucleótido?
4. ¿Cómo se aparean las bases nitrogenadas en el ADN?
5. ¿Dónde se localiza el ADN de una célula eucariótica?
6. ¿Cómo 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.
9. ¿Qué propiedades fisicoquímicas del ADN son útiles para su extracción e identificación?

Desarrollo de la práctica

- Se recomienda manejar siempre la muestra con guantes y usar el cubrebocas durante toda la extracción.
- Macerar 2.5 g de germen de trigo o material vegetal seco en un mortero, agregando pequeños trozos de hielo seco o usar el ultracongelador hasta homogeneizar finamente el material (apariencia de arena de mar).
- Pasar el material a un vaso de precipitados de 100 mL y adicionar lentamente 30 mL de buffer SAS y mantener agitando, una vez que está todo el material húmedo, agregar un trozo pequeño de hielo seco muy fragmentado y mezclar, dejar congelar durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo descongelar en baño maría a 30°C.
- Una vez descongelado el material, pasar éste homogeneizado a través de una gasa doble, que se encuentre dentro de una bolsa de plástico, que tenga un pequeño orificio en una de las esquinas, a través de éste exprimir el material de la gasa y recolectar el filtrado en cuatro tubos de 15 mL.
- Centrifugar el filtrado a 3000 rpm durante 5 min.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	73 /222

- Desechar el sobrenadante y resuspender los botones de cada tubo con 4.5 mL de TRIS 0.4 M y pasarlos a un vaso de 100 mL, después 1.8 mL de EDTA salino, añadir 3.6 mL de CSC y mezclar bien. Agregar 6 mL de lauril sulfato de sodio y homogeneizar suavemente.
- Vaciar el contenido del vaso lentamente a otro vaso de precipitados de 250 mL que contenga 60 mL de etanol frío (en baño de hielo). El ADN asciende como una nata blanca (Figura 4).
- Colectar con la ayuda de una varilla esta nata blanca

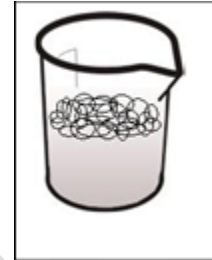


FIGURA 4. ADN precipitado
(Figura: Carlos Bautista).

y transfírela a un vaso de precipitado de 100 mL, eliminar el excedente de alcohol con un papel filtro.

- Disolver el ADN en 25 mL de DSC (agregar la cantidad necesaria de NaCl para que estos 25 mL queden a una concentración 1 M. de NaCl, recuerde que el DSC, es una dilución del CSC 1:100 por lo tanto ya existe NaCl en ella, considérela para su cálculo).
- Añadir 25 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 intermedia las proteínas histonas y no histonas (que se encontraba asociada al ADN) y en la fase inferior translúcida la mezcla Sevag (Figura 5).
- Colecte en un vaso de precipitados la capa superior de todos los tubos, ahora vierta lentamente lo colectado a otro vaso de precipitados que contenga 60 mL de etanol frío (en baño de hielo).

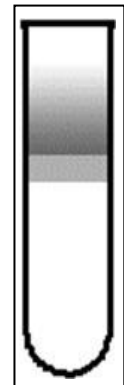


FIGURA 5. Formación de tres fases
(Figura: Carlos Bautista).

Colectar el ADN libre de proteína con una varilla de vidrio sobre un vidrio de reloj previamente pesado 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 ácido tricloroacético al 10%, calentar en baño maría a ebullición durante 10 minutos, tape

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	74 /222

la boca del tubo con aluminio para evitar en lo posible la evaporación, en éste hidrolizado estará presente la desoxirribosa libre, de tal forma que es posible identificarla.

- Prepare un tubo testigo similar al descrito en el punto anterior, sustituya el ADN por 1 mL de agua. Dé el mismo tratamiento a ambos tubos simultáneamente. Márquelos para poder identificarlos.
- Al término del calentamiento agregue a cada tubo 3 mL del reactivo de difenilamina.
- Calentar ambos tubos en baño de agua hirviendo durante 15 minutos.
- Compare la coloración que obtuvo en los tubos.

RESULTADOS

Deberá incluir en el informe:

- 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 el porcentaje de ADN obtenido por la diferencia del peso, con relación a los 2.5 gramos de germen con los que inició la práctica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	75 /222

BIBLIOGRAFÍA

Hardin, C. (2001). *Cloning, gene expression, and protein purification: experimental procedures and process Rationale*. New York, USA; Oxford University Press Incorporated.

Karp, G. (2013). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. (7^a ed.), New York, USA; Wiley.

Krebs, J., Goldstein, E., y Kilpatrick, S. (2017). *Lewin's GENES XII*. New York, USA; Jones and Bartlett Publishers.

Pierce, B. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. (3^a ed.), Madrid, España; Editorial Médica Panamericana.

Manual de Bioquímica Celular y de Tejidos I, Disponible en:
https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/5_MANUAL_BIOQUIMICA_CELULAR_TEJIDOS_I_2020.pdf



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	76 /222

PRÁCTICA 3. CROMOSOMAS GIGANTES

OBJETIVOS GENERALES

- Elaborar preparaciones citológicas de glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*.
- Identificar los cromosomas gigantes de *Drosophila melanogaster* utilizando preparaciones citológicas elaboradas por el alumno.
- Analizar la importancia de los cromosomas gigantes en los estudios de Genética.

FUNDAMENTO TEÓRICO

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:

1. Los cromosomas gigantes plumulados o plumosos (Figura 1) presentes en ovocitos de anfibios, denominados así por su forma evidenciada al microscopio.
2. Los cromosomas politénicos se han identificado en insectos de *Chironomus* y en dípteros, específicamente en la etapa larvaria (Bruce *et al.*, 2002); como el material biológico que se utilizara en esta práctica.

En 1881, E. G. Balbiani describió unas estructuras en forma de bandas en los núcleos de un insecto *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 *Drosophila melanogaster*. 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 observables en *Drosophila melanogaster*, específicamente en las células interfásicas de las glándulas salivales de larvas de tercer

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	77 /222

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 (Figura 2).

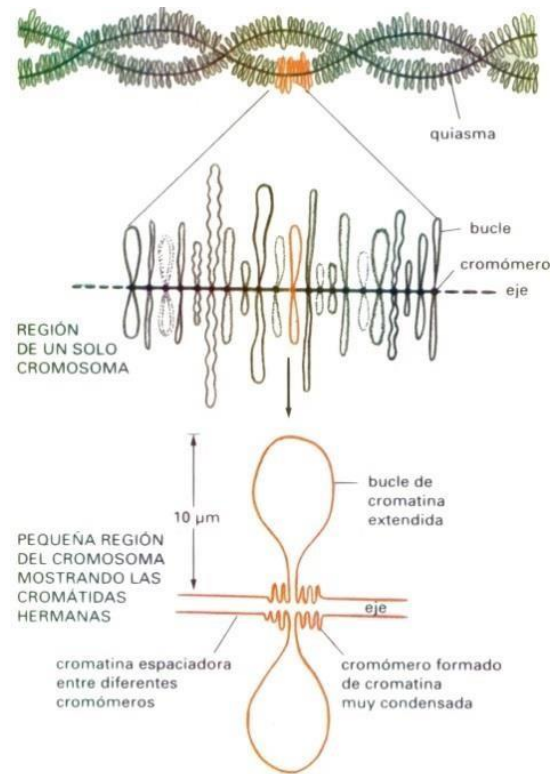


FIGURA 1. Cromosomas plumosos (Tomada de Bruce *et al.*, 2002).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	78 /222

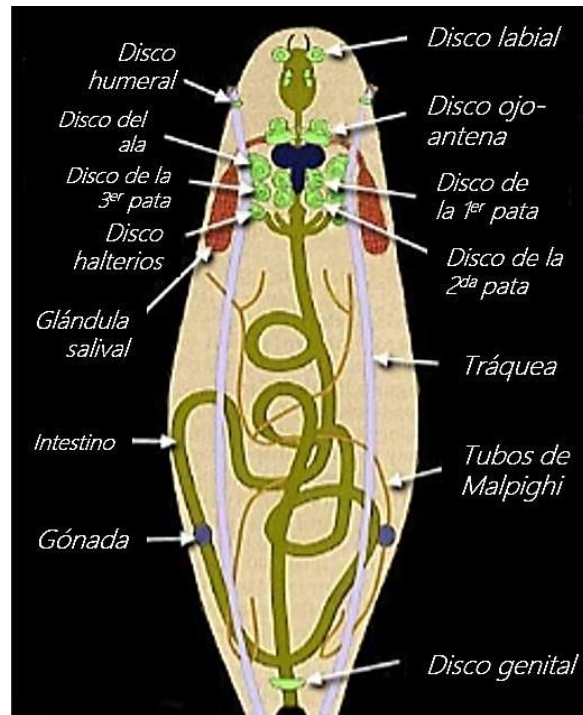


FIGURA 2. Larva de *Drosophila melanogaster* en tercer estadio
(Tomada y modificada de Gilbet y Barresi, 2016)

Los cromosomas gigantes politénicos son producto de un proceso llamado endomitosis, que en la actualidad se denomina 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 (Demerec, 1975).

Derivado del acomodo 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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	79 /222

abultamientos llamados anillos de Balbiani o Puffs y son sitios de intensa síntesis de ARN (Figura 3).

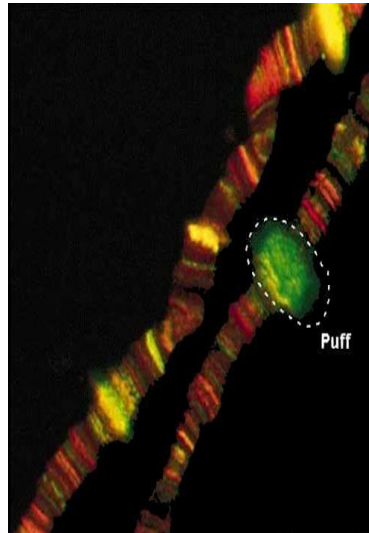


FIGURA 3. Anillos de Balbiani o Puffs

(Tomada de <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromoeuc/cromoeuc.html>).

Las siguientes son características de los cromosomas gigantes de *Drosophila melanogaster*. La forma y el tamaño son totalmente diferentes de los correspondientes cromosomas metafásicos (Figura 4). Son cromosomas politénicos, producto de una serie de nueve 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 (Gilbert y Barresi, 2016).

El tamaño del cromosoma facilita el análisis de secuencia de bandas, comparando el patrón de bandas de un individuo con el bandeo normal y las diferencias que se hallan pueden correlacionarse con las diferencias fenotípicas que se detectan (Figura 5).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	80 /222

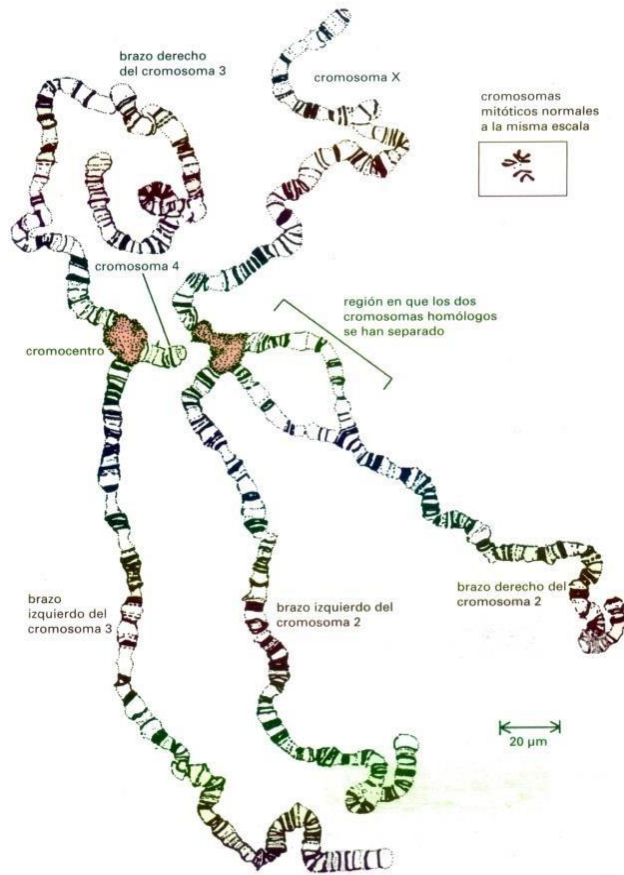


FIGURA 4. Comparación entre cromosomas gigantes y metafásicos (Tomada de Gilbet y Barresi, 2016).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	81 /222

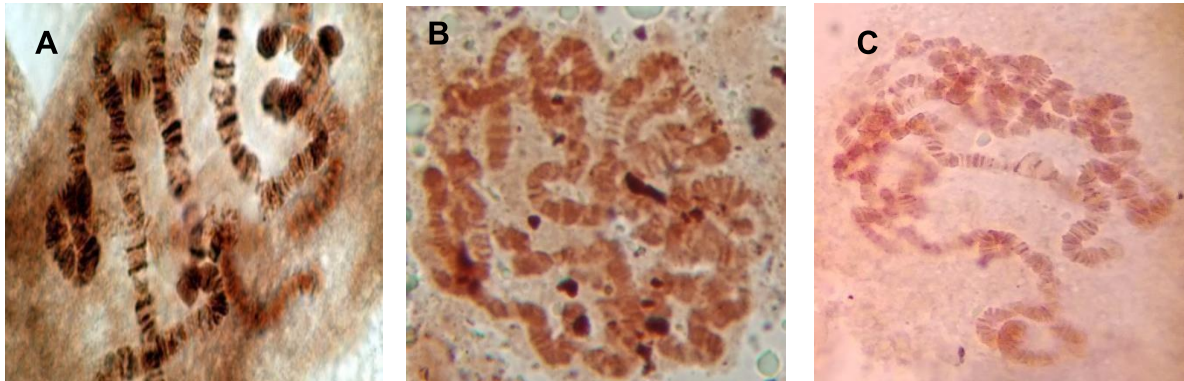


FIGURA 5. Cromosomas gigantes: A) teñido con acetorceína.

(Foto: Raúl Zavala). B) y C) Teñido con acetocarmín (Fotos: Itzen Aguiñiga).

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

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

- Larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*

Materiales diversos

- Varilla de vidrio
- Papel filtro
- Papel seda
- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Cajas Petri
- Aguja de disección



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	82 /222

REACTIVOS

- Ácido acético (CH_3COOH) al 30% v/v
- Aceite de inmersión
- Sellador de parafina para las preparaciones temporales
- Solución colorante de acetorceína ($\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$)
- Solución colorante de acetocarmín ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$)

EQUIPO

- Microscopio óptico
- Microscopio estereoscópico

SERVICIOS

- Agua
- Vacío
- Gas
- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Extractores generales para la ventilación
- Botiquín de emergencia

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	83 /222

1. ¿Qué son los discos imaginales y cuál es su importancia?
2. ¿Cómo y porqué se forman los cromosomas gigantes en *Drosophila melanogaster*?
3. ¿Por qué se obtienen las glándulas salivales durante el tercer estadio larvario y no en otros?

Desarrollo de la práctica

- Coloque la larva de tercer estadio en un portaobjetos limpio y agregue una gota de ácido acético al 30% (Nota: El color de las larvas elegidas debe ser blanco y éstas deben de tener movilidad activa).
- Diseccione con cuidado en el estereoscopio, utilizando las agujas de disección para obtener las glándulas salivales.
- 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. (Nota: Las glándulas salivales son un par de bolsas muy transparentes).
- Retire del portaobjetos las partes quitinosas y el resto 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 min, 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 para hacer el *squash*.
- Coloque la preparación con el cubreobjetos hacia abajo en medio de un círculo de papel filtro doblado por la mitad.
- Presione firmemente con la yema del dedo pulgar evitando movimientos laterales del cubreobjetos.
- Observe las preparaciones al microscopio para determinar si se logró una buena separación y coloración de cromosomas. (Notas: Se deberá observar, en una buena preparación, los cromosomas como estructuras definidas, en caso de duda consulte a su



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	84 /222

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

- 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 (Figura 5).
- 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.

RESULTADOS

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

BIBLIOGRAFÍA

Bruce, A., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, D. (2002). *Biología Molecular de la Célula*. (3ª ed.), Barcelona, España; Omega.

Demerec, M., Petersen, B., y Féliz, R. (1975). *Guía de Drosophila: introducción a la genética y citología de Drosophila melanogaster*. D.F., México; Instituto Nacional de Energía Nuclear.

Gilbert, S., y Barresi, M. (2016). *Developmental Biology*. (11ª ed.), New York, USA; Sinauer Associates Inc.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	85 /222

PRÁCTICA 4. OBSERVACIÓN DE CROMATINA SEXUAL

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar citológicamente el sexo de un individuo mediante la observación de las laminillas histológicas.
- Analizar sangre y epitelio bucal para identificar la cromatina sexual.
- Aplicar diferentes métodos para elaborar laminillas en las que identifique la cromatina sexual.

FUNDAMENTO TEÓRICO

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 (Bruce *et al.*, 2002); a partir de esto las células hijas resultantes seguirán condensando el mismo cromosoma "X" de su progenitora (Figura 1). El cromosoma "X" único de las células masculinas normales no se inactiva.

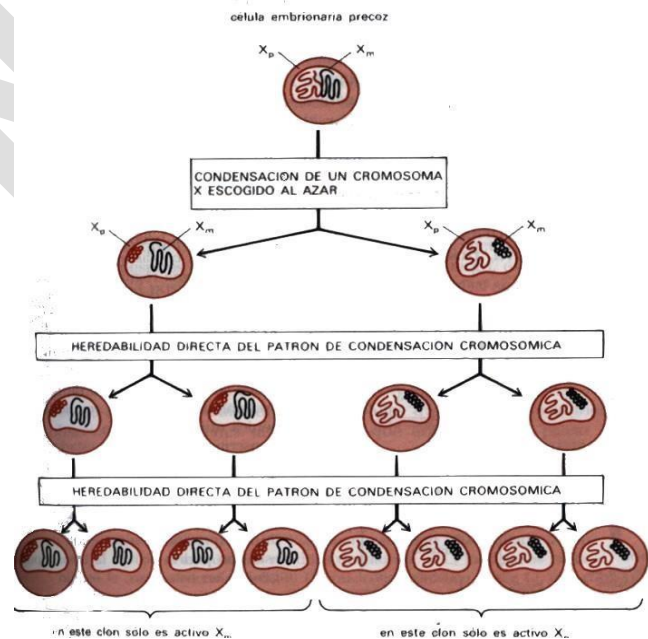


FIGURA 1. Condensación del cromosoma X

(Tomada de Bruce *et al.*, 2002).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	86 /222

En 1923, Painter demostró citológicamente la existencia de los cromosomas X y Y en el humano. En 1949, Barr y Bertram consecuencia de una serendipia descubrieron a la cromatina sexual en neuronas interfásicas de gato, en hembras y no en machos. En 1959, Kaplan y Kinoshita 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 generando un mosaico (Figura 2) (Del Castillo *et al.*, 2012).

De lo anterior se deduce que la inactivación del cromosoma "X" en la hembra un corpúsculo de Barr tiene como consecuencia una compensación de dosis cromosómica en relación con el macho (sin corpúsculo de Barr) (Eynard *et al.*, 2008).

La cromatina sexual se encuentra en los núcleos interfásicos de las células y puede ocupar diferentes posiciones dentro de éstos dependiendo del tipo de tejido. En las células de tejido epitelial de la mucosa bucal se encuentra pegado a la membrana interna del núcleo (Figura 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 (Figura 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 5) (Ahn y Lee, 2008).



FIGURA 2. Condensación del cromosoma X (Tomada de Eynard *et al.*, 2008).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	87 /222

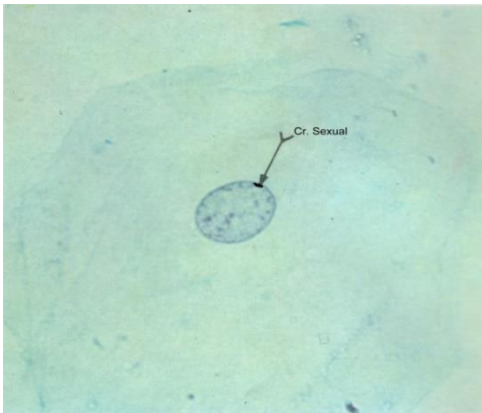


FIGURA 3. Célula epitelial (Tomada de www.istfic.mepsyd.es/MaterialesEducativos/biologia/nucleo/cromatina.html).

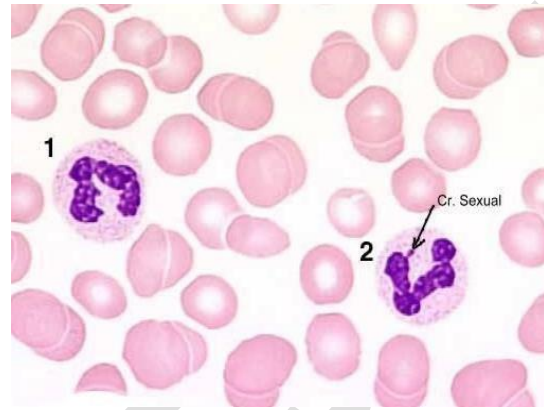


FIGURA 4. Células polimorfonucleares (Tomada de McDonald, 1989).

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

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






Donde
y

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

BAJO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	88 /222

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

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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	89 /222

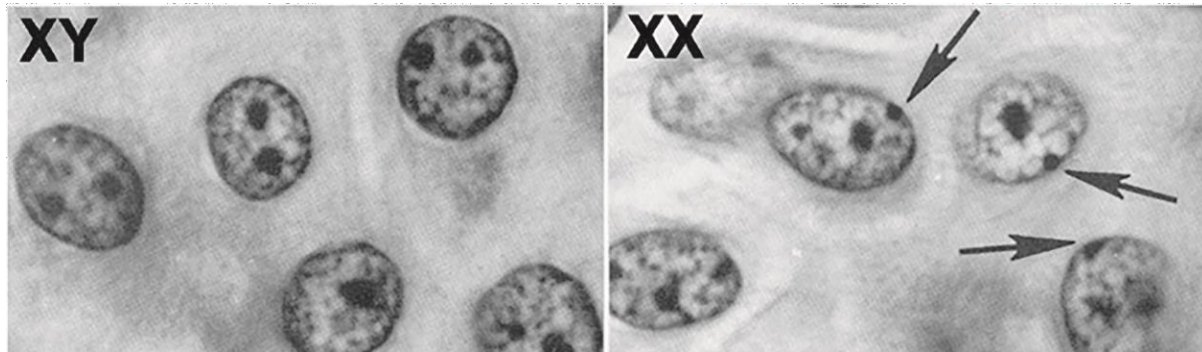


FIGURA 5. Células epiteliales masculinas y femeninas, donde se observa la cromatina sexual condensada (Tomada de <http://bkt.wordpress.com/2008/12/>).

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 cromatinas positivas (Cuadro 1).

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

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.

MATERIAL Y REACTIVOS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	90 /222

Material biológico

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

Materiales diversos

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

REACTIVOS

- Etanol (C_2H_5OH) al 70%
- Solución colorante Giemsa ($C_{14}H_{14}ClN_3S$) diluido 1:10 (V/V)
- Solución colorante de Wright
- Alcohol metílico (CH_3OH)
- Solución buffer de fosfatos pH. 7
- Aceite de Inmersión

EQUIPO

- Microscopio óptico

SERVICIOS

- Agua
- Vacío
- Gas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	91 /222

- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

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

Desarrollo de la práctica

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 metílico para su fijación durante 5 min.
- Escurrir el exceso de alcohol metílico.
- Dejar secar al aire.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	92 /222

- Pasar el portaobjetos a una cámara de tinción que contenga Giemsa diluida 1:10 (V/V) para su tinción por 15 a 20 min.
- 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: 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 (Figura 3).

Método de tinción para frotis sanguíneo con Wright.

- Calentar la yema de los dedos con fricción ligera y limpiar con alcohol al 70%, para obtener una muestra adecuada de sangre capilar.
- 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.
- Realizar el frotis. Consultar con su asesor.
- Dejar secar al aire la preparación.
- Añadir 3 a 5 gotas de colorante Wright, teñir durante 3 min sin dejar secar el colorante, y añadir sobre el colorante la misma proporción de solución buffer durante 7 min más. Sin dejar secar la muestra durante el tiempo de tinción.
- 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).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	93 /222

Nota: La cromatina sexual se observa como una prolongación del núcleo del neutrófilo (Figura 4). En mujeres normales el promedio calculado de polimorfonucleares con palillo de tambor es de 3 de cada 100 células.

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.

BIBLIOGRAFÍA

Ahn, J., y Lee, J. (2008). *X chromosome: X inactivation*. Nature Education 1(1):24.

Bruce, A., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, D. (2002). *Biología Molecular de la Célula*. (3ª ed.), Barcelona, España; Omega.

Eynard, E., Valentich, M., y Rovasio, R. (2008). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. (4ª ed.), Buenos Aires, Argentina; Editorial Médica Panamericana.

Del Castillo, V., Uranga, R., y Zafra, G. (2012). *Genética Clínica*. D.F., México; El Manual Moderno.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	94 /222

PRÁCTICA 5.

CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS U OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

OBJETIVO GENERAL

- Aplicar una metodología para realizar la observación de cromosomas metafásicos, a partir de un tejido somático en crecimiento activo, en este caso de médula ósea de ratón o de linfocitos humanos cultivados.

OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

FUNDAMENTO TEÓRICO

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 ($2n=40$) (Figura 1), únicamente acrocéntricos. Ratas y ratones son comúnmente utilizados en toxicología, así que los datos de dosificación están disponibles.



FIGURA 1. Ratón cepa CD-1
(Foto: Elia Roldán).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	95 /222

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; Altamirano *et al.*, 1993; Álvarez y Altamirano, 1999).

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 (Galloway, 2000); el tratamiento hipotónico esparce los cromosomas dentro de la célula y los hace distinguibles individualmente.

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

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

Materiales diversos

- 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
- Papel seda

REACTIVOS

- Colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$) al 0.1%
- Solución hipotónica de cloruro de potasio KCl (0.057 M)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	96 /222

- Solución fijadora. - Mezcla de metanol (CH_3OH): ácido acético (CH_3COOH) en proporción 3:1 (V/V) (fría)
- Solución colorante de Giemsa ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{S}$). - Diluir el Giemsa con agua destilada 1:10 (V/V)
- Aceite de inmersión

EQUIPO

- Centrífuga clínica
- Balanza analítica
- Balanza de dos platos
- Baño maría a 37 °C
- Microscopio óptico
- Vortex (agitador de toque)

SERVICIOS

- Agua
- Vacío
- Gas
- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia

PROCEDIMIENTO

Actividades previas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	97 /222

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

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 o cariotipo del ratón.
4. Indique el número cromosómico del ratón.

Desarrollo de la práctica

El procedimiento que a continuación se describe en apego a la NOM-062-ZOO-1999.

Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

- Inyectar al ratón vía intraperitoneal con colchicina al 0.1% (0.1 mL por cada 10 g. de peso) (Nota: La solución de colchicina debe ser preparada con agua destilada).
- Sacrificar al animal por dislocación cervical, después de una hora.
- Colocar al animal en la tabla de disección y diseccionar los dos fémures.
- Cortar las cabezas femorales. (Nota: Cada fémur se corta por sus dos extremos).
- 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. (Nota: La suspensión celular deberá ser recuperada en un tubo de cónicos o tubo de 13 x 100).
- Colectar la médula ósea en tubos cónicos. Incubar en baño maría a 37°C durante 20 min.
- Transcurrido el tiempo de incubación, centrifugar a 1500 rpm. durante 10 min, desechar el sobrenadante.
- Agregar lentamente 3 mL de fijador (metanol - ácido acético 3:1 V/V) con agitación continua.
- Dejar reposar 10 min. (Nota: La primera fijación es un paso crítico; debe evitarse la formación de grumos. Consulte a su asesor).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	98 /222

- Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos, desechar el sobrenadante.
- Repetir los 2 pasos anteriores dos veces más.
- Al finalizar la última centrifugación, resuspender el botón celular en 0.5 mL de fijador limpio y frío.
- En un portaobjetos desengrasado y glaseado, dejar caer con una pipeta Pasteur 3 gotas de la suspensión desde una altura de 80 cm, dejar secar al aire las laminillas. (Nota: Para desengrasar los portaobjetos, se recomienda sumergirlos en xilol durante 24 h; el glaseado se logra dejando permanecer los portaobjetos en el refrigerador cuando menos una hora antes de depositar la muestra).
- Cubrir las laminillas durante 10 min 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. (Nota: No debe secarse el colorante sobre la preparación durante el tiempo que dura la tinción, si esto ocurre añada más colorante).
- Observar al microscopio a seco débil, seco fuerte e inmersión. Analizar en metafases completas y bien extendidas la morfología y el número cromosómico.

RESULTADOS

Indique el número de cromosomas observados por célula.

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

BIBLIOGRAFÍA

Adler, I. (1984). *Cytogenetic Test in Mammals*. Washington, USA. OIRL PRESS, Oxford. DC.

Altamirano, M., Álvarez L., y Roldán, E. (1993). *Citogenética and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice*. Medical Science Research, 21:711-713.

Álvarez, L., y Altamirano, 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.

NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de*



animales de laboratorio.

Galloway, S. (2000). *Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay.* Environmental and Molecular Mutagenesis, 35(3):191-201.

CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

FUNDAMENTO TEÓRICO

LINFOCITOS

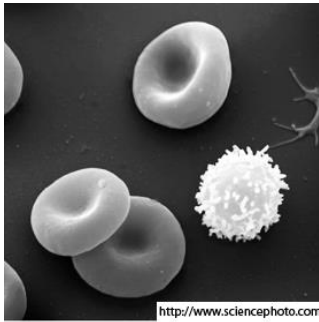


Fig 1 Eritrocitos y linfocito

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 sensitivo de daño cromosómico estructural inducido. Estos cambios en la estructura, ofrecen evidencia morfológica de daño al material genético, (Evans, 1984).

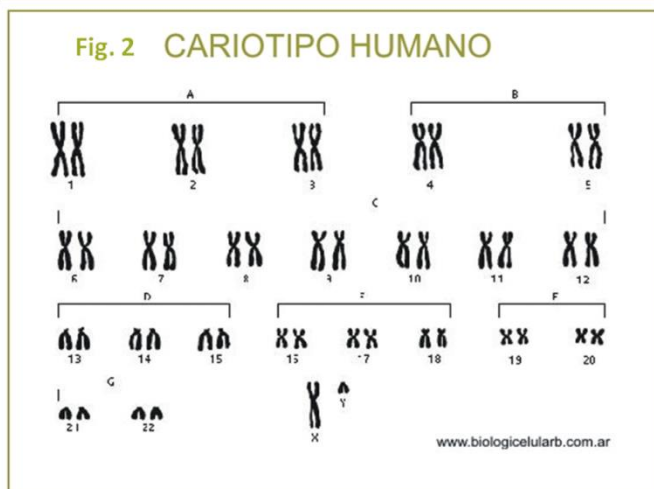
ALTERACIONES CITOGENÉTICAS

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.

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 citogenético mediante la observación al microscopio de los cromosomas humanos obtenidos del cultivo de sus propios linfocitos.

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



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
- Microscópio 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.

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?



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.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	99 /222

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	100 /222

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA UNIDAD.

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 80% de asistencia 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 alimentos 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 ésta unidad se dará una introducción previa a cada práctica, donde se tocarán los contenidos más importantes de la teoría y de la fundamentación metodológica, para iniciar la metodología correspondiente.

Para el trabajo en el laboratorio los alumnos formarán equipos.

Los cuestionarios e informes de las prácticas serán entregados escritos a mano y en un cuaderno específico para esta unidad, que será revisado por el profesor.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	101 /222

Al inicio de cada práctica el alumno entregará de manera individual la metodología en un diagrama de flujo y las actividades previas realizadas incluidas en cada práctica.

Se entregará de manera individual un informe por cada una de las prácticas; con los siguientes rubros:

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

La evaluación de la unidad Genética está 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 70% 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; Tendrán un valor de 30% de la calificación de la unidad.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	102 /222

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 reprobación ésta, tendrá que presentar en segunda vuelta un examen global teórico práctico que será la calificación definitiva de la unidad.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	103 /222

MANEJO DE RESIDUOS

Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI)

Son cualquier material como lancetas, guantes, frascos de recolección de muestra, algodón o cualquier otro que hubiera estado en contacto con sangre, saliva o alguna otra muestra biológica, principalmente de origen humano o de ratón.

- Etiquetar correctamente el recipiente indicando: fecha, grupo y laboratorio donde se generó, así como la descripción. Los residuos se deberán separar en las siguientes categorías: 1) sangre, 2) cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos, 3) patológicos 4) residuos no anatómicos 5) objetos punzocortantes.
- Los desechos de origen humano como sangre, saliva y semen, primero deberán ser inactivados con solución comercial de hipoclorito de sodio (cloro), colocados en un recipiente de vidrio o de plástico rígido debidamente etiquetado y que debe ubicarse en el área asignada de desechos para ser recogidos por el personal adecuado.
- Los recipientes de los RPBI punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s), deberán contar con la leyenda que indique **“RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECIOSOS”** y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.
- Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda **“RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICOINFECIOSOS”**.
- Los desechos de animales rata y/o ratón provenientes de bioterio deberán colocarse en una bolsa exclusiva y ser trasladados al bioterio para el adecuado manejo final.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	104 /222

Residuos químicos

Todos los residuos generados durante las diferentes prácticas deberán ser recolectados en frascos de vidrio, debidamente etiquetados y debe ubicarse en el área asignada de desechos para ser recogidos por el personal adecuado. En caso de desechos de ácidos deberán ser neutralizados con una base como bicarbonato de sodio comercial (proporcionado por el alumno y deberá tenerlo disponible en todo momento).

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	105 /222

UNIDAD 3

BACTERIAS, ALGAS Y HONGOS

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	106 /222

Bacterias, algas y hongos

INTRODUCCIÓN DE LA UNIDAD

La biodiversidad actual es el resultado de historias evolutivas de los seres vivos que han poblado nuestro planeta, iniciando con seres unicelulares procariotas a organismos eucariotas constituidos de tejidos especializados. En esta unidad se brinda la oportunidad a las y los estudiantes para que tengan un acercamiento al mundo microbiano, así como a las algas consideradas organismos eucariotas fotoautótrofos cercanos a las plantas terrestres y los hongos cuyo origen los acerca a los animales. Los contenidos de esta unidad son el antecedente para asignaturas y laboratorios relacionados con botánica en sus distintas subdisciplinas.

Las y los estudiantes desarrollarán habilidades de observación, descripción e interpretación, así como destrezas en el manejo y uso correcto del material y equipo de laboratorio. Se realizarán seis prácticas, organizadas de tal manera que siguen una secuencia evolutiva para comprender la complejidad estructural de los organismos estudiados. Iniciando con la práctica seis y siete, las cuales están dedicadas al desarrollo de técnicas microbiológicas básicas, manejo de cultivos, siembra, aislamiento y tinción Gram para la observación de bacterias. En la práctica ocho se observarán preparaciones de cianobacterias, los primeros organismos fotosintéticos oxigénicos. En la práctica nueve se revisarán ejemplares de algas pertenecientes a representantes de los Phyla Chlorophyta, Rhodophyta y Ochrophyta para analizar su complejidad estructural con la observación de estructuras y uso de claves taxonómicas consultando los anexos incluidos. La práctica 10 tiene como finalidad revisar estructuras vegetativas y reproductivas de muestras o ejemplares de hongos, entre ellos cigomicetos (actualmente clasificados en varios Phyla) y de los Phyla Chytridiomycota, Ascomycota y Basidiomycota. También con la posibilidad de usar algunas técnicas microbiológicas de aislamiento y cultivo, incluidas en los anexos. En la práctica 11 se estudiarán los líquenes, la más compleja de las simbiosis entre cianobacterias, algas y hongos que da como resultado un talo liquénico de estructura morfológica y composición bioquímica particulares.

En la medida de las circunstancias y posibilidades, se ofrece una actividad complementaria en la que las y los estudiantes practicarán técnicas de recolección, preservación y etiquetado de algas, hongos y líquenes, así como la observación de su hábitat.



OBJETIVOS DE LA UNIDAD

Diferenciar organismos procariontes y los primeros eucariotas mediante el análisis de su patrón estructural básico con ejemplares representativos de bacterias, algas, hongos y líquenes.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	107 /222

PRÁCTICA 6-7.

PREPARACIÓN Y MANEJO DE MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS

Y

ASLAMIENTO, SIEMBRA, TÉCNICA DE TINCIÓN Y OBSERVACIÓN DE BACTERIAS

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar técnicas de microbiología básica para la caracterización de células bacterianas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar un medio de cultivo y esterilizar material para siembra de bacterias.
- Aplicar técnicas de siembra para bacterias.
- Caracterizar las colonias bacterianas y formas celulares.
- Diferenciar bacterias con la técnica de tinción de Gram y analizar su fundamento.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias se pueden encontrar en todos los ambientes (terrestres, acuáticos y aéreos). Su papel en la naturaleza es relevante por sus contribuciones a los ciclos biogeoquímicos, la descomposición de materia orgánica y la generación de metabolitos para el establecimiento, desarrollo y sobrevivencia de otros organismos. Además, son importantes simbioses de plantas y animales, por mencionar algunos aspectos ecológicos de relevancia.



La taxonomía de las bacterias es muy compleja debido a que su clasificación se basa en gran medida en 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 (Figura 1). 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.

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	108 /222

Para el estudio de las bacterias se utilizan técnicas microbiológicas básicas: preparación de medios de cultivo, toma de muestras, aislamiento, técnicas de tinción, pruebas bioquímicas y observación al microscopio. (Madigan *et al.* 2009)

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 nutrimentos. Los medios semisólidos y sólidos se preparan con agar, el cual es un ficolóide 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 hacer selectivo si se adiciona uno o más antibióticos o ciertos agentes químicos. (Forbes *et al.* 2004; Granados y Villaverde, 1997; Vullo *et al.*, 2000; Washington *et al.*, 2008; Wistreich y Lechtman, 1983)

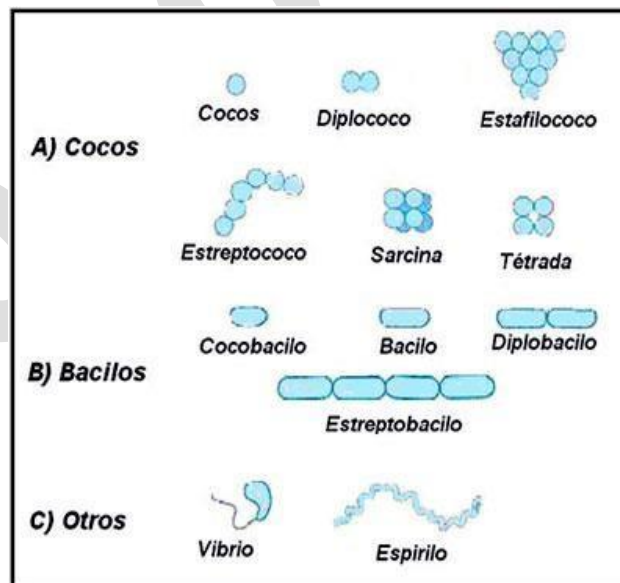


FIGURA 1. Formas bacterianas recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/g>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	109 /222

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

Muestras de: lácteos, suelo, agua, plantas, entre otros.

Materiales diversos

- Algodón.
- Gasa.
- Asa bacteriológica.
- Mechero Bunsen o Fisher.
- Termómetro (-10 a 150).
- Papel de estraza.
- Papel aluminio.
- Bandeja de teñido.
- Guantes de látex.
- Vidrio de reloj.
- Etiquetas.
- Abatelenguas.
- Hisopos.
- Papel seda.
- Franela.
- Papel absorbente.
- Pipetas Pasteur o goteros.
- Piseta.
- Cubre boca desechable.
- Guantes de asbesto.
- Cajas Petri de vidrio o plástico ya esterilizadas.
- Matraz Erlenmeyer de 500, 1000 mL.
- Tubos de vidrio capacidad 5 mL con tapón de rosca o tubos de ensayo.
- Gradilla para tubos.
- Pinzas para tubos de ensayo.
- Portaobjetos y cubreobjetos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	110 /222

REACTIVOS

- Aceite de inmersión.
- Agar bacteriológico o medios de cultivo selectivos.
- Solución alcohol (C_2H_5OH)-acetona (C_3H_6O) 1:1.
- Solución de cristal violeta ($C_{24}H_{28}N_3Cl + CH_3OH$).
- Lugol ($I_3K + H_2O$).
- Acetona (C_3H_6O).
- Safranina ($C_{20}H_{19}ClN_4 + \cdot Cl^-$).
- Agua destilada (H_2O).
- Alcohol (C_2H_5OH).
- Cloro comercial (hipoclorito de sodio; $NaClO$).

EQUIPO

- Autoclave
- Microscopio estereoscópico
- Microscopio de campo claro
- Incubadora
- Balanza analítica
- Parrilla de calentamiento con agitación.

SERVICIOS

- Agua
- Vacío
- Gas
- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



- Botiquín de emergencia

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	111 /222

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

1. Menciona las características biológicas y morfológicas más importantes de las bacterias.
2. Explique en qué casos se emplean medios de cultivo líquidos y semisólidos.
3. Explique los fundamentos de la esterilización por medio de la autoclave.
4. ¿Cuál es el fundamento de la Tinción de Gram?
5. Describa las diferencias en el uso y funcionamiento del estereoscopio y el microscopio de campo claro.

Desarrollo de la práctica

Recolección de la muestra

La muestra puede obtenerse de sustratos diversos: alimentos lácteos con probióticos, agua, suelo o plantas.

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. 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 (Gaviño, 2005).

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	112 /222

Desinfección

Se utiliza para la limpieza de materiales o superficies inertes y se puede realizar con desinfectantes (hipoclorito de sodio al 5%). 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 1) se esterilizará el matraz que contiene el medio de cultivo y el material de cristalería previamente lavado y envuelto de manera individual en papel de estraza.

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. Manipular las cajas y tubos únicamente dentro de la zona estéril.

Sembrado bacteriológico o inoculación

Se requiere un asa de inoculación de nicrom o platino, con un extremo insertado en un mango cilíndrico. La superficie del medio de cultivo en una caja Petri puede ser inoculada con la muestra por distintas técnicas: punteadura, estría o picadura. El asa debe ser esterilizada a fuego directo hasta alcanzar una coloración rojo-anaranjada intensa, esperar dentro del área estéril de los mecheros a que se enfríe, es decir, que retome su color plomizo y tomar la muestra e inocular. Esto debe hacerse por cada inoculación. Cuide de no quemar ni la muestra ni el medio de cultivo con el asa todavía caliente. Las colonias aisladas pueden ser entonces sembradas individualmente a otros medios, para obtener cultivos puros. Cuide de que las colonias no se encimen para evitar contaminaciones si se quiere realizar una resiembra (Figura 2).

Incubación



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	113 /222

Hecho el inóculo se procede a la incubación. Los microorganismos difieren en su temperatura óptima de incubación. La mayoría crecen a 35°C, pero también puede ser a temperatura ambiente no obstante se debe tener en cuenta que las fluctuaciones de temperatura pueden causar problemas en la incubación.

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	114 /222

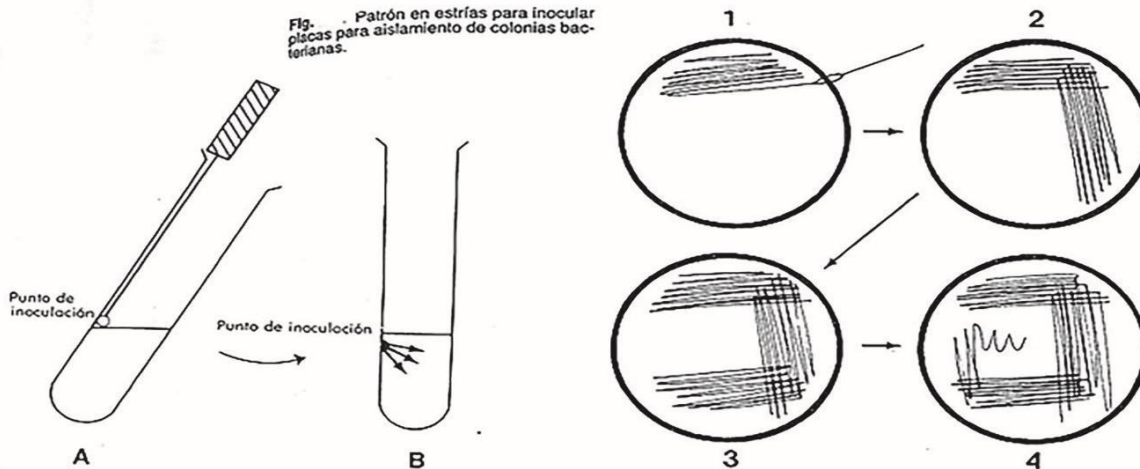


Fig. Técnica para inocular un tubo de caldo de cultivo. A. Se inclina el tubo hace la inoculación como se ilustra, tubo se vuelve a enderezar. Así, el si inoculación queda sumergido debajo superficie del medio.

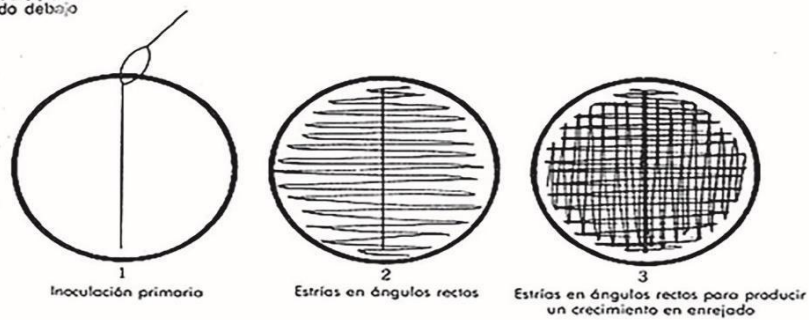


Fig. Patrón en estrías para inocular medios para recuento semicuantitativo de colonias bacterianas.

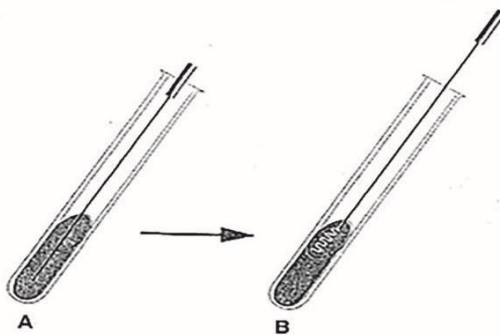


Fig. Técnica para inocular un tubo de agar inclinado con un ansa de inoculación recta. A. Penetrar la profundidad del agar inclinado hasta 2-3 mm del fondo de vidrio. Si se toca el fondo del vidrio puede entrar el aire atmosférico, anulando así las condiciones de anaerobiosis. B. Remover lentamente el ansa y estríar la superficie de agar con un movimiento de ida y vuelta en forma de "S".

FIGURA 2. Técnicas de siembra o inoculación (tomada de la literatura)

BF



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	115 /222

Observación de colonias bacterianas

La valoración de las características de las colonias será mediante la observación del crecimiento en la superficie de las placas de agar sin abrir la caja. La inspección se lleva a cabo en el microscopio estereoscópico observando la superficie del agar para detectar crecimiento bacteriano. Cada placa debe revisarse cuidadosamente debido a que las muestras iniciales son generalmente cultivos mixtos que presentan diversos tipos de colonias.

Para caracterizar una colonia de bacterias deben considerarse los siguientes aspectos (Figura 3):

- 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, enrollado.
- Color: blanco, amarillo, negro, sepia, naranja, otros.
- Superficie: brillante, opaca, lisa, rugosa.
- Densidad: opaca, translúcida, transparente, otras.
- Consistencia: butirosa (como mantequilla), viscosa, membranosa, quebradiza, otras.
- Aspecto: mucoso y seco.
- Tamaño: grande (5 mm), mediana (2-3 mm), pequeña (1-2 mm).

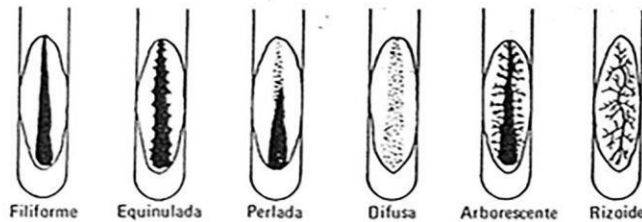
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	116 /222

CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS DE BACTERIAS

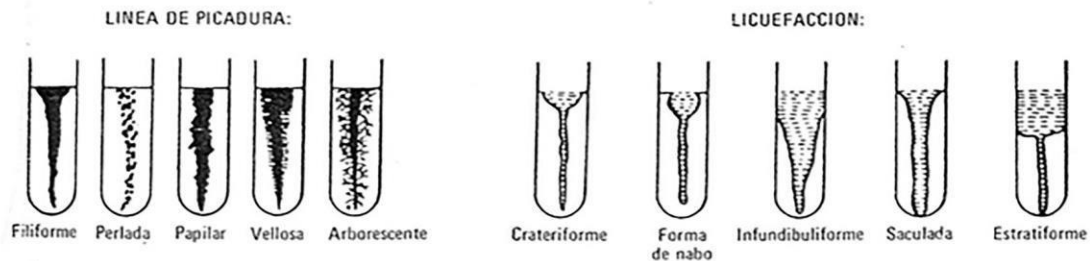
COLONIAS



ESTRIA EN AGAR – FORMA DE CRECIMIENTO



PICADURA EN GELATINA



CALDO DE NUTRIENTES – SUPERFICIE DE CRECIMIENTO

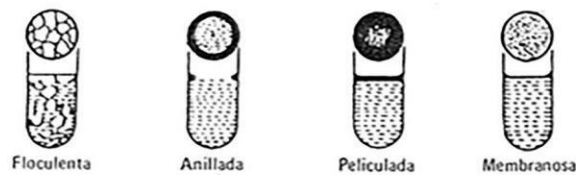


FIGURA 3. Características de los cultivos de bacterias (Tomado de American Society for Microbiology. Detroit, Michigan).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	117 /222

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.

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 Tinción de Gram. Esta tinción diferencial divide a la mayoría de las bacterias en dos grupos: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Anexo 2).

Caracterización de bacterias

Se refiere a la descripción de la morfología bacteriana (Figura 1):

- Oval o esférica (coco)
- Cilíndrica o en forma de bastón (bacilo)
- Espiral o helicoidal (espirilo)
- Filamentosa
- Formas intermedias de algunos casos anteriores
- Como agrupación bacteriana pueden ser:
 - Agrupaciones cocoides (diplococos, estreptococos, estafilococos)
 - Agrupaciones bacilares (diplobacilos, estreptobacilos)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	118 /222

RESULTADOS

Se presentarán características de las principales colonias observadas que se pueden identificar en forma de cuadros sinópticos que incluyan los esquemas correspondientes (Ejemplo Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Caracterización de las colonias bacterianas.						
Muestra	Forma	Tamaño	Borde	Elevación	Color	Superficie

Tabla 2. Caracterización de la tinción Gram.				
Muestra	Morfología	Gram +	Gram -	Foto o Dibujo (indicar aumento)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	119 /222

BIBLIOGRAFÍA

Collins, C., y Lén, P. (1990). *Métodos Microbiológicos*. España: ACRIBIA.

Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. B. (2009). Bailey and Scott. *Diagnóstico Microbiológico*. Madrid, España: Medica Panamericana.

Granados, P. y Villaverde, P. (1997). *Microbiología*. Madrid, España: Thomson paraninfo.

Madigan, T., Martinoko, M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2009). Brock. *Biología de los microorganismos*. EUA. Prentice Hall.

Vullo, D. L., Wachsman, M. B., & Alche, L. E. (2000). *Microbiología en práctica Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica y aplicada*. Argentina: Atlante.

Washington, C. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C., Woods, G. L. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a color*. Madrid, España. Medica Panamericana.

Wistreich, G. A., y Lechtman, M. D. (1983). *Prácticas de Laboratorio en Microbiología*. D.F., México. Limusa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	120 /222

ANEXO 1. Técnica para utilizar el autoclave.

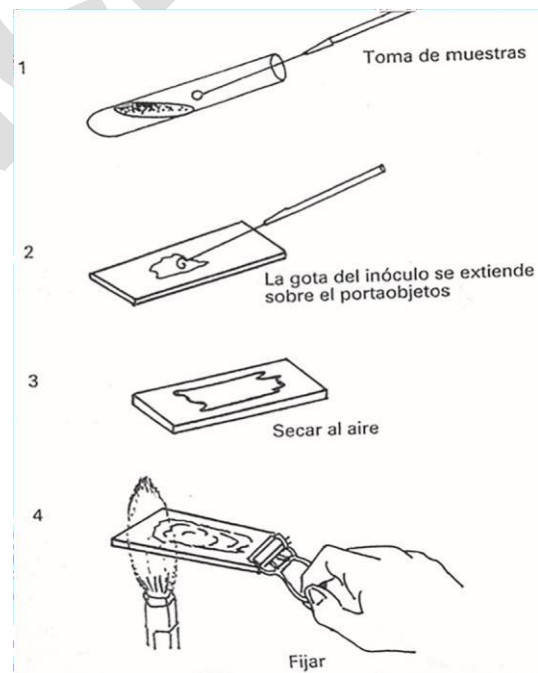
Resumen de las instrucciones para el manejo de la autoclave:

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 termostato eléctrico.
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 a 15 psi y controlar con el termostato.
6. Dejar que transcurra 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.
9. Para la esterilización de medios de cultivo de 107 a 121° C durante 10-15 minutos y 15 psi de presión.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	121 /222

ANEXO 2. Técnica de la tinción de GRAM.

1. Se flamea el asa
2. Toca el centro de la colonia a estudiar con el extremo del asa
3. La porción de la colonia a examinar se emulsifican 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 diez segundos o menos.



Preparación de un frotis para tinción.

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	122 /222

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. Primero examinar el extendido bajo un objetivo de bajo poder (4x o 10x) y localizar el frotis. Posteriormente observar a 40x. Finalmente, observar bajo un objetivo de inmersión 100X (aceite de inmersión). Las bacterias Gram positivas se tiñen de azul oscuro; las Gram negativas aparecen rosa pálido.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	123 /222

PRÁCTICA 8.

Observación de cianobacterias

OBJETIVO GENERAL

- Identificar la morfología y estructuras de cianobacterias y analizar sus diferentes niveles de organización.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Adquirir la destreza en la preparación de muestras en fresco y semipermanente con gelatina glicerinada.
- Identificar los caracteres morfológicos de células especializadas (heterocitos y acinetos).
- Adquirir habilidades en el uso de claves para la determinación taxonómica.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las cianobacterias, anteriormente conocidas como algas verde-azules o cianofitas, son un grupo natural de organismos fotosintéticos oxigénicos que presentan niveles de organización y hábitats semejantes a las algas. Su registro fósil se remonta al Precámbrico y son responsables del cambio de la atmósfera primitiva al incrementar las cantidades de oxígeno, evento que permitió la evolución de los eucariotas.

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 asociadas a los cuerpos poliédricos, los cuales contienen carboxisomas que fijan el dióxido de carbono. Presentan como pigmento fotosintético principal la clorofila a, carotenos y xantofilas contenidos en lamelas (también llamados tilacoides bacterianos). Además, presentan ficobiliproteínas en gránulos o ficobilosomas asociados a las lamelas.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	124 /222

La pared celular de las cianobacterias es similar a las bacterias Gram negativas, lo que indica la posible relación entre ellas, está formada por peptidoglicanos o mureínas (glicopéptidos, mucopéptidos) y ácido 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 como galactosa, glucosa, manosa, rhamnosa, 2-O-metil-D-xilosa, ácido glucurónico y galacturónico, también puede contener proteínas y fosfatos (Wistreich y Lechtman, 1983).

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 (Lee, 2008). En la actualidad se han descrito aproximadamente 5000 especies, en 10 órdenes (Guiry y Guiry, 2022). Para su clasificación se consideran aspectos fisiológicos, reproductivos, morfológicos y hábitat.

Las cianobacterias son unicelulares, coloniales, filamentosas y parénquimas simples (Figura 1). Pueden habitar en ambientes dulceacuícolas, salobres, marinos y terrestres (Hoek et al. 1995).

Las aguas que contienen Fósforo, CO₂, Nitrógeno e incremento de temperatura propician el crecimiento de cianobacterias potencialmente tóxicas, entre ellas: *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Calothrix*, *Merismopedia*, y *Leptolyngbya* (Anexo 3).

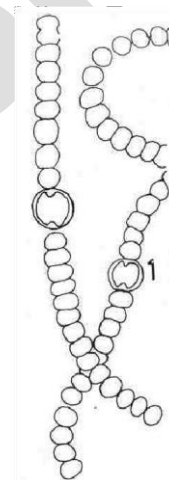


FIGURA 1. Nostoc sp. (Filamento con heterocitos).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	125 /222

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

- Preparaciones semipermanentes de cianobacterias, muestras de agua (lago, arroyo, charca) y raspados de rocas o paredes húmedas que presenten lama

Materiales diversos

- Agujas de disección
- Papel seda
- Pinzas de disección
- Etiquetas
- Franela
- Pipetas Pasteur o goteros
- Portaobjetos y portaobjetos
- Caja Petri

REACTIVOS

- Aceite de inmersión
- Gelatina glicerinada (Anexo 4)
- Solución fijadora de formol (Anexo 4)

EQUIPO

- Autoclave.
- Microscopio estereoscópico.
- Microscopio de campo claro.

SERVICIOS

- Agua
- Energía eléctrica



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	126 /222

- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

1. ¿Cuáles son los niveles de organización presentes en las cianobacterias?
2. ¿Cuáles son las estructuras de una célula de cianobacteria?
3. ¿Cuál es la función de un acineto, heterociste y hormogonio?
4. ¿Qué es la vaina y cuál es su función?
5. ¿Cuál es el hábitat e importancia económica y ecológica de las cianobacterias?
6. Elabore un glosario de 20 términos de cianobacterias.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	127 /222

Desarrollo de la práctica

- A. Observar las preparaciones semipermanentes que sean proporcionadas por los profesores.
- B. Elaborar preparaciones en fresco:
1. 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 (heterocitos y acinetos), hormogonios, vaina y tricoma (Anexo 3).
 4. Elabore dibujos de lo que observa, indique el aumento del objetivo empleado, nombre de estructuras.
 5. Las preparaciones que resulten interesantes, fijarlas con formol al 3% y montarlas con gelatina glicerizada (Anexo 4).
 6. Utilice la clave para determinar los géneros observados (Anexo 5).
 7. Con la ayuda de bibliografía especializada elabore las diagnosis de las especies observadas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	128 /222

RESULTADOS

Elabore un cuadro comparativo con las muestras revisadas. Así como una descripción de cada género con los caracteres observados, incluya los esquemas correspondientes.

Género	Nivel de organización	Células especializadas	Estructuras de reproducción asexual	Vaina	Tricoma	Foto y dibujo (indicar aumento)

BIBLIOGRAFÍA

Bellinger, E. G. y Sigeo, D. C. (2010). *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. John Wiley y Sons.

Guiry, M, y Guiry, G. (2022). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algabase.org>. Consultado el 25 de enero de 2022.

Hoek, C., Mann, D., y Jahns, H. (1995). *Algae. An introduction to Phycology*. New York, USA: Cambridge University Press.

Lee, R. (2008). *Phycology*. United Kingdom: Cambridge University Press.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	129 /222

ANEXO 3. Ejemplos de cianobacterias (Tomadas de Ortega, 1984).

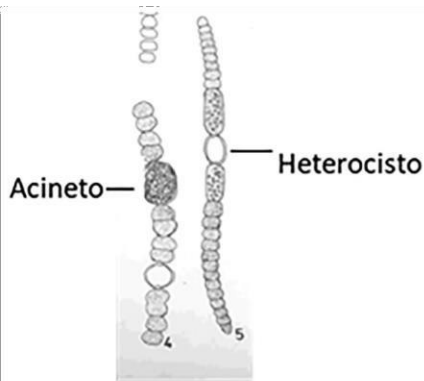


FIGURA 2. *Anabaena* sp

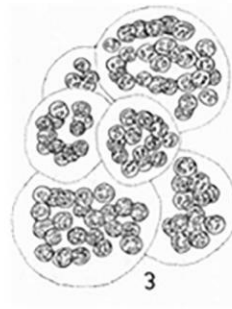


FIGURA 3. *Microcystis* sp.



FIGURA 4. *Phormidium* sp.

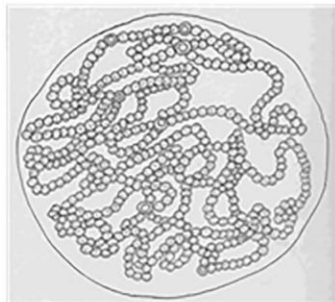


FIGURA 5. *Nostoc* sp.

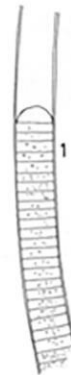


FIGURA 6. *Lyngbya* sp.



FIGURA 7. *Spirulina* sp.



FIGURA 8. *Oscillatoria* sp.

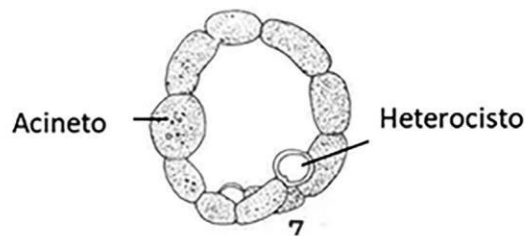


FIGURA 9. *Anabaenopsis* sp.



FIGURA 10. *Merismopedia* sp.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	130 /222

ANEXO 4. Montaje de preparaciones.

Gelatina glicerinada

Gelatina en polvo	3.5 g
Agua destilada (H ₂ O)	21 mL
Glicerina (C ₃ H ₈ O ₃)	25 mL
Ácido fénico (C ₆ H ₆ O)	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 3%):

Formol (CH ₂ O)	30 mL
Agua (H ₂ O)	970 mL

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	131 /222

ANEXO 5. Clave para cianobacterias.

- 1a Células formando colonias. **Chroococcus**
- 1b Células formando filamentos uniseriados. **2**
- 2a Sin heterocito **3**
- 2b Con heterocito... **4**
- 3a Tricomas en espiral, sin que atraviesen la pared..... **Spirulina**
- 3b Tricomas raramente en espiral, multicelulares, pared de la célula apical
ensanchada **Oscillatoria**
- 3c Un sólo tricoma dentro de la vaina, generalmente con una matriz
gelatinosa **Lyngbya**
- 4a Células esféricas, tricomas dentro de o irregularmente con matriz
gelatinosa **Nostoc**
- 4b Células cilíndricas, tricomas sin vaina o poco evidente... **Anabaena**

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	132 /222

PRÁCTICA 9.

Observación y determinación de algas eucariotas

OBJETIVO GENERAL

Analizar e identificar niveles de organización, caracteres vegetativos y reproductivos de algas de los Phyla Chlorophyta, Rhodophyta y Ochrophyta.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Reconocer el hábito y caracteres externos.
- Identificar caracteres internos vegetativos y reproductivos, mediante cortes en plano transversal y longitudinal o disgregación de talos.
- Distinguir entre talos de organización unicelular, cenobial, filamentosa, parenquimatosa, sifonal y polisifonal.
- Desarrollar habilidades en el manejo de claves para la determinación taxonómica de los especímenes estudiados.
- Aprender a elaborar preparaciones en fresco y semipermanentes de talos de diferentes algas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

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, b y c como principales pigmentos fotosintéticos además de carotenos y xantofilas. Comúnmente son acuáticas, habitando agua dulce y marina, pero también las hay terrestres. En algunos casos pueden interaccionar con otros organismos como parásitas, o asociarse con hongos para formar líquenes (Lee, 2008).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	133 /222

Las células de las algas eucariotas están rodeadas por una pared compuesta de celulosa o puede ser reemplazada por manosa, xilano o diferentes polímeros, además de polisacáridos, secretados por el aparato de Golgi, la membrana plasmática es la responsable de controlar la entrada y salida de sustancias del protoplasma. Algunas especies presentan undulipodios en células vegetativas y reproductivas para su locomoción. Los cloroplastos o cromoplastos están rodeados por dos, tres, cuatro o cinco membranas según el grupo. Los leucoplastos o amiloplastos son incoloros están adaptados al almacenamiento de material de reserva (Hoek, *et al.*, 1995).

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.



FIGURA 1. *Chaetomorpha antennina*. Foto S. Díaz-Martínez

En esta práctica se observarán ejemplares de algas verdes (Phylum Chlorophyta), algas rojas (Phylum Rhodophyta), y algas pardas y diatomeas (Phylum Ochrophyta) (Evert y Eichhorn, 2015; Graham y Wilcox 2000).

Phylum 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 aproximadamente 7000 especies (Guiry y Guiry, 2022) 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 (Anexo 6). Las especies marinas son abundantes en la zona intermareal algunas adheridas a rocas, por ejemplo: *Ulva*, que desarrollan estructuras de fijación, como la célula basal en *Chaetomorpha* (Figura 1), estolones y rizoides en *Caulerpa* y bulbos en *Halimeda*. Otras



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	134 /222

especies crecen sobre tronco de árboles y suelo, algunas son simbiotes 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 es 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 (Evert y Eichhorn, 2015; Hoek, *et al.*, 1995; Figura 2).

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

Existen alrededor de 7000 especies (Guiry y Guiry, 2022), 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.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	135 /222

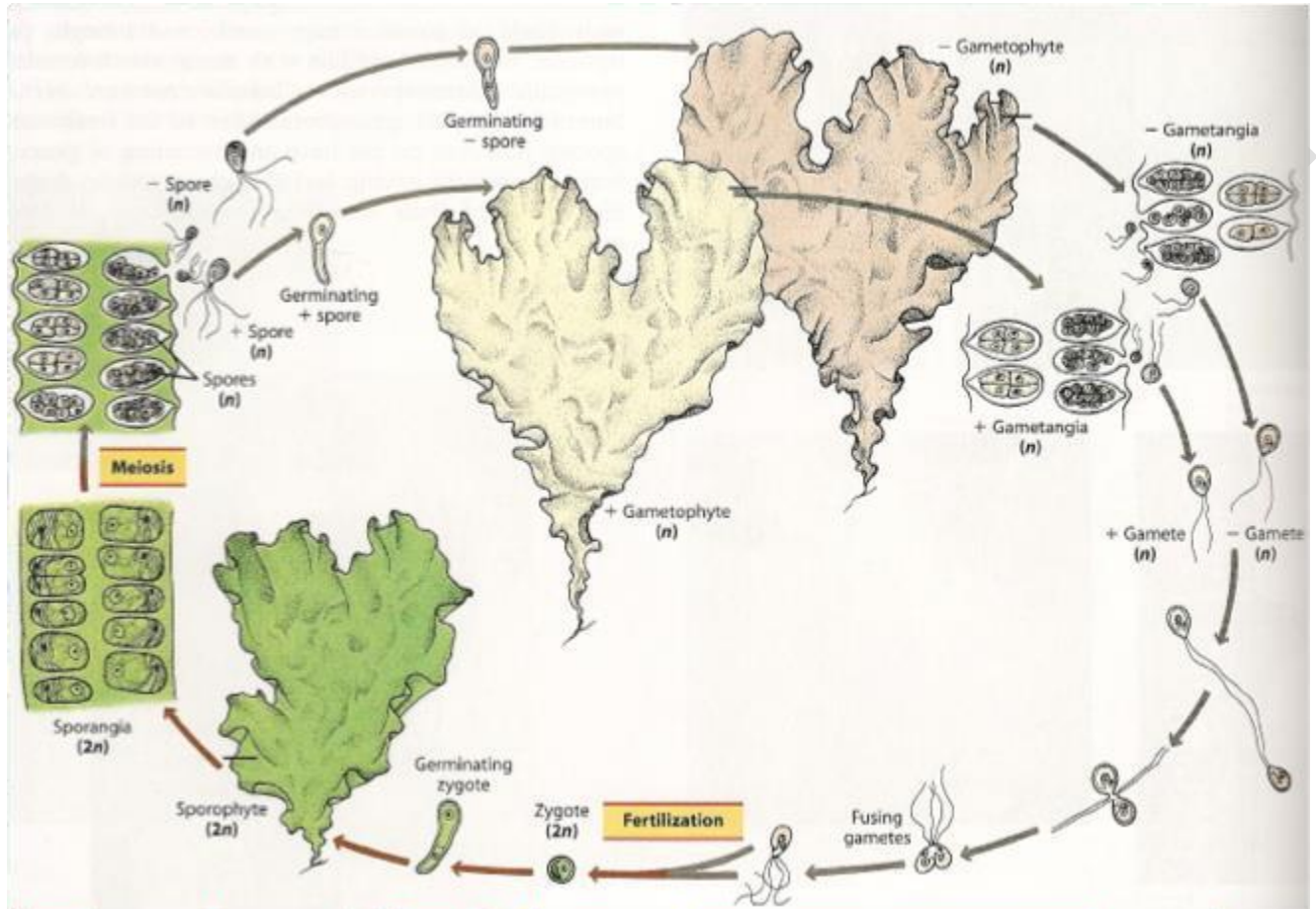


FIGURA 2. Ciclo de vida con alternancia de generaciones de *Ulva* sp. Tomado de Evert & Eichhorn, (2013).

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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	136 /222

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 *Euचेuma* son cultivadas para la producción de este ficocoloide (Evert y Eichhorn, 2015; Lee, 2008).



FIGURA 3. *Tayloriella dictyurus* con cistocarpos.

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 presenta ciclos de vida con alternancia de dos o tres fases: gametofito, carposporofito (Figura 3) y tetrasporofito (Lee, 2008; Figura 4).

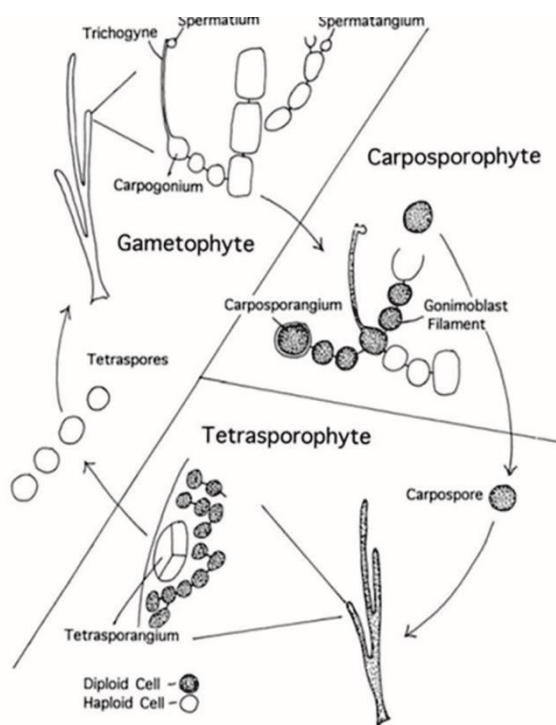


FIGURA 4. Ciclo trifásico. Tomado de Lee (2008)

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	137 /222

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* (Figura 5). Esta clase comprende cerca de 2000 especies (Guiry y Guiry 2022), 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

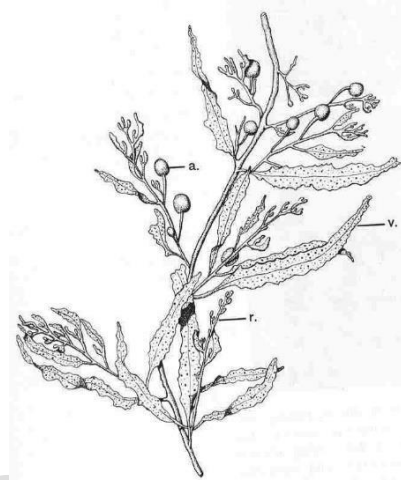


FIGURA 5. *Sargassum* sp. a) aerocisto, v) vena y r) receptáculo (Bold et al., 1980).

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 (Evert y Eichhorn, 2015; Graham y Wilcox, 2000).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	138 /222

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

- Preparaciones semipermanentes de algas verdes, rojas y pardas, ejemplares de algas fijados en formol (Gaviño *et al.*, 2005).

Materiales diversos

- Agujas de disección
- Pinzas de disección
- Franela
- Pipetas Pasteur o goteros
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cajas Petri
- Navaja de doble filo
- Charola de disección
- Guantes de látex
- Cubre bocas
- Piseta

REACTIVOS

- Aceite de inmersión
- Lugol ($I_3K + H_2O$)
- Agua destilada (H_2O)
- Gelatina glicerinada (Anexo 4)

EQUIPO

- Microscopio estereoscópico
- Microscopio de campo claro

SERVICIOS

- Agua



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	139 /222

- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

¿En qué consiste los ciclos de vida con alternancia de generaciones bifásico y trifásico?

¿Cuántos tipos de crecimiento se presentan en las algas pardas?

¿Cuáles son las características generales de las carofíceas?

¿Cuáles son las características generales de diatomeas?

Elabore un glosario con 30 términos en orden alfabético

Desarrollo de la práctica

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.

Chlorophyta (algas verdes)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	140 /222

1. Observar en ejemplares y 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 (Figura 1 y 2 del Anexo 6).
6. De los talos cenocíticos (Figuras 3-5 del Anexo 6), 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 (González y Novelo, 1986).
7. Observe estructuras de una carofícea (talo, rámulas, núcula y glóbulo) (Figura 6 del Anexo 6).
8. Con base en los caracteres observados se hará la determinación taxonómica de los ejemplares (Font Quer, 2000; Guiry y Guiry, 2022; Littler y Littler, 2000) (Anexo 7).
9. Actividad opcional: Observe muestras de agua de florero, charcas, lago, entre otros (Ortega, 1984) (Anexo 8).

Rhodophyta (algas rojas)

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	141 /222

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 filamentosa), estructuras reproductoras (tetrasporangios, cistocarpos, espermatangios, estiquidios, entre otros) (Font Quer, 2000) (Anexo 9).
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 se hará la determinación taxonómica de los ejemplares (Guiry y Guiry, 2022; Littler y Littler, 2000) (Anexo 10).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	142 /222

Phylum Ochrophyta

Clase Phaeophyceae (algas pardas) y Bacillariophyceae (Diatomeas)

1. Observará en ejemplares y 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 qué tipo son.
6. En talos foliosos observe: forma de las hojas, ramas fértiles (receptáculos), en caso de presentarlos y haga cortes del talo en plano transversal para observar conceptáculos (Figura 4 del Anexo 11).
7. Con base en los caracteres observados, se hará la determinación taxonómica de los ejemplares (Guiry y Guiry, 2022; Littler y Littler, 2000; Ortega *et al.*, 1993) (Anexo 12).
8. Tome una muestra de suelo de jardín o maceta para observar Diatomeas (Anexo 13).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	143 /222

RESULTADOS

Elabore un cuadro comparativo con las muestras revisadas para cada phylum. Así como una descripción de cada género con los caracteres observados, incluya los esquemas correspondientes.

Phylum	Género	Nivel de organización	Estructuras vegetativas	Estructuras de reproducción	Fotografía y dibujo (aumentos)

BIBLIOGRAFÍA

Bellinger, E. G. y Sigeo, D. C. (2010). *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. John Wiley and Sons.

Bold, H., Alexopoulos, C., y Delevoryas, T. (1980). *Morphology of plants and fungi*. New York, USA: Harper y Row.

Raven, P. H., Evert, R. F. y Eichhorn, S. E. (2013). *Biology of plants*. Washington, USA: Freeman and Company Worth.

Font Quer, P. (2000). *Diccionario de Botánica*. Barcelona. Labor.

Gaviño, G., Juárez, C. L., y Figueroa, H. H. (2004). *Técnicas Biológicas. Selectas de Laboratorio y de Campo*. México: Limusa.

González- González, J. y Novelo-Maldonado, E. (1986). *Algas*. En: Lot, A. y Chiang, F. (Eds.). *Manual de Herbario, administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos*. D.F., México: Consejo Nacional de la Flora de México.

Graham, E., y Wilcox, L. (2000). *Algae*. USA: Prentice Hall.

Guiry, M, y Guiry, G. (2022). *AlgaBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algabase.org>, consultado el 25 de enero de 2022.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	144 /222

Hoek, C., Mann, D., y Jahns, H. (1995). *Algae. An introduction to Phycology*. New York, USA: Cambridge University Press.

Lee, R. (2008). *Phycology*. United Kingdom: Cambridge University Press.

Littler, S., y Littler, M. (2000). *Caribbean Reef Plants. An Identification guide to the reef Plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico*. Washington, USA: Off Shore Graphics, INC.

Ortega, M. (1984). *Catálogo de algas continentales recientes de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

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*. México: AGT.

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	145 /222

ANEXO 6. Estructuras de algas verdes (Chlorophyta).



FIGURA 1. Talo laminar, género *Ulva* sp. Foto A. Avila

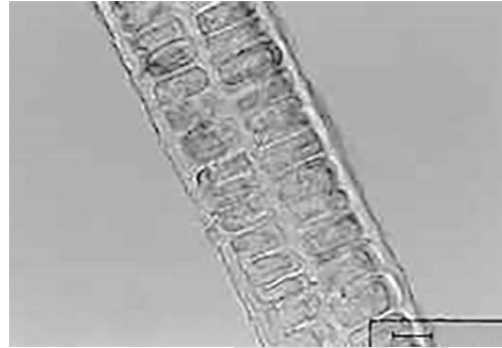


FIGURA 2. Corte longitudinal de la lámina, *Ulva* sp. Foto I. Escalante

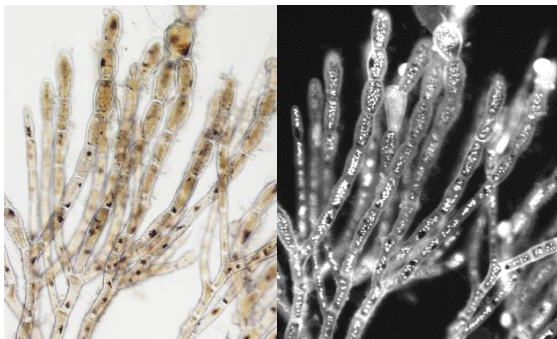


FIGURA 3. Talo sifonocladal, *Cladophora* sp.: Izq. Fotografía en campo claro. Der. Fotografía con fluorescencia mostrando células multinucleadas. Fotos S. Díaz-Martínez



FIGURA 4. Talo sifonal, *Caulerpa* sp. Foto S. Díaz-Martínez

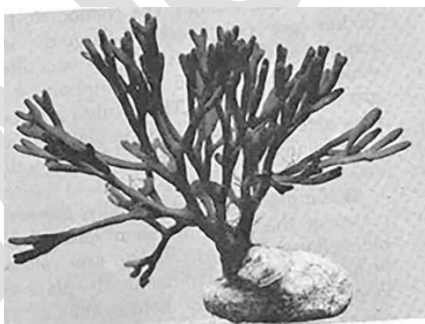


FIGURA 5. Talo sifonal, *Codium* sp.

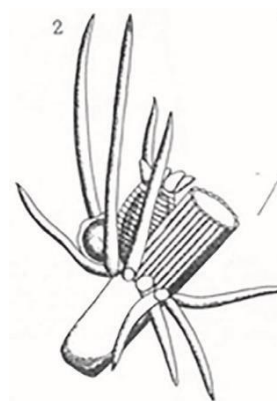


FIGURA 6. Talo pseudoparenquimatoso *Chara* sp.

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	146 /222

ANEXO 7. Clave para la determinación taxonómica de algas verdes.

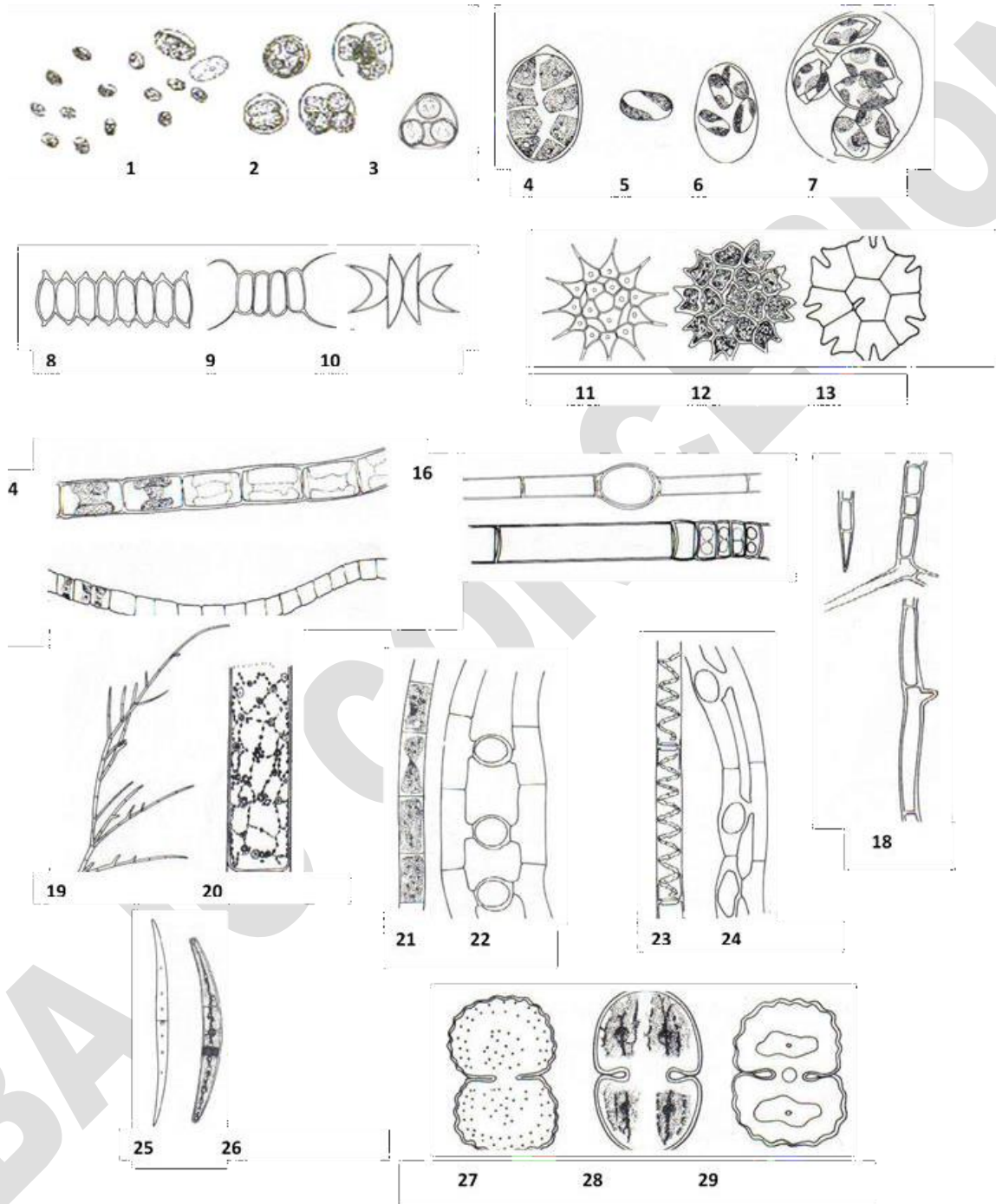
Phylum Chlorophyta

- 1a Talo filamentosos..... 2
- 1b Talo de otra forma..... 3
- 2a Talo filamentosos, cenocítico ramificado..... *Cladophora*
- 2b Talo filamentosos, celular no ramificado. *Chaetomorpha*
- 3a Talo sifonal..... 4
- 3b Talo no sifonal..... 5
- 4a Talo cenocítico con trabéculas y estolón..... *Caulerpa*
- 4b Talo cenocítico sin trabéculas. *Bryopsis*
- 4c Talo sifonal con células cenocíticas o utrículos. *Codium*
- 5a Talo hueco monostromático. *Ulva (Enteromorpha)*
- 5b Talo distromático laminar..... *Ulva*

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	147 /222

ANEXO 8. Algas verdes de cuerpos de agua continentales; tomado de Ortega, 1984.



ANEXO 8. Pie de figuras.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	148 /222

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	149 /222

Figura 26 *Closterium striolatum* var. *subtruncatum* (W. West et G.S. West) Kriegerln Rabenhorst.

Figura 27 *Cosmarium subcrenatum* Hantzsch in Rabenhorst.

Figura 28 *Cosmarium subcucumis* Schmidle.

Figura 29 *Cosmarium undulatum* Corda ex Ralfs var. *undulatum*

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	150 /222

ANEXO 9. Estructuras de algas rojas (Rhodophyta)

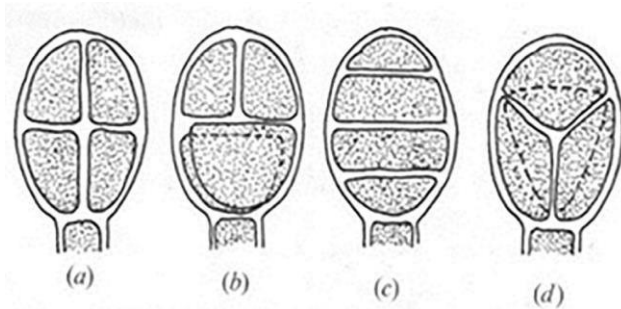


FIGURA 1. Tipos de tetrasporangio a) cruzado, b) decusado, c) zonado, d) tetraédrico (tomado de Hoeck, 1995)

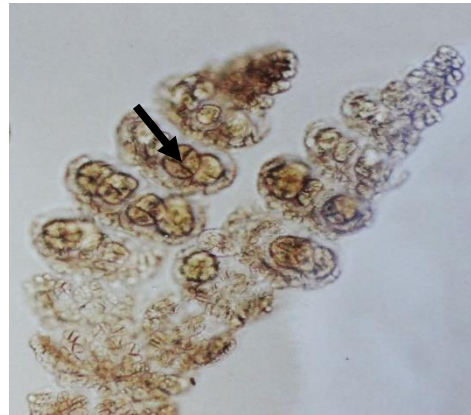


FIGURA 2. *Ceramium taylorii*. Tetrasporangios Foto A. Avila



FIGURA 3. Cistocarpo. Foto A. Avila.

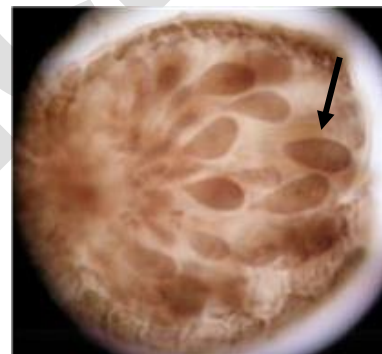


FIGURA 4. Carpospora. Foto A. Avila.

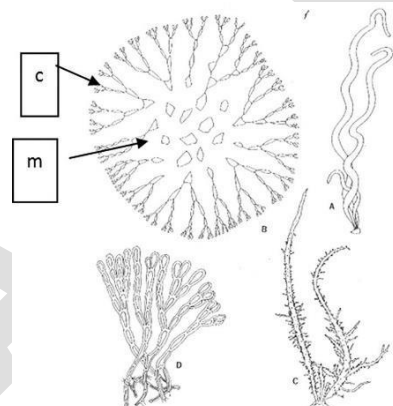


FIGURA 5. *Nematium*. Médula (m) y corteza (c) filamentosa (Scagel et al., 1983)

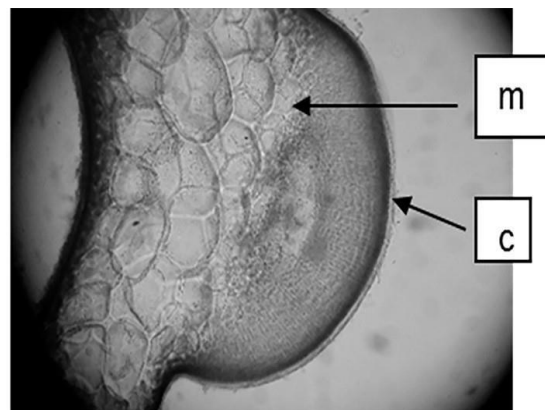


FIGURA 6. Talo con médula (m) y corteza (c) parenquimatosa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	151 /222

ANEXO 10. Clave para la determinación taxonómica de algas rojas.

1a	Talo filamentosos o filiforme.....	2
1b	Talo de otra forma, cilíndrico o complanado (polisifónico o parenquimatoso)..	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 desnudo.....	<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 diámetro 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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	152 /222

10b	Talo polisifónico.....	12
11a	Talo con ejes monosifónico y ápices curvados.....	Antithamnionella
11b	Talo con ramas monosifónicas y sin ápices curvados.	Heterosiphonia
12a	Talo polisifónico con arreglo superficial de células.....	13
12b	Talo polisifónico sin arreglo superficial de células.	Chondria
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.....	Platysiphonia
14b	Talo erecto, con algunas porciones postradas, ramas erectas.	Polysiphonia
15a	Talo sáxicola; de 9-12 células pericentrales, ramas curvadas, con tricoblastos.....	Tayloriella
15b	Talo epífito; de 10 -12 células pericentrales y ramas erectas, determinadas e indeterminadas con o sin tricoblastos.....	Herposiphonia
16a	Talo con médula filamentosa.....	17
16b	Talo con médula parenquimática.....	18
17a	Talo con corteza de filamentos subdicotómicos, rodeadas de abundante mucílago y médula con filamentos no compactos	Dermonema
17b	Talo con corteza de filamentos anastomosados, sin mucílago y médula con filamentos esparcidos entremezclados.....	Grateloupia
18a	Talo rosado, formando matas, ramas cilíndricas con depresiones en sus ápices.	Laurencia
18b	Talo de color verde claro o rosado, frondoso o cespitoso, ramas complanadas, sin depresiones en ápice.....	19



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	153 /222

- 19a Talo cespitoso, rosado; médula incolora parenquimatosa con células grandes y corteza con células pequeñas pigmentadas que no forman hileras..... **Hypnea**
- 19b Talo no cespitoso, que forma frondas, de color verde claro, médula con células pequeñas y corteza con. **20**
- 20a Talo firme y rígido, de color verde claro, con médula parenquimatosa con células de pequeñas a grandes y corteza de células muy pequeñas en líneas anticlinales que forman 4-5 hileras..... **Gymnogongrus**
- 20b Talo rígido, con médula compuesta por células grandes, isodiamétricas y corteza con células pequeñas ovoides de 2-12 capas celulares en posición anticlinal..... **Gracilaria**

BAJO CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	154 /222

ANEXO 11. Estructuras de algas pardas (Phaeophyceae).



FIGURA 1. *Ectocarpus* sp. Talo filamentoso ramificado con plurangios.

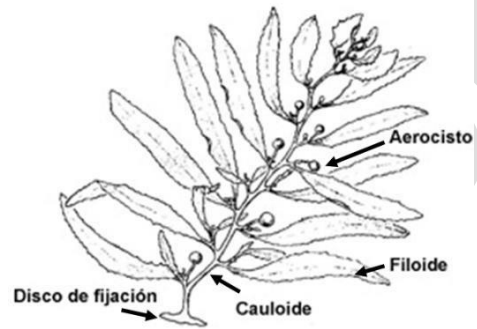


FIGURA 2. Talo folioso *Sargassum*

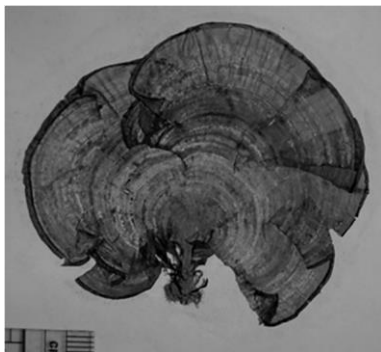


FIGURA 3. *Padina boergesenii*. Talo laminar. Foto A. Avila.

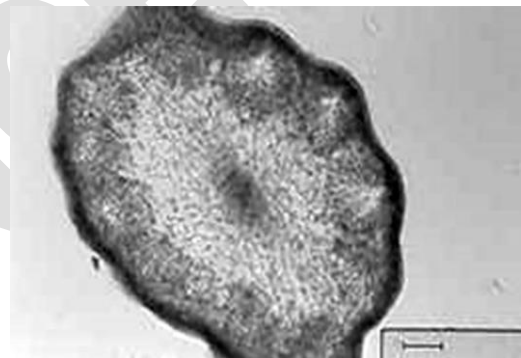


FIGURA 4. Corte de un conceptáculo *Sargassum liebmanni*. Foto I. Escalante.

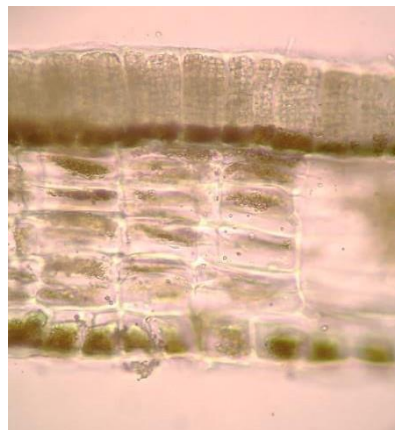


FIGURA 5. *Padina crispata*. Soro anteridial. Foto A. Avila.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	155 /222

ANEXO 12. Clave para la determinación taxonómica de algas pardas.

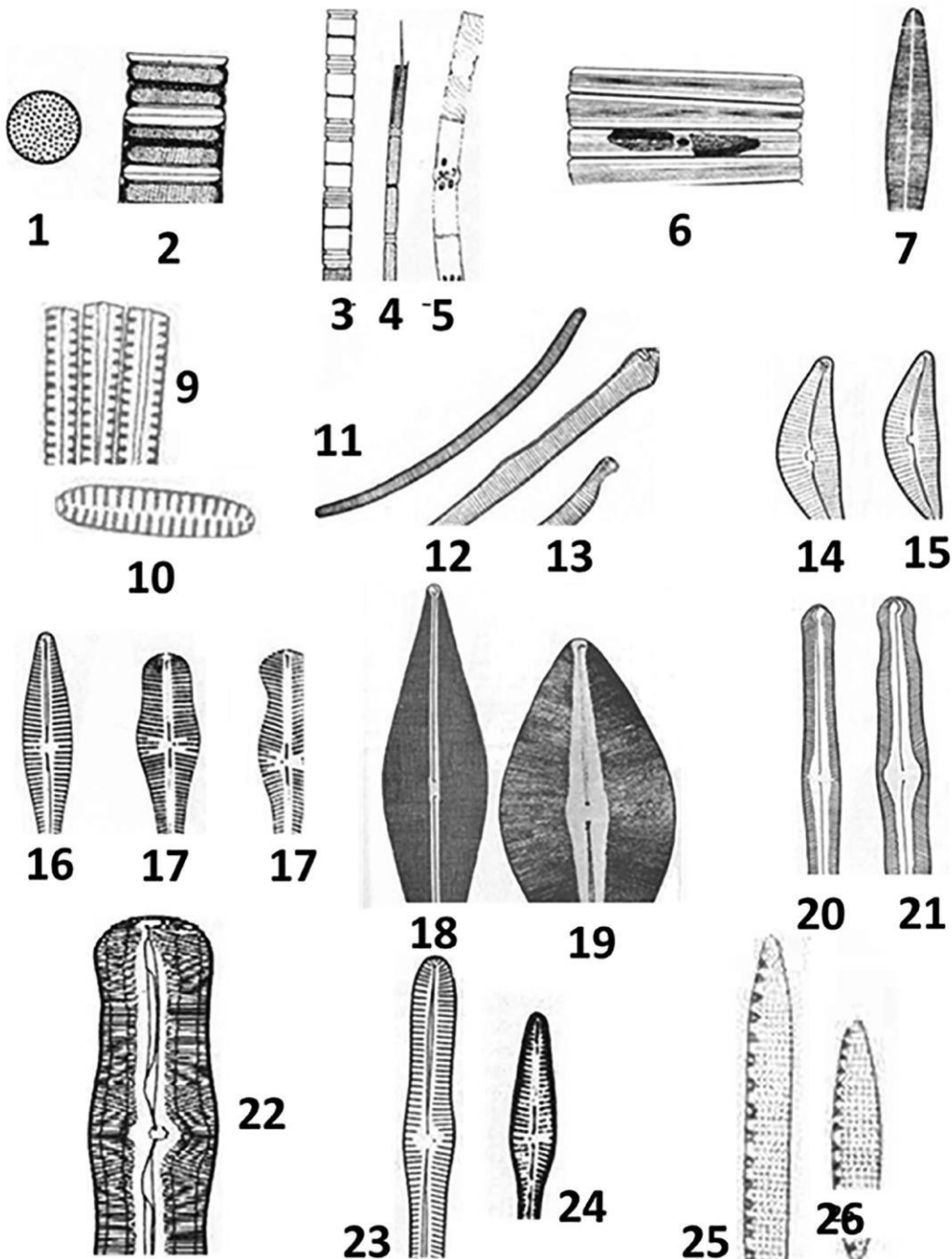
Phylum Ochrophyta

Clase Phaeophyceae

- 1a Talo filamentoso..... **2**
- 1b Talo de otra forma (laminar, acintado, parenquimatoso)..... **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 u otra forma. **Hincksia**
- 2c Formando pequeñas matas, ramas multiseriadas, con propágulos. **Sphacelaria**
- 3a Talo parenquimatoso **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 complanadas dicotómicas. **Chnoospora**
- 7b Talo folioso con filoides, caulidio y receptáculos. **Sargassum**

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	156 /222

ANEXO 13. Diatomeas; tomado de Ortega, 1984.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	157 /222

ANEXO 13. Pie de figuras.

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	158 /222

Figura 23 *Gomphonema subclavatum* Grunow in Van Heurck var. subclavatum.

Figura 24 *Nitzschia amphibian* Grunow

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	159 /222

PRÁCTICA 10.

Observación de hongos. Determinación taxonómica de macromicetos

OBJETIVO GENERAL

- Distinguir caracteres vegetativos y reproductivos de cigomicetos, ascomicetos y basidiomicetos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los caracteres externos de los micro y macromicetos.
- Aplicar técnicas de recolección para macromicetos.
- Elaborar preparaciones en fresco para la observación de estructuras somáticas y reproductivas.
- Emplear claves para la determinación taxonómica de los especímenes.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los hongos constituyen el reino Fungi el cual ha ido cambiando con base en caracteres: morfológicos, ultraestructurales y moleculares (Herrera y Ulloa, 2013; Margulis y Schwartz, 1982; Moore-Landecker, 1996; Webster y Weber, 2007). En el presente manual se sigue la propuesta por Hibbett *et al.* (2007). Es necesario resaltar que se consideran como hongos verdaderos o **fungales** todos aquellos organismos eucariotas heterótrofos por absorción que secretan enzimas degradadoras (hidrolíticas y oxidativas) para transformar los nutrimentos y asimilarlos. Sus paredes celulares están compuestas de quitina, glucanos y proteínas. Su nivel de organización es unicelular (levaduriformes, quitridiformes) o filamentoso de dos tipos (hifas cenocíticas aseptadas o septadas con poros simples o doliporos); sólo el grupo de los quitridiomicetos presentan flagelos (zoosporas) mientras que los microsporidios (no tratados en este manual), glomeromicetos, cigomicetos, ascomicetos y basidiomicetos no los



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	160 /222

presentan (Alexopoulos y Mims, 1985; Bold *et al.*, 1980). Tienen reproducción sexual y asexual por esporas. Es necesario mencionar el caso especial de los **Deuteromicetos**, fue constituido únicamente por las fases asexuales –anamorfos- (productoras de conidios) de ascomicetos y basidiomicetos de los que se desconocía su ciclo completo. Estas fases unidas a su respectiva fase sexual (teleomorfo) constituyen el holomorfo (Kiffer y Morolet, 2000).

Otros organismos se les conoce como fungoides. Estos alguna vez fueron considerados hongos pero en la actualidad se les clasifica en diferentes Phyla, entre estos se encuentra a Amebozoa (mixomicetos y dictiostélidos) y Heterokontophyta (oomicetos)(Keeling et al. 2005)

Quitridiomicetos. Talo unicelular llamado quitridial, de pared gruesa y con un opérculo apical por donde se liberan zoosporas. En la base tiene un rizomicelio cenocítico para fijación y mediante el cual por somatogamia se reproduce sexualmente. Existen también especies filamentosas. Son saprobios o parásitos (Steciow y Arambarri, 2001; Herrera y Ulloa, 2013; Ulloa y Hanlin, 1978).

Glomeromicetos. Talo filamentosos, no forman esporomas y su reproducción es sólo asexual. Son simbioses endomicorrízicos con plantas vasculares, forman vesículas y arbusculos mediante los cuales intercambian agua y sales minerales por sustancias elaboradas por las plantas (Herrera y Ulloa, 2013; Ulloa y Hanlin, 1978). Grupo ahora considerado como Phylum Glomeromycota, fue separado del hoy inexistente Phylum Zygomycota (Hibbet et al. 2007).

Zigomicetos. Talos filamentosos de hifas cenocíticas con rizoides o bien una base de fijación. Reproducción asexual por esporas en esporangios y sexual por conjugación gametangial que forma una cigospora. Son saprobios o parásitos (Fassatiová, 1986; Herrera y Ulloa, 2013; Ulloa y Hanlin, 1978). El grupo fue reclasificado con base también en filogenia molecular en cuatro subphyla de afinidad incierta hasta el momento (Mucormycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina y Entomophthoromycotina) y un Phylum: Glomeromycota (Hibbett et al. 2007).

Ascomicetos. Talos levaduriformes o filamentosos de hifas septadas. Reproducción asexual por conidios producidos en diversas estructuras y sexualmente por ascosporas (endosporas) dentro de ascas. Desarrollan esporomas (ascomas) pluricelulares cerrados (cleistotecios), semiabiertos (peritecios) o abiertos (apotecios). Son saprobios o parásitos (Beug et al. 2014; Herrera y Ulloa, 2013; Ulloa y Hanlin, 1978).



Basidiomicetos. Talos de hifas septadas, presentan conexiones de grapa (fíbulas). Reproducción asexual por conidios y sexualmente por basidiosporas (exosporas) sobre basidios septados (Fragmobasidios) o aseptados (Holobasidios). Desarrollan esporomas (basidiomas) pluricelulares con himenio expuesto (Himenomicetos) o cerrado

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	161 /222

(Gasteromicetos). Son saprobios o parásitos (Herrera y Ulloa, 2013; Singer, 1975; Ulloa y Hanlin, 1978).

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

- De preparación previa (una semana antes): Agua estancada o de florero con carnadas de papel celofán de color. Tortilla, pan bolillo (no de caja), jitomate previamente humedecidos y conservados por separado dentro de bolsas de plástico.
- Preparaciones permanentes y ejemplares de diferentes tipos de hongos. Glomeromicetos, Cigomicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos.

Materiales diversos

- Agujas de disección
- Cajas de Petri
- Frascos de vidrio 250 mL con tapa de rosca
- Navajas para rasurar de doble filo
- Tijeras
- Papel celofán de color (no transparente)
- Papel seda
- Pipetas Pasteur o goteros
- Porta y cubre objetos
- Franela

REACTIVOS

- Aceite de inmersión
- Agua destilada (H_2O)
- Alcohol etílico (C_2H_5OH)
- Gelatina glicerinada (Anexo 4)
- Cristales de Iodo (I_2)
- Ioduro de potasio (KI)



- Hidrato de cloral ($C_2H_3Cl_3O_2$)

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	162 /222

Para recolección de hongos

- Cajas blancas pequeñas de cartón
- Canasta
- Etiquetas de recolección (Anexo 14)
- Marcador de cera
- Papel encerado
- Bolsas de polipapel
- Secadora con focos

EQUIPO

- Microscopio estereoscópico
- Microscopio de campo claro

SERVICIOS

- Agua
- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación
- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	163 /222

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

1. Explique la diferencia entre anamorfo, teleomorfo y su relación en el ciclo de vida de ascomicetos y basidiomicetos.
2. Busque 5 ejemplos para cada caso: hongos micorrízicos, hongos de importancia industrial; hongos de importancia médica; hongos de importancia alimentaria.
3. Describa las diferencias entre las hifas de Cigomicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos.
4. Elaborar un cuadro comparativo entre fungoides y fungales acorde a la clasificación de Keeling *et al.* (2005) o *Tree of life* (<http://tolweb.org/tree/>).

Desarrollo de la práctica

Quitridiomycetos

Se obtienen mediante la colocación de “carnadas” dentro de agua estancada o de florero; las carnadas son pequeños cuadritos de papel celofán de color (para su fácil localización) recortados a un tamaño menor de un cubreobjetos. Después de dejarlos unos días en el agua, los talos quitridiales deberán buscarse en los márgenes de la carnada. Son fácilmente identificables por su aspecto casi esférico, sus paredes gruesas muy refringentes a la luz, generalmente un poro apical y crecimiento basal de rizomicelio.

Glomeromicetos

Observar preparaciones de esporas y raíces micorrizadas. Localizar hifas, vesículas y arbusculos dentro de las células.

Cigomicetos (Anexo 16)

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	164 /222

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.

Observación de gametangios jóvenes o maduros (protuberancias hifales cercanas entre sí o en franco contacto) y la formación de cigosporas 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 la observación será más fácil.

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 incospicua 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 un 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	165 /222

Deuteromicetos. Se pueden observar también sobre los trozos de las tortillas, pan, harina, pastas semillas o frutas en una cámara húmeda (frasco, caja Petri o bien, una bolsa de plástico ligeramente inflada). Revisar las colonias verduscas.

Penicillium. Presenta sobre los conidióforos de manera ramificada métulas y fiálides productoras de conidios.

Aspergillus. Sobre los conidióforos presenta vesículas conidiales con métulas y fiálides sobre los que se producen los conidios.

Macromicetos recolecta y observación

La recolección de macromicetos (ascomicetos 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 (**Anexo 14**) 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) (Beug *et al.*, 2014; Cifuentes *et al.*, 1986; Delgado *et al.*, 2004; Guzmán, 1977; Lincoff, 1981).

Ascomicetos (Anexo 17)

Para observar levaduras se recomienda hacer preparaciones de pulque en donde la más abundante es *Saccharomyces* (Webster y Weber, 2007).

Xylaria: hacer cortes del estroma peritecial para observar peritecios, ascas y ascosporas (Beug *et al.* 2014).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	166 /222

Helvella, Morchella, Peziza. Hacer cortes transversales de los apotecios para observar paráfisis y ascas con ascosporas (Beug *et al.*, 2014).

Basidiomicetos (Anexo 17)

En el huitlacoche (**Ustilago maydis**) se pueden apreciar los llamados soros o agallas que contienen teliosporas oscuras y ornamentadas (observe las hifas con fíbulas) (Herrera y Ulloa, 2013).

En los hongos gelatinosos es posible apreciar frugobasidios en **Auricularia** con septos transversales y en **Tremella** con septos longitudinales (Webster y Weber, 2007).

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. En ambos casos hacer uso de claves taxonómicas especializadas para determinar algunos ejemplares (Guzmán, 1977; Largent, 1977; Largent *et al.* 1981; Largent *et al.* 1988; Moser, 1983; Phillips, 2010).

RESULTADOS

Elabore un cuadro comparativo con las muestras revisadas para cada phylum. Así como una descripción de cada género con los caracteres observados, incluya los esquemas correspondientes.

Phylum	Género	Estructuras vegetativas	Estructuras de reproducción	Fotografía y dibujo (indicar aumento)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	167 /222

BIBLIOGRAFÍA

Alexopoulos, C. y Mims, C. (1985). *Introducción a la Micología*. Barcelona, España: Omega.

Beug, W., Bessette, A. E. y Bessette, A. R. (2014). *Ascomycete Fungi of North America: a mushroom reference guide*. USA: University of Texas Press.

Bold, H., Alexopoulos, C., y Delevoryas, T. (1980). *Morphology of plants and fungi*. New York, USA: Harper y Row.

Bresinsky, A., y Besl, H. (1990). *A colour atlas of poisonous fungi: A handbook for pharmacists, doctors, and biologists*. London, United Kingdom: Wolfe Publishing Ltd.

Cifuentes, J., Villegas, M. y Pérez-Ramírez, L. (1986). Hongos. En: Lot, A. y Chiang, F. (Eds.). *Manual de Herbario, administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos*. D.F., México: Consejo Nacional de la Flora de México.

Delgado, A. F., Villegas, M.R., y Cifuentes, J. B. (2005). *Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar*. D.F., México: Facultad de Ciencias, UNAM.

Fassatióvá, O. (1986). *Moulds and filamentous fungi in technological microbiology*. Progress in industrial microbiology. New York, USA: Elsevier.

Guzmán, G. (1977). *Identificación de los hongos: comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de madera*. D.F., México: Limusa.

Herrera, T. y Ulloa, M. (2013). *El Reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. D.F., México: Fondo de Cultura Económica.

Hibbett, D. S., et al. (2007). *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. Mycological research, 111, 509-547.

Keeling P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W, Pearlman, R. E, Roger, A. J y Gray, M. W. (2005). *The tree of eukaryotes*. Trends Ecol Evol. 20(12): 670-6.

Kiffer, E. y Morolet, M. (2000). *The Deuteromycetes. Mitosporic Fungi. Classification and Generic keys*. New Hampshire. USA: Science Publishers Inc.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	168 /222

Largent D. L. y Johnson, D. (1977). *How to Identify Mushrooms to Genus: Macroscopic Features*. Eureka. United States of America: Mad River Press.

Largent D. L., Johnson D. y Watling R. (1981). *How to Identify Mushrooms to Genus III: Microscopic Features*. Eureka. USA: Mad River Press.

Largent D. L. y Baroni T. J. (1988) *How to Identify Mushrooms to Genus VI: The Modern Genera Keys and Descriptions*. Mad River Press

Lincoff, C. (1981). *The Audubon field guide to North American Mushrooms*. New York, USA: Chanticleer Press.

Margulis, L., y Schwartz, K. (1982). *Five kingdoms. An illustrated guide to the Phyla of life on Earth*. New York, USA; W. H. Freeman.

Moore-Landecker, E. (1996). *Fundamentals of the fungi*. Englewood Cliffs, USA: Prentice Hall.

Moser, M. (1983). *Keys to Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales)*. En: Games, H. Kleine Kryptogamenflora. USA: Phillips.

Müller, E., y Loeffler, W. (1976). *Micología*. Barcelona, España: Omega.

Perry, J., y Morton, D. (1998). *Photo Atlas for Botany*. Belmont, USA: Wadsworth Publishing Co. Phillips, R. (2010). *Mushrooms and other Fungi of North America*. USA: Firefly Books.

Singer, R. (1975). *The Agaricales in the modern Taxonomy*. J. Cramer, Weinheim. USA.

Smith, H. V. y Smith, A. H. (1973). *How to know the non-gilled fleshy fungi*. Wm. C. Brown, Duburque.

Steciow, M. M., Elíades, L. A. y Arambarri, A. M., (2001). *Nuevas citas de Blastocladales (Chytridiomycota) en ambientes contaminados de Ensenada (Buenos Aires)*. Darwiniana, 231-237.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	169 /222

Ulloa, M. (1991). *Diccionario ilustrado de Micología*. México: Instituto de Biología. UNAM. Ulloa, M., y Hanlin, R. (1978). *Atlas de Micología básica*. D.F., México: Concepto.

Webster, J. y R. Weber. (2007). *Introduction to Fungi*. New York, USA: Cambridge University Press.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	170 /222

ANEXO 14. Etiqueta general de recolección para macromicetos.

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: _____	
ESPOROMA: Ascoma () Basidioma () <i>gasteroma</i> (): 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): _____	
Himenio: Apotecio () Peritecio () LÁMINAS () POROS () LISO () VENAS () GLEBA ()	
Descripción (forma, consistencia, borde): _____	
ESTÍPITE: tamaño _____ - _____ X _____ - _____ mm	
Forma, superficie, base, color, contexto, olor: _____	
Ornamentación: (forma, tamaño, color, olor) _____	
ANILLO, VELO, VOLVA (tipo, color, posición): _____	

ESPORADA _____ No. FOTO _____	



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	171 /222

ANEXO 15. Medios de cultivo y solución Melzer.

H.M.A. (harina de maíz-agar)

Composición:

- 20 g harina de maíz
- 15 g de agar
- 20 g dextrosa (C₆H₁₂O₆)
- 20 g peptona
- Agua destilada (H₂O) 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 la 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 la 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.

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 (C₆H₁₂O₆)

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	172 /222

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

Composición:

- agar base 15 g
- agua destilada (H₂O) 1000 mL

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

Solución MELZER

Composición:

- Cristales de Yodo (I₂) 0.5 g
- Yoduro de potasio (KI) 1.5 g
- Hidrato de cloral (C₂H₃Cl₃O₂) 20 g
- Agua destilada (H₂O) 20 mL

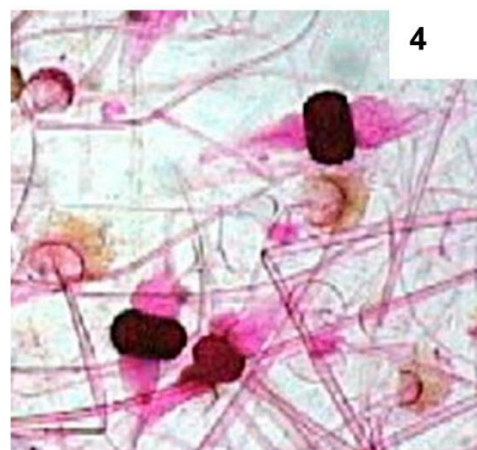
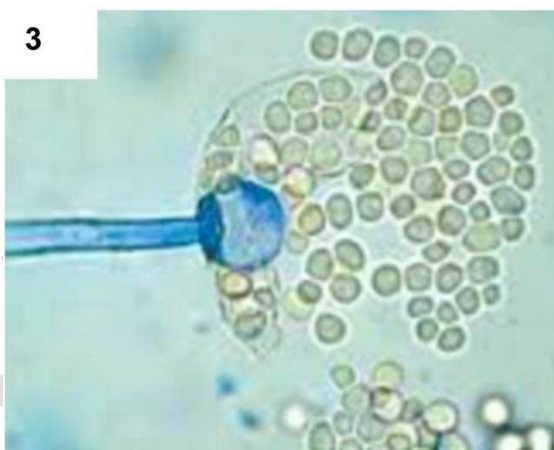
Disolver los cristales de yodo en el agua (pueden disolverse primero en un poco de alcohol 96°) después el yoduro de potasio y el hidrato de cloral. Guardar en frasco ámbar.

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 evidente, resalta de la coloración del reactivo Melzer del fondo de la preparación.
- **Inamiloide:** si la reacción es negativa y no existe diferencia del color de la pared de la espora y la coloración del reactivo Melzer del fondo de la preparación.

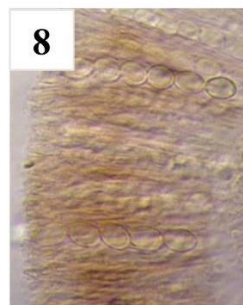
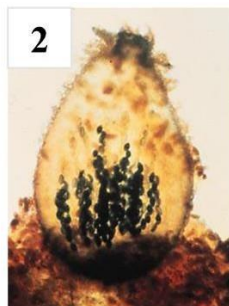
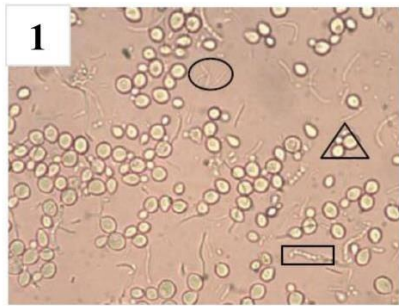
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	173 /222

ANEXO 16. Cigomicetos. 1. Micelio y esporangios *Mucor* spp. sobre jitomate. 2. Esporangios sobre esporangióforos unidos en racimo (*Rhizopus* spp.). 3. Esporangio, esporas y esporangióforo con columela (*Mucor* spp.). 4. Cigosporas de *Rhizopus* spp. (Tomado de: <http://www.trackingzebra.comnewblog>; <http://delrio.dcccd.edu/jreynolds/microbiology>).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	174 /222

ANEXO 17. Grupos principales de macromicetos (Fotografías originales de Hernández-Muñoz y Sánchez Flores excepto las señaladas).





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	175 /222

Levaduriformes. 1. Levaduras de pulque *Saccharomyces* (triángulo). Tomado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/iit/v17n2/1405-7743-iit-17-02-00251.pdf>

Con peritecios en un estroma (2. *Pyrenomyces*) tomado de <http://www.apsnet.org>

Xylariaceae. Ascomas muy duros, como madera, diversas formas: delgados con o sin ramificación o bien cilíndricos gruesos (3. *Xylaria* spp.); hemisféricos, pulvinados o aplanados (4. *Daldinia* spp.). Son de colores oscuros (negro o café) Lignícolas, algunos fimícolas.

Clavicipetaceae. Hongos carnosos o cartilagosos, nunca duros. Largos, delgados o en forma de clava; colores claros. Parásitos de insectos u hongos (5. *Cordyceps* spp.) tomado de <https://www.flickr.com/photos/nickadel/45593787851/>; parásitos de gramíneas (6. *Claviceps* spp.) Tomado de <http://apobyotecnologia.wikidot.com/biologia>

Con apotecios (7. *Discomycetes* tomado de <https://www.pinterest.com.mx/pin/434808539019255054/>). 8. Corte transversal de apotecio mostrando ascas con ascosporas.

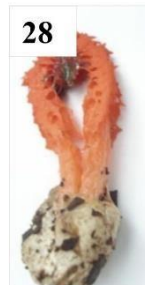
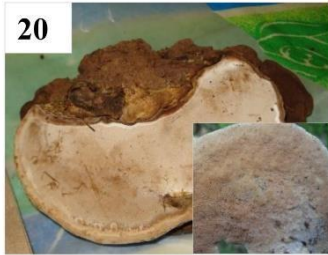
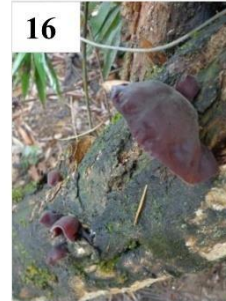
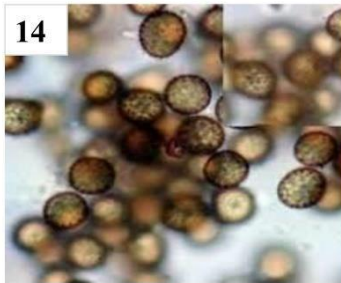
Pezizaceae. Ascomas en forma de copa o discoidales simétrico o no, de consistencia cartilaginosa- carnosa. Colores oscuros, opacos, raramente claros brillantes. Variado tamaño, sobre varios sustratos. Himenio liso. 9. *Scutellinia scutellata* y 10. *Aleuria* spp.

Helvellaceae. Apotecio plano, plegado y estipitado; varios colores. Cartilagosos o algo carnosos. Terrícolas. 11. *Helvella* spp. y 12. *Macropodia* spp.

Morchellaceae. 13. *Morchella* Tomado de <http://setasextremadura.blogspot.mx>

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	176 /222

BASIDIOMICETOS



Heterobasidiomycetes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	177 /222

14. Carbones (Ustilaginales). Sin basidioma, forman agallas con teliosporas previas a las basidiosporas (Huitlacoche). Tomado de <https://www.asturnatura.com/fotografia/setas-hongos/ustilago-maydis-2/1462.html>

Gelatinosos (*Tremellales*). Hongos gelatinosos con basidiomas de formas variadas, generalmente lobulados, plegados o auriculiformes, pueden ser estipitados. Himenio liso, verrucoso o espinoso. Lignícolas o terrícolas.

Tremellaceae. 15. *Tremella* spp. **Auriculariaceae** 16. *Auricularia* spp.

Holobasidiomycetes. Los basidiomicetos pueden agruparse por su tipo de himenio y consistencia del basidioma (contexto) en los siguientes **ÓRDENES y Familias:**

Láminas; carnosos. En forma de seta, pueden carecer de estípite **AGARICALES. Varias familias de acuerdo al color de su esporada (*Agaricaceae, Amanitaceae, Cortinariaceae, Tricholomataceae* etc.)** 17. *Cortinarius* spp. 18. *Amanita* spp.

Basidioma en forma de seta, poros; carnosos. **BOLETALES *Boletaceae*** 19. *Suillus* spp. El grupo de los **APHYLLOPHORALES** abarca todos lo demás tipos:

Polyporaceae. Poros; duros, correosos. En forma de seta o repisa. 20. *Polyporus* spp.

Cantharellaceae. Pliegues que forman arrugas o tienen apariencia laminar; carnosos. En forma de embudo. 21 *Cantharellus* spp.

Hydnaceae Dientes o acúleos; carnosos, ligeramente correosos. En forma de seta, pueden carecer de estípite. 22 *Sarcodon* spp.

Clavariaceae Liso; carnosos. En forma de clava o coral. 23 *Ramaria* spp.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	178 /222

El grupo artificial de los **GASTEROMICETOS** abarca todos los basidiomicetos que tienen su parte fértil (**gleba**) cubierto por tejido (**peridio**). Por ello al esporoma se le denomina gasteroma.

LYCOPERDACEAE. Gasteroma globoso, subgloboso, piriforme. Gleba polvosa con capilicio.
24 *Lycoperdon* spp.

SCLERODERMATACEAE Gasteromas globosos con peridio grueso, gleba polvosa dividida (peridiolos) sin capilicio. 25 *Scleroderma* spp.

TULOSTOMATACEAE Gasteromas estipitados, peridio globoso; gleba polvosa con capilicio.
26 *Tulostoma* spp.

GEASTRACEAE Gasteromas con tres capas de peridio (exo-, meso- y endoperidio) o sólo dos (exo y endo). La gleba es polvosa y queda contenida en el endoperidio. El exo y el mesoperidio se abren en forma de estrella y quedan como base del endoperidio. 27 *Geastrum* spp.

CLATHRACEAE El receptáculo puede ser sésil, reticular, estipitado o ramificado en brazos a manera de tentáculos o cortos y anastomosados. Existe volva y la gleba está en la parte inferior del receptáculo. 28 *Laternea* spp.

NIDULARIACEAE Hongos correosos en forma de embudo conteniendo uno o varios cuerpos lenticulares que contienen la gleba (peridiolos). Lignícolas o fimícolas y algunos terrícolas. 29 *Cyathus* spp.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	179 /222

PRÁCTICA 11.

Observación, pruebas químicas y determinación taxonómica de líquenes

OBJETIVO GENERAL

- Diferenciar caracteres vegetativos y reproductivos de los diferentes grupos de líquenes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los diferentes tipos de talos liquénicos.
- Observar la morfología externa e interna del talo liquénico.
- Aplicar las técnicas de recolecta para líquenes.
- Observar las estructuras de preparaciones en fresco.
- Utilizar claves taxonómicas para la determinación de especímenes.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El líquen es un tipo de “organismo” muy especial en la naturaleza, ya que es producto de la asociación mutualista entre un hongo (micobionte) y un 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 (Brodo, 2001; Nash, 2010).

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	180 /222

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 (Galun, 1988).

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. (Ahmadjian, 1993; Brodo *et al.*, 2001).

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 (fruticosas). 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 (Brodo *et al.*, 2001; Córdoba, 1975; Hale, 1979; Huneck y Yoshimura, 1996).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	181 /222

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 (Ahmadjian, 1993; Galun, 1988).

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 (Brodo *et al.*, 2001; Córdoba, 1975; Galun, 1988; Hale, 1983; Hawksworth, 1984).

MATERIAL Y REACTIVOS

Material biológico

- Talos de diversas especies de líquenes.
- Preparaciones permanentes

Materiales diversos

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Navajas para rasurar de doble filo
- Mechero Bunsen
- Franela
- Papel absorbente
- Papel seda

REACTIVOS

- Agua destilada (H₂O)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	182 /222

- Acetona (C_3H_6O)
- Glicerina ($C_3H_8O_3$)
- Etanol al 96° (C_2H_5OH)
- O-toluidina (C_7H_9N)
- Quinolina (C_9H_7N)
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Hipoclorito de sodio (NaClO)
- Parafenilenediamina ($C_6H_8N_2$)
- Gelatina glicerinada (Anexo 4)

Recolección de líquenes

- Morral
- Botes de plástico de diversos tamaños
- Papel encerado.
- Marcador de cera.
- Cajas blancas pequeñas de cartón.
- Etiquetas de campo (Anexo 18)

EQUIPO

- Microscopio estereoscópico.
- Microscopio de campo claro.

SERVICIOS

- Agua
- Energía eléctrica
- Campanas de extracción
- Extractores de ventilación



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	183 /222

- Tarjas de lavado
- Extintores
- Regaderas de seguridad
- Gavetas
- Mesas de trabajo
- Ventanas para la ventilación
- Botiquín de emergencia

PROCEDIMIENTO

Actividades previas

El alumno realizará una investigación bibliográfica sobre los siguientes puntos, antes del desarrollo de la práctica.

1. Discuta ampliamente al líquen como una especie.
2. Mencione 5 especies líquénicas e indique su morfología y los simbiontes que lo conforman.
3. Dibuje la anatomía de un talo homómero y uno heterómero e indique sus partes.
4. Enliste por lo menos cinco compuestos líquénicos.
5. Investigue algunos otros usos aparte de los mencionados en este manual.
6. Mencione los caracteres morfológicos que permiten diferenciar entre las especies líquénicas.

Desarrollo de la práctica

Recolección

Durante la recolección 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 (Anexo 18). El material se puede tomar directamente o con cuchillo o martillo y cincel según el sustrato donde se encuentre. Colocar el material líquénico 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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	184 /222

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 (Coutiño, 1986; Hale, 1979).

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. 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 (Coutiño, 1986; Gaviño, 2005).

Morfología y determinación taxonómica

Trabajar los especímenes liquénicos recolectados. Revisar la morfología de cada ejemplar y mediante el uso de las claves para identificación del **Anexo 19** determinar a nivel de género (Brodo, 2001; Dobson, 1992; Hale, 1979). Aplicar algunas de las pruebas químicas y de cristalización que se explican a continuación (**Anexo 20**).

Se recomienda trabajar los siguientes géneros:

- **Costrosos:** *Caloplaca*, *Graphis*, *Lecanora* y *Lepraria*.
- **Foliáceos:** *Candelaria*, *Candelariella*, *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 (**Anexo 19**) (Brodo, 2001; Hale, 1979; Huneck y Yoshimura, 1996).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	185 /222

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 las gotas (ambas de manera continua e inmediata sobre el mismo trozo de liquen). 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 (Brodo, 2001; Hale, 1979; Huneck y Yoshimura, 1996)

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 cristalizador (GE; GAW, GAQ o GaoT descritos en el **Anexo 19**). 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 (1979) (**Anexo 21**).

RESULTADOS

Elabore un cuadro comparativo con las muestras revisadas para género. Así como una descripción de cada uno con los caracteres observados, incluya los esquemas correspondientes.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	186 /222

Género	Forma	Color	Sustrato	Estructuras de reproducción	Reacción química (KOH, NaClO)	Foto y dibujo (aumento)

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	187 /222


BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadjian, V. (1993). *The lichen symbiosis*. New York, United States of America: John Wiley and Sons, INC
- Brodo, I. M., Sharnoff, S. D. y Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America*. New Haven, United States of America: Yale University Press.
- Coutiño, B. (1986). Líquenes. En: Lot, A. y Chiang, F. (Eds.). *Manual de Herbario, administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos*. D.F., México: Consejo Nacional de la Flora de México.
- Córdoba, C. V. (1975). *Fisiología de las sustancias líquénicas*. Madrid, España: Alhambra.
- Dobson, F. S. (2000). *Lichens: an illustrated guide to the British and Irish species*. Richmond, USA: The Richmond Publishing Co. Ltd.
- Galun, M. (1988). *Handbook of Lichenology*. Florida, United States of America. CRC Press, Inc. Boca Raton
- Gaviño, G., Juárez, C. L., y Figueroa, H. H. (2004). *Técnicas Biológicas. Selectas de Laboratorio y de Campo*. México: Limusa.
- Hale, M. E. (1979). *How to know the Lichens. The Pictured Key Nature Series*. Dubuque Iowa, United States of America. Wm. C. Brown Company Publishers.
- Hale, M. E. (1983). *The Biology of lichens*. Baltimore, United States of America. Edward Arnold
- Hawksworth, D. L. y Hill, D. J. (1984). *The lichen-forming fungi*. New York, United States of America. Blackie, Chapman and Hall.
- Huneck S. y I. Yoshimura (1996). *Identification of lichen substances*. Springer, Berlin, 493, pp.
- McCune, B., y Geiser, L. (2009). *Macrolichens of the Pacific northwest*. Corvallis, OR, USA: Oregon State University Press.
- Nash III, T.H. (2010). *Lichen biology*. United States of America. Cambridge University Press.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	188 /222

ANEXO 18. Etiqueta para la recolección de líquenes.

LÍQUENES HERBARIO FEZA FES ZARAGOZA U. N. A. M. FEZA					
Nom. Científico _____					
Recol. _____		No. Recol. _____		Fecha _____	
Determinó: _____ FOTOGRAFÍA _____					
Edo. _____		Loc. _____		Mpio. _____	
Vegetación _____ Asoc. _____					
SUSTRATO: terric() lign() sax() otro _____					
Lat/Long/Alt. _____					
TALO muy adh() poco adh() fácil() F lepr() costra() escum() subfol() foliáceo() umbilic() frutic() gelat() flabel() cinta() cilind() lob() filoclad() podocio() acanal() Lóbulos: _____ mm anchos() angostos() sólidos() huecos() otros _____ MARGEN: liso() desgarr() lobul() pruin() filidios() recurv() CILIOS: simpl() ramif() escuarr() cortos() largos() bulb() color/otros _____					
CÓRTEX SUP liso() rugoso() alveol() grietas() pruina() gránulos() pelos() marc-bcas() pseudocifel() cefalodios() Color blanco() amarill() naranja() rojo() azulado() negro() Verde limón() v-amarill() v-oscuro() v-mineral() v-olivo() Gris-miner() café claro() café obsc() otro _____					
CÓRTEX INF liso() rugoso() venoso() retic() ecortic() cifel() pseudocifel() Color blanco() amarill() naranja() rojo() azulado() negro() Verde limón() v-amarill() v-oscuro() v-mineral() v-olivo() Gris-miner() café claro() café obsc() Hacia el margen más claro() negro() ¿con rizinas? () pocas () num() otro _____					
MÉDULA sólida() hueca() algodonosa() cordón() cefalodios() Color blanca() otro _____					
RIZINAS s/riz() pocas() num() simples() Ramific: furc() escuarr() dicot() Tomento: algodón() terciop() hirsuto() otro _____					
APOTECIOS Disco() Sésil() Subest() Lirel() lamin() margin() nefro() ciliados() lecan() lecid() biator() PERITECIOS lam() marg() Picnidios lamin() marg() submarg() otro _____					
SOREDIOS lamin() marg() difusos() orbic() linear() ISIDIOS lamin() marg() planos() glob() cilind() ramif() i-sored() _____					
FOTOBIONTE cianobionte() clorobionte() Nom. Cientif. _____					
PRUEBAS MACROQUÍMICAS reacción- color- tiempo					
Reactivo	Córtex	médula	Reactivo	córtex	médula
K			UV nm		
C			FeCl		
KC			I (lugol)		
CK					
P					



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	189 /222

ANEXO 19. Soluciones empleadas en liquenología.

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

- Formol (CH_2O) comercial 10 mL
- Agua destilada (H_2O) 35 mL
- Ácido acético glacial (CH_3COOH) 5 mL
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (alcohol 96°)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Reactivo K

Hidróxido de potasio KOH al 20%

Agua destilada (H_2O) 30 mL

Preparar solución concentrada.

Reactivo C

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

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

Cristales de parafenilenediamina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$)

Alcohol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	190 /222

Agentes recristalizantes:

GE glicerol ($C_3H_8O_3$): ác. Acético (CH_3COOH) (1 : 3)

GAW glicerol ($C_3H_8O_3$): etanol (C_2H_5OH) : agua (H_2O) (1: 1: 1)

GAoT glicerol ($C_3H_8O_3$): etanol (C_2H_5OH): o-toluidina (C_7H_9N) (2: 2: 1)

GAQ glicerol ($C_3H_8O_3$): etanol (C_2H_5OH): quinolina (C_9H_7N) (2: 2: 1)

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	191 /222

ANEXO 20. Clave para determinar líquenes a nivel de género.

Autor: Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz

La clave para géneros de líquenes es de tipo analítico-sinóptico con un formato de diagrama de flujo que facilita el seguimiento de los caracteres.

Consta de cuatro entradas numeradas según la forma del talo: 1. Líquenes con talo foliáceo, la ruta de determinación se indica con las líneas interrumpidas de color verde. 2. Líquenes con talo foliáceo con los lóbulos muy adheridos al sustrato, las opciones se marcan con líneas punteadas anaranjadas. 3. Líquenes con talo umbilicado, el camino a seguir se indica en líneas azules. 4. Líquenes fruticosos (y foliáceos con hábito fruticoso pero sin rizinas) las líneas se resaltan en color rosa.

Para iniciar la lectura de la clave se necesita elegir la entrada (1, 2, 3 ó 4) en función del tipo de talo y las respectivas líneas de color trazan la ruta de determinación. En la entrada número cuatro, por optimizar espacio se señalaron cuatro opciones extras: un par de opciones (entrada 1 debajo de la alternativa “no gelatinosos”) encerradas en paréntesis de colores: la anaranjada redirecciona la búsqueda por la entrada 2 debido al color del talo y la de color rosa para redirigir a la entrada 4 hacia *Cladonia* en caso de ser lobulaciones pequeñas sin córtex inferior.

Las otras dos opciones son flechas gruesas color rosa en la entrada 4, una guía hacia las “cladonias” que pueden tener ramificación; la otra indica al género *Everniastrum* cuyo hábito es foliáceo pero su talo acanalado le da un aspecto fruticoso. Por esta razón es posible abordarlo por ambas entradas (1 ó 4) pero la presencia de rizinas y/o cilios lo separa de los verdaderos líquenes fruticosos.

El nombre de cada género tiene una tipografía característica que contiene información adicional a manera de una clave pictórica: la gran mayoría de los nombres se iluminaron con el color de su talo respectivo; algunos mediante la trama de relleno representan ciertas características particulares como en el caso de las cífelas de *Sticta* y las pseudocífelas de *Pseudocyphellaria* y *Punctelia*, o las venaciones de *Peltigera* y las arrugas marcadas de *Lobaria*. Los dos géneros gelatinosos foliáceos indican su tipo de talo mediante puntuaciones



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	192 /222

en el caso de *Collema* que no tiene estratificación y por lo tanto el nombre no tiene línea continua mientras que *Leptogium* sí la presenta.

Cladina tiene un contorno difuso por no tener córtex y el interior blanco por ser hueco mientras que el talo de *Alectoria* sí tiene córtex (línea continua) pero es hueco igual que *Hypogymnia* y al contrario que *Usnea* cuyo talo es sólido por presentar médula en forma de un cordón central (interior amarillo) y también es corticado. Las rizinas se indican cuando sean un carácter diagnóstico como es el caso de *Candelaria* y *Umbilicaria* y los talos ciliados tienen representados alrededor del nombre los cilios con líneas onduladas (*Heterodermia*, *Parmotrema*) y los bulbilos con protuberancias negras (*Bulbothrix*).

Cladonia tiene representadas las escuámulas basales con círculos verdes pequeños mientras que con óvalos cafés se muestran los apotecios recurvados hacia abajo en *Nephroma* y los superficiales e incrustados de *Solorina*. En la entrada 3 se acentuó el carácter umbilicado (un solo punto de fijación) con el encabezado a manera de "llamada" y se añadió un símbolo de círculos concéntricos negros para representar los apotecios replegados de *Umbilicaria* y *Lasallia*, mientras que a *Dermatocarpon* se señalan sus peritecios con puntos.

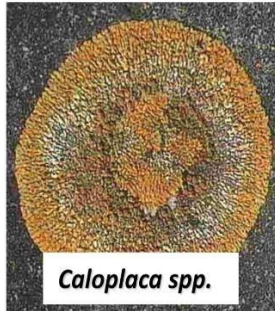
Hypotrachyna tiene representada su lobulación truncada y sus espacios semicirculares en la forma de su letra "H". El talo en forma de repisa de *Cora* se representa proyectado hacia adelante y en su interior se marcan las líneas concéntricas del talo; los talos canaliculados se representan en la misma curvatura del nombre del género (*Heterodermia* y *Everniastrum*).

Evernia por ser de talo flexible se representa ondulado pero además su contorno es grueso y el relleno claro para ejemplificar en este caso el diferente color del córtex superior e inferior al igual que *Pseudevernia* pero éste no se representa ondulado ya que el talo es rígido; en contraste

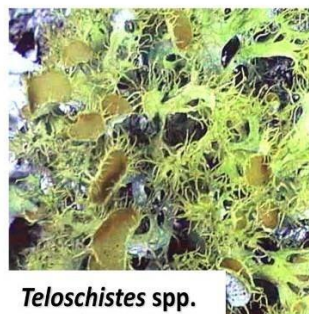
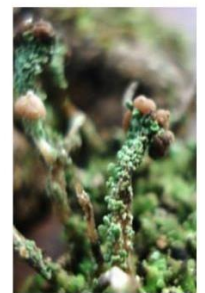
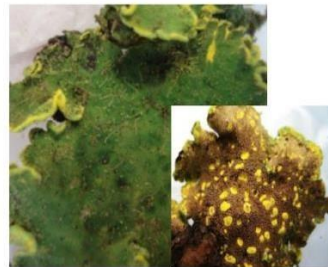
Ramalina no tiene línea de contorno y color interno para representar que ambos córtex los tiene de igual color. Algunas reacciones químicas muy evidentes se representan con su respectivo color en los contornos de *Caloplaca*, *Xanthoria*, *Teloschistes* (K+) por ser el córtex el que reacciona y en el interior de *Flavopunctelia* porque la que reacciona es la médula (C+). Se anexa el significado de las abreviaturas.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	194 /222

GÉNEROS DE LÍQUENES

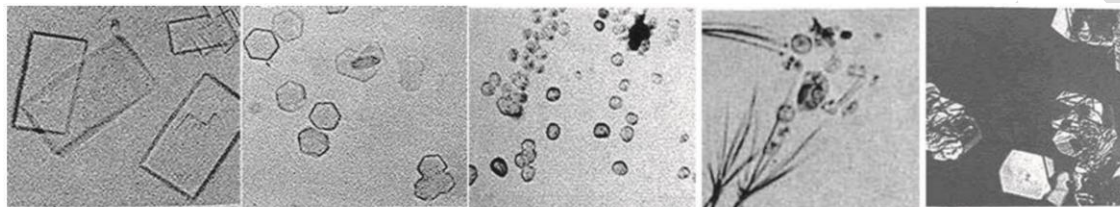


Pseudocyphellaria spp.

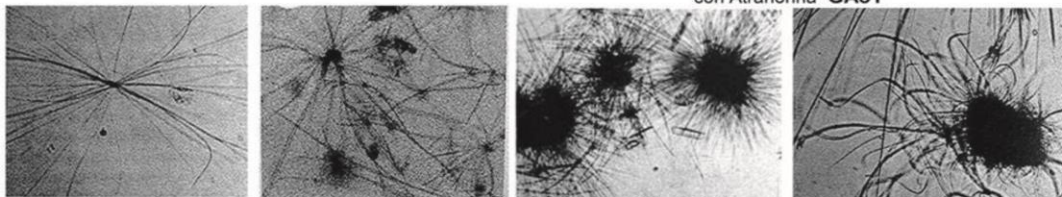


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	195 /222

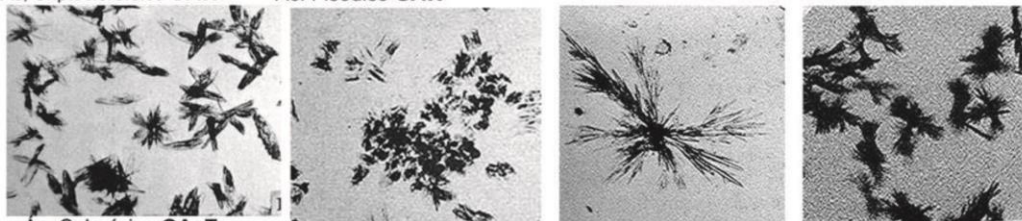
ANEXO 21. Guía de imágenes para el reconocimiento de cristales liquénicos a partir de reactivo indicados (Tomado de Hale, 1979).



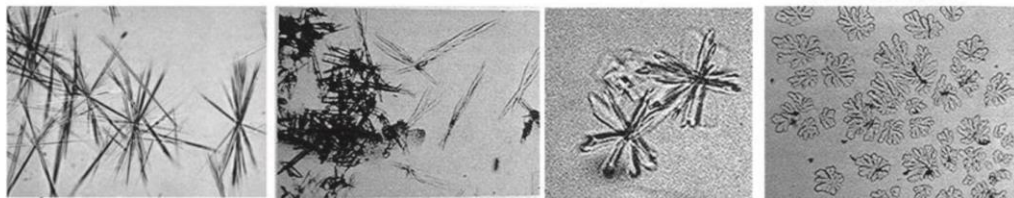
Ác. Barbático **GE** Belidiflorina **GAA** Ac. Girofórico **GE** Ac. Protocetrárico (gránulos) con Atranorina **GAoT** Ác. Stictico **GAoT**



Ác. Criptoclorofoico **GAW** Ac. Fisódico **GAW** Ac. Lecanórico **GAW** Ac. Olivetórico **GAW**



Ác. Salazínico **GAoT** Ac. Norstictico **GAoT** Ac. Grayánico **GE** Ac. Salazínico **K²**



Ác. Norstictico **KOH** Ac. Úsnico **GE** Ac. Alectorónico **GAW** Ac. Caperático **GE**



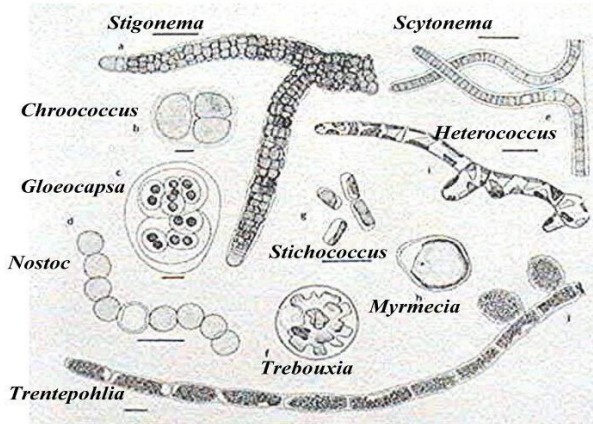
Ac. Caperático **GE** Ac. Evérnico **GE** Atranorina **GAoT**



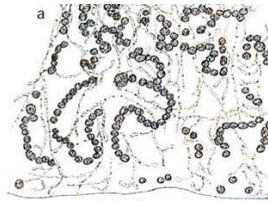
Ac. Fisódico **GAW** Ac. Evérnico **GE** Ac. Divaricático **GAW**

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	196 /222

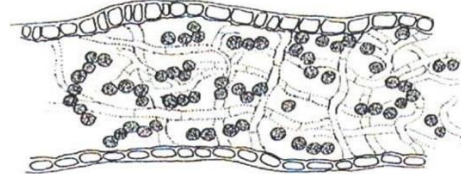
ANEXO 22. Estructuras de líquenes



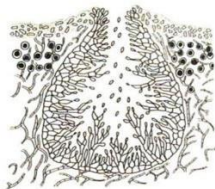
Fotobiontes diversos



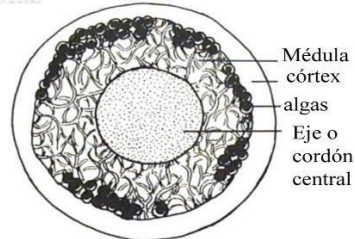
Talo homómero



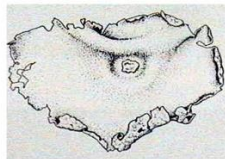
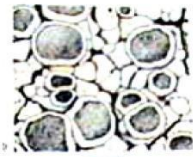
Talo heterómero



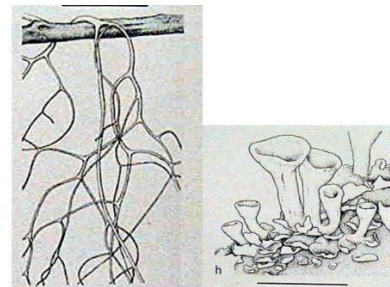
Cortes de estructuras reproductoras:
Peritecio (izq.); apotecio (der.)



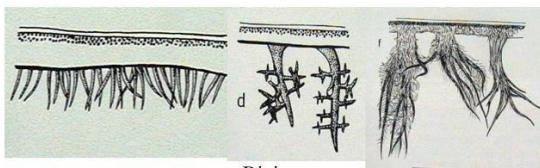
Corte transversal de talo fruticoso.



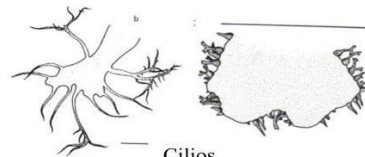
Formas de talo: costroso (izq.); foliáceo (centro); umbilicado (der.).



Talos fruticosos.



Rizinas



Cilios.

Tomado de Brodo *et al.* 2001



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	197 /222

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA UNIDAD

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

- a) Reportes de prácticas 40 %
- c) Participación y trabajo en el laboratorio 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, diagnóstico, 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	198 /222

MANEJO DE RESIDUOS

Las cajas Petri con medio de cultivo inoculado se deben inactivar para ser desechadas en bolsas negras debidamente etiquetadas o lavadas en caso de ser cajas Petri de vidrio, el medio de cultivo inactivado debe colocarse en frascos de vidrio etiquetado.

Los guantes de látex y cubrebocas utilizados en las prácticas deben ser desechados en bolsas negras debidamente etiquetadas.

Los residuos generados de la técnica de tinción de Gram deberán ser recolectados en frascos de vidrio, debidamente etiquetados y colocarlos en el área asignada dentro del laboratorio.

El material de cristalería roto debe ser colocado en el respectivo contenedor que se ubica en el laboratorio.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	199 /222

UNIDAD 4

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	200 /222

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

INTRODUCCIÓN DE LA UNIDAD

En esta unidad se realizará un proyecto de docencia-investigación, con los siguientes lineamientos: El proyecto lo llevaran a cabo en equipo y tendrá una duración de cuatro semanas, el cual se podrá apoyar con el material recolectado en la práctica de campo, misma que estará sujeta a las condiciones climatológicas y de seguridad del área de estudio.

Los alumnos serán asignados de forma equitativa a cada profesor.

El alumno debe leer y seguir los lineamientos establecidos en los reglamentos: de laboratorio, salidas a campo y de seguridad. Consultar las siguientes ligas:

- https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Reglamentos/reglamento_practicas_campo.pdf
- <https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Reglamentos/LineamientosAdicionalesSalidasCampo2018.pdf>

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.

La calificación obtenida en esta unidad, representa el 25% de la calificación total del laboratorio. Para promediarse todas y cada una de las calificaciones por unidad debe ser aprobatorias.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	201 /222

OBJETIVO DE LA UNIDAD

Desarrollar la capacidad de integrar los conocimientos de las unidades química orgánica, genética, bacterias, algas y hongos en el diseño e implementación de un proyecto de docencia-investigación, donde reforzara las habilidades obtenidas durante las prácticas y experimentos del curso.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	202 /222

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ALGAS, HONGOS Y LÍQUENES DE LOS ESTADOS DE PUEBLA O VERACRUZ Y SU EFECTO EN UN MODELO BIOLÓGICO

PARTICIPANTES:

MES. Alvarado Domínguez María Cristina
Biól. Bautista Grande Araceli
Biól. Castillo Chaires Irene
M. en C. Cornejo Silva Yadira
Dra. Corona Ortega María Teresa
Dr. Díaz Martínez Sergio
M. en C.E. Espitia Licea Rocío
M. en C. Hernández Anaya Lisandro
Q. Jiménez María Encarnación Estela
Biól. Longares Méndez Dora Alicia
Mtro. Luna Vásquez Alfonso
M. en Biotec. Ramos Velázquez José Rigoberto
M. en C. Rivera Martínez Ana Rocío
Dra. Saito Quezada Verónica Mitsui
Dra. Soriano Martínez Ana María
Biól. Zapata Cruz Aida

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	203 /222

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ALGAS, HONGOS Y LÍQUENES DE LOS ESTADOS DE PUEBLA O VERACRUZ Y SU EFECTO EN UN MODELO BIOLÓGICO



En el Laboratorio de Investigación Formativa II se cursan las unidades de Química Orgánica, Bacterias, Algas, Hongos y Líquenes, así como Genética y el Proyecto de Investigación, para que el alumno 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. El alumno debe relacionar los conocimientos previos y los adquiridos en este laboratorio para elaborar y desarrollar su proyecto de investigación.

Los organismos vivos, entre ellos las algas, hongos y líquenes, han constituido una fuente principal de productos naturales de uso medicinal. Desde la antigüedad, la gente ha buscado la cura de muchas enfermedades basadas en sustancias derivadas de dichos organismos. Con el tiempo, se descubrieron las propiedades curativas de plantas medicinales específicas para el tratamiento de ciertos padecimientos. Gradualmente el uso de estas plantas abandonó el marco empírico y se fundó en hechos explicativos (Petrovska, 2012).

Las algas, hongos y líquenes son la fuente de compuestos químicos. En el caso de las algas y hongos como alimento, ricos en proteínas, minerales y vitaminas. Estos organismos poseen compuestos activos con gran potencial en la cosmética, medicina y farmacéutica.

Cianobacterias

Las cianobacterias, también conocidas como algas verde-azules o cianofitas, son organismos procariontes fotosintéticos, presentan clorofila a y b, carotenoides y ficobiliproteínas asociadas a lamelas fotosintéticas. Carecen de núcleo verdadero, su material genético se encuentra dispuesto en el citoplasma. Las células están rodeadas por un mucílago o vaina que las



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	204 /222

protege contra la desecación, la cual está compuesta de azúcares neutros como galactosa, glucosa, manosa, rhamnosa, 2-O-metil-D-xilosa, ácido glucurónico y galacturónico; también puede contener proteínas y fosfatos. Su reproducción es asexual por medio de nanocistes, endosporas, exosporas u hormogonios. Existe intercambio genético por conjugación y transducción (Lee, 2008; Graham y Wilcox, 2000). Actualmente se encuentran descritas aproximadamente 4500 especies (Guiry y Guiry, 2019).

Algas eucariotas

Las algas eucariotas son organismos fotosintéticos que carecen de raíz, tallo y hojas, así como de un sistema vascular, por lo que son denominadas talofitas (Barsanti y Gualtieri, 2014); pertenecen a diferentes grupos taxonómicos entre los que se encuentran: Phylum Chlorophyta (algas verdes), Phylum Rhodophyta (algas rojas) y Clase Phaeophyceae del Phylum Ochrophyta (algas pardas). Han sido objeto de varios estudios debido a los compuestos obtenidos y su uso tanto alimenticio como farmacológico (Ye *et al.*, 2008; Ermakova *et al.*, 2011; Pádua *et al.*, 2015).

Phylum Rhodophyta

A nivel mundial se han descrito más de 7000 especies de algas rojas (Guiry y Guiry, 2019). Este grupo se caracteriza por presentar talos desde unicelulares hasta parenquimatosos, presentan diferentes pigmentos entre ellos: clorofila a, ficobiliproteínas y carotenoides; el producto de reserva es almidón floridano; sus plastidios son primarios (Graham y Wilcox, 2000). El ciclo de vida de este grupo son haplobiónticos o diplobiónticos heteromórficos (Lee, 2008). Su distribución es en regiones templadas y tropicales. Han sido registradas tanto en ambiente marino como dulceacuícola.

Phylum Chlorophyta

Las algas verdes son marinas, terrestres o dulceacuícolas, se distribuyen en regiones tropicales y templadas. Estos organismos se caracterizan por presentar diferentes pigmentos:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	205 /222

clorofila a y b, carotenoides; su material de reserva es almidón. Los talos presentes pueden ser unicelulares, coloniales, sifonales, parenquimatosos. Los ciclos de vida que llevan a cabo son haplobióntico y diplobióntico iso- o heteromórficos. Al igual que Rhodophyta, Glaucophyta y Streptophyta presentan plastidios primarios. A nivel mundial se han descrito aproximadamente 6500 especies (Guiry y Guiry, 2019).

Clase Phaeophyceae

Las algas pardas (clase Phaeophyceae), se caracterizan por presentar talos desde filamentosos hasta parenquimatosos. Los pigmentos presentes en las algas pardas tienen clorofila a y c, así como carotenoides; su producto de reserva es la laminarina (Graham y Wilcox, 2000). La mayoría de las especies son marinas y algunas dulceacuícolas, su ciclo de vida puede ser haplobióntico o diplobióntico iso- o heteromórficos (Lee, 2008). Actualmente se han registrado más de 2000 especies a nivel mundial (Guiry y Guiry, 2019).

Macromicetos

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos, con paredes de quitina, hemicelulosa y lípidos o celulosa, quitosana y otros polímeros. Tienen reproducción sexual y asexual por esporas, en su mayoría no presentan flagelos excepto Quitridiomycetes (Herrera y Ulloa, 1990). Este grupo es cosmopolita e incluye Quitridiomycetes, Glomeromicetos, Ascomycetos y Basidiomicetos. Varias especies de hongos han sido registrados como medicinales y son importantes tanto cultural como económicamente. Para fines del proyecto se considerarán Ascomycota y Basidiomycota.

Phylum Ascomycota

Los ascomycetes se caracterizan por desarrollar hifas modificadas derivadas de la reproducción sexual llamadas ascas, en las cuales se desarrollan ascosporas. El talo puede ser unicelular pero generalmente está constituido por un micelio bien desarrollado con hifas ramificadas y septadas que pueden constituir ascomas de diferentes formas. A nivel mundial



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	206 /222

se han descrito más de 50,000 especies (Hawksworth, 2001), varias de ellas establecen simbiosis con algas para la formación de líquenes.

Phylum Basidiomycota

Los basidiomicetes presentan talos de hifas bien desarrolladas y tabicadas, el carácter diagnóstico es la producción de basidiosporas sobre células especializadas llamadas basidios que generalmente se encuentran en el himenio presente en su cuerpo fructífero (Basidioma). Actualmente se han descrito de 30,000 a más 80,000 especies (Webster y Weber, 2007; Hawksworth, 2001), sin embargo, aún se desconoce gran parte de la diversidad de estos grupos.

Líquenes

Los líquenes son talos duales que resultan de una asociación simbiótica entre un micobionte y uno o más fotobiontes, es una relación mutualista en la cual el hongo brinda agua, dióxido de carbono y sales minerales, además de la protección al alga y ésta brinda azúcares derivados de la fotosíntesis (Herrera y Ulloa, 1990). Presentan diferentes tipos de talo, entre ellos: crustáceos, foliáceos, escumulosos, fruticulosos o mixtos, los cuales pueden estar adheridos a diferentes sustratos (Webster y Weber, 2007).

Los metabolitos primarios de las algas corresponden a los productos relacionados con el proceso fotosintético, crecimiento y reproducción y los secundarios son aquellos compuestos que le sirven como protección y defensa. Algunos hongos sintetizan compuestos que los hace tóxicos o venenosos. Por último, los líquenes sintetizan ácidos liquénicos con propiedades antibacteriales, antitumorales, antifúngicas, entre otras.

Obtención de compuestos orgánicos

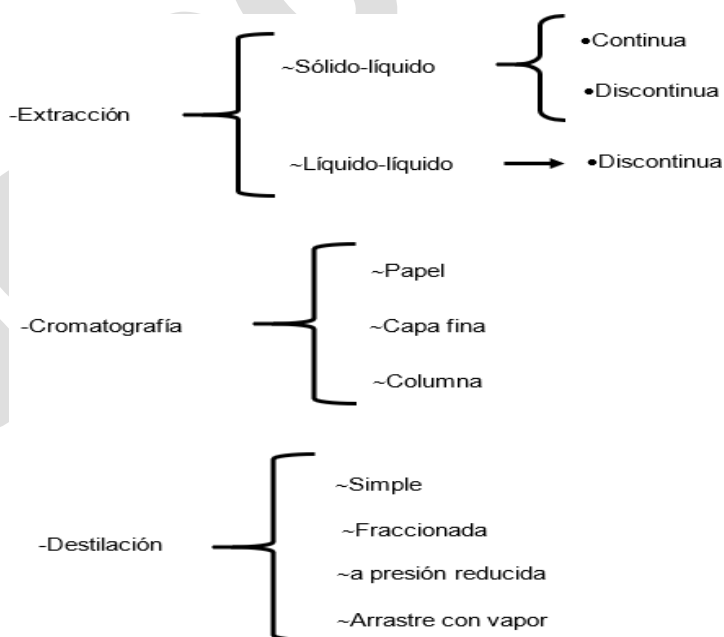
Cuando se realiza la obtención de una serie de compuestos orgánicos o metabolitos, es interesante conocer la función biológica que pueden presentar frente a diferentes organismos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	207 /222

en condiciones y concentraciones definidas (Zhan *et al.*, 2011). Para que los organismos vivos puedan realizar todas sus funciones, necesitan obtener energía del medio en el que se desarrollan, por medio del metabolismo primario, rompiendo y formando enlaces de compuestos simples; de éste se deriva otro metabolismo al cual se le denomina metabolismo secundario (Sepúlveda *et al.*, 2003), en este caso, solo es la formación de compuestos orgánicos con cierto grado de complejidad los cuales producen adaptativamente algunos organismos para interactuar con las presiones ambientales (estrés, competencia, defensa, entre otras).

El desarrollo alcanzado en los métodos de extracción e identificación de los metabolitos y el nivel de las investigaciones mundiales hacen que el área de los productos naturales sea la de mayor crecimiento dentro del campo de la química orgánica. En la actualidad se reportan cerca de un millón de productos naturales aislados a partir de diferentes fuentes (Brizuela *et al.*, 1998). Para poder obtener, separar, identificar y caracterizar los metabolitos secundarios, es importante hacer uso de diferentes métodos y técnicas, comunes en los laboratorios de química orgánica (Skoog *et al.*, 2005) como son:





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	208 /222

Importancia de los estudios en genética

El campo de la genética ha crecido enormemente, tanto en lo que sabemos cómo en lo que deseamos que aprendan los nuevos estudiantes. Se busca no solo familiarizar a los estudiantes con los descubrimientos más importantes de los pasados 150 años, sino también ayudarles a relacionar esta información con los mecanismos genéticos subyacentes que explican los procesos celulares, la diversidad biológica y la evolución. Además, también se pretende que integren la genética molecular y la genética toxicológica. En los primeros años de este nuevo milenio, los descubrimientos en genética continúan siendo numerosos, productivos y aplicativos. Como estudiante de genética, la excitación de formar parte de esta era debe estar equilibrada por un fuerte sentido de la responsabilidad y una atención cuidadosa a muchos temas científicos, sociales y éticos que ya han aparecido y otros que indudablemente surgirán en el futuro.

Ya que los procesos genéticos son esenciales para la comprensión de la vida misma, muchos piensan que la disciplina de la genética se asienta en el centro de la biología. La información genética dirige la función celular, determina en gran medida la apariencia externa de los organismos y sirve de unión entre generaciones en todas las especies. En sí mismo, el conocimiento genético es esencial para la comprensión completa de disciplinas, como la biología molecular, la biología celular, fisiología, evolución, ecología, sistemática y etología. Por consiguiente, la genética unifica la biología y constituye su núcleo. Así, no es sorprendente que la genética tenga una larga y rica historia.

El conocimiento y usos de los recursos naturales, es parte de la cultura de muchos pueblos del mundo. En México, la utilización o aprovechamiento de los recursos naturales, tiene varias vertientes, juega un papel importante en el área de la Toxicología genética (disciplina que estudia los efectos genotóxicos producidos en un organismo cuando a este se le expone a un compuesto xenobiótico). De ahí la importancia de conocer los efectos que causan las sustancias de algas, hongos y líquenes en un modelo biológico como *Drosophila melanogaster*.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	209 /222

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Investigación Formativa II está conformado por tres unidades de aprendizaje: Química orgánica, Genética y Bacterias, algas, hongos y líquenes. El alumno elaborará un proyecto de docencia-investigación en el que adquirirá conocimientos habilidades y actitudes en el manejo de equipos, materiales e instrumentos para la elaboración de un proyecto de investigación siguiendo el método científico con el propósito de integrar al menos dos unidades de la asignatura.

OBJETIVO GENERAL

Extraer compuestos orgánicos de algas, hongos y líquenes, y evaluar su efecto en un modelo biológico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aplicar las técnicas de recolección y preservación en campo de algas, hongos y líquenes.
- Identificar taxonómicamente algas, hongos y líquenes recolectados.
- Extraer compuestos orgánicos de algas, hongos y líquenes, utilizando técnicas de química orgánica.
- Determinar el efecto de los extractos en un modelo biológico.
- Comparar los efectos fenotípicos producidos por las sustancias orgánicas obtenidas en un modelo biológico.
- Elaborar un informe escrito del proyecto de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio

El área de estudio estará sujeta a las condiciones climatológicas y de seguridad, apegándose a los reglamentos vigentes de las salidas a campo.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	210 /222

Puebla

El estado de Puebla de los Ángeles (Figura 1) se encuentra localizado entre las coordenadas norte 20°50'24", al sur 17°51'39"; al este -96°43'29", al oeste -99°04'14". El estado de Puebla representa el 1.7% de la superficie del país. Colinda al norte con Hidalgo y Veracruz; al este con Veracruz y Oaxaca; al sur con Oaxaca y Guerrero; al oeste con Guerrero, Morelos, México, Tlaxcala e Hidalgo.

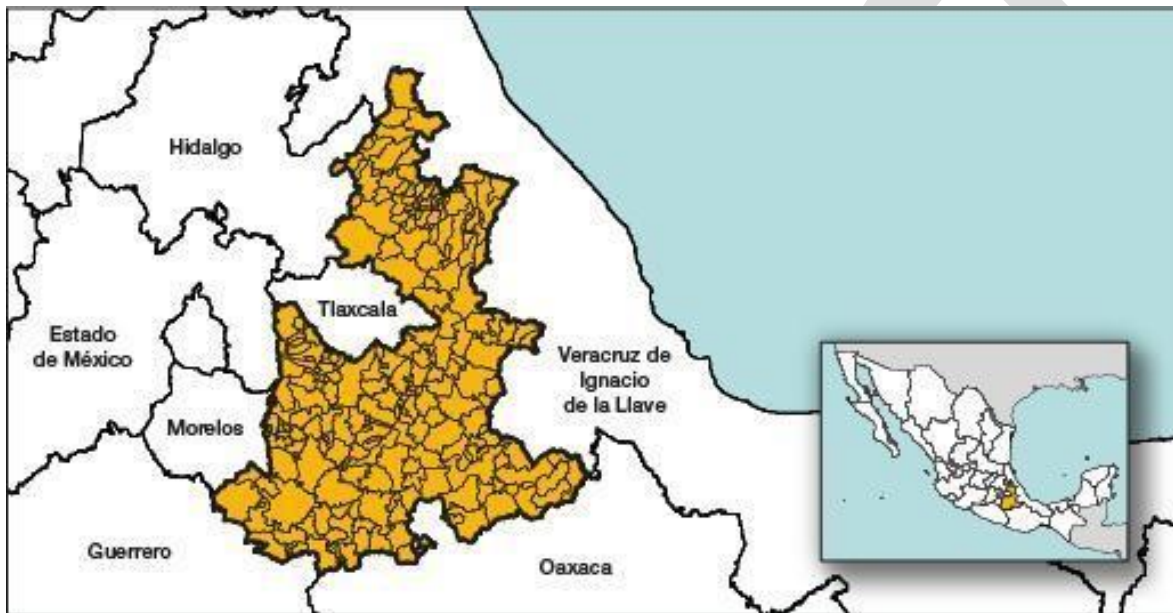


FIGURA 1. Zona de estudio, Puebla. Fuente INEGI.

Puebla es un estado de alta importancia para la diversidad debido al número de especies que alberga y su colindancia con los estados de Oaxaca y Veracruz. Sin embargo, aún se requieren estudios para estimar con precisión su riqueza de especies. Entre los ecosistemas que se pueden encontrar destacan: selvas, bosques de coníferas, matorrales y bosque mesófilo de montaña (CONABIO, 2011a) (Fig. 2) La diversidad de hongos y líquenes aún no es totalmente conocida. De acuerdo con la plataforma Enciclovida (CONABIO, 2016) se encuentran alrededor de 235 especies de hongos. Por su parte la diversidad líquénica es de 361 especies (Herrera-Campos *et al.*, 2014). Finalmente, la diversidad de algas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	211 /222

dulceacúcolas, principalmente microscópicas, reporta alrededor de 171 especies (CONABIO, 2011a).

Veracruz

El estado de Veracruz de Ignacio de la Llave (Figura 3) se encuentra localizado entre las coordenadas norte 22°28'18", al sur 17°08'13"; al este -93°36'29" y al oeste -98°40'54". Con una superficie de 72, 410 km², representa el 3.7% de la superficie del país y ocupa el décimo lugar en extensión por estados (CONABIO, 2013). Veracruz colinda al norte con Tamaulipas y el Golfo de México; al este con el Golfo de México, Tabasco y Chiapas; al sur con Chiapas y Oaxaca; al oeste con Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí. Debido a su extensión, posee cerca de 745 km de costa, lo que representa el 10% del litoral de México (CONABIO, 2013).

Veracruz es un estado con alta diversidad biológica, siendo el tercer estado, detrás de Oaxaca y Chiapas, con mayor número de especies (CONABIO, 2013). Esto se debe principalmente a la alta diversidad de ecosistemas entre los que destacan: bosques tropicales, matorrales, bosques de templados, bosque mesófilo de montaña, dunas costeras, sistemas arrecifales marinos y ecosistemas litorales (CONABIO, 2011b)(Fig. 4). La diversidad fúngica y algal del estado es muy alta, según datos obtenidos a través de Enciclovida (CONABIO 2016), el número de macromicetos es cercano a 1500 especies. Por otro lado, se estima que el estado alberga cerca de 700 especies de líquenes (Herrera-Campos *et al.*, 2014).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	212 /222

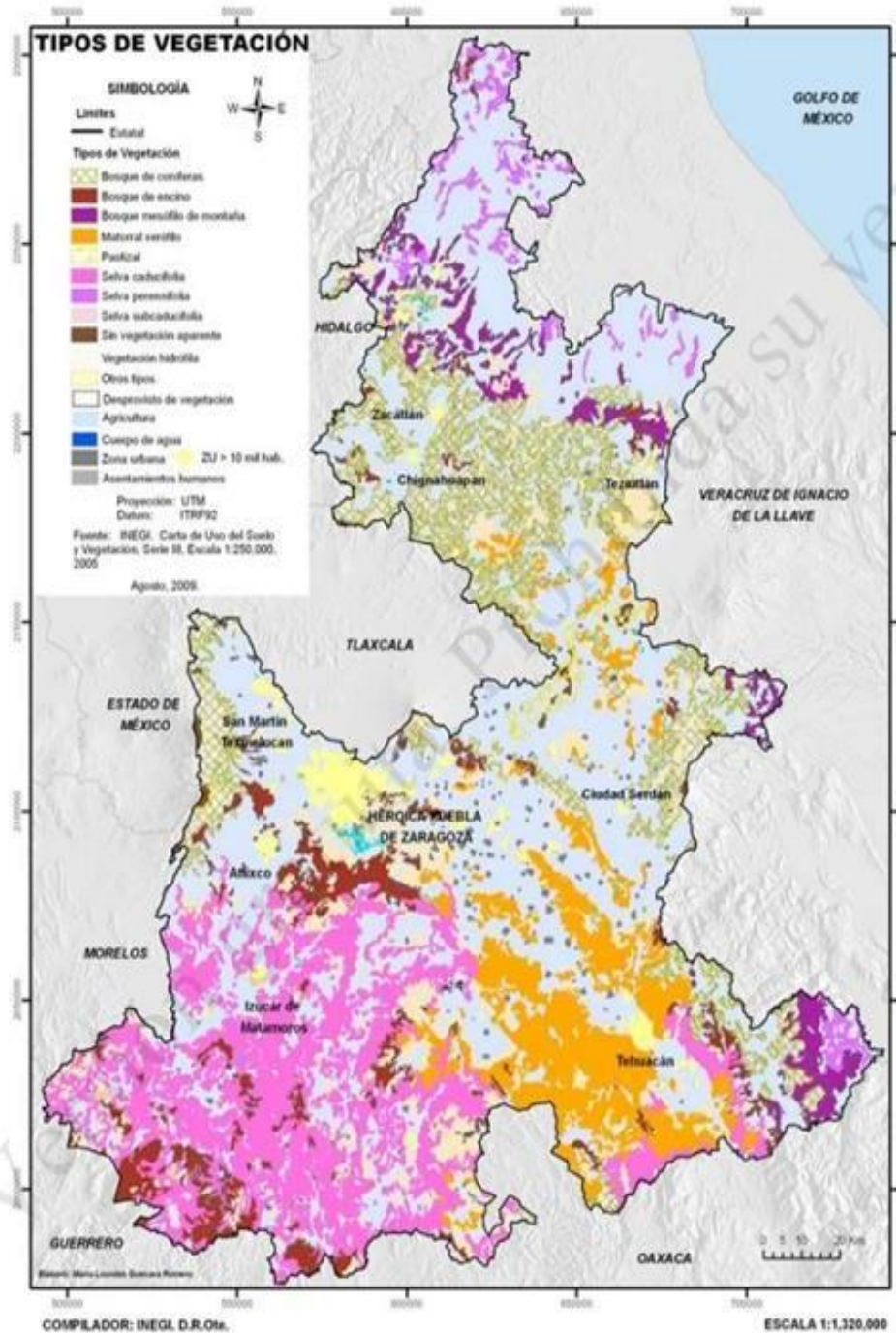


FIGURA 2. Tipos de vegetación del estado de Puebla (CONABIO, 2011a).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	213 /222

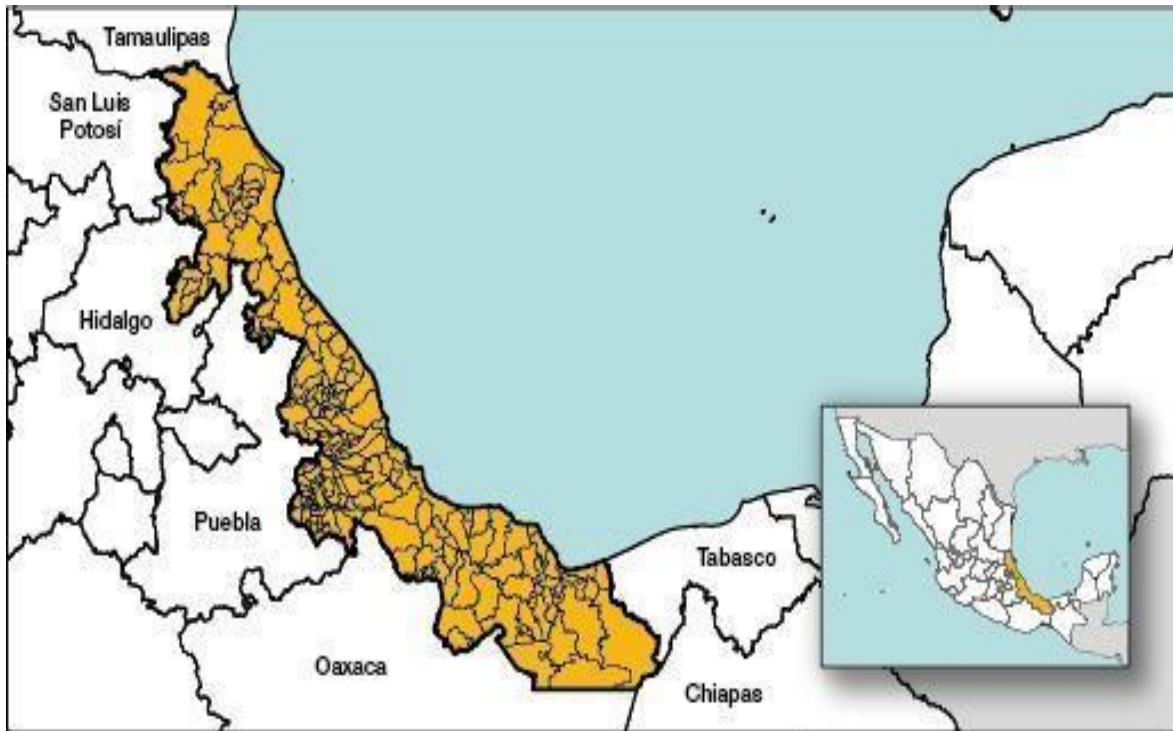


FIGURA 3. Zona de estudio, Veracruz. Fuente INEGI.

Finalmente, el número de algas estimadas, de acuerdo a los estudios de diversidad del estado, es cercano a las 1500, incluyendo especies tanto de microalgas (diatomeas, dinoflagelados, entre otros) como de macroalgas (algas rojas, verdes y pardas) (CONABIO, 2011b). Desafortunadamente, el estado de Veracruz ha sufrido de una gran alteración en uso de suelo (Fig. 4) habiéndose transformado cerca del 85% de su superficie (CONABIO, 2011b). Por esta razón, el conocimiento de la diversidad y su preservación es de gran relevancia.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	214 /222

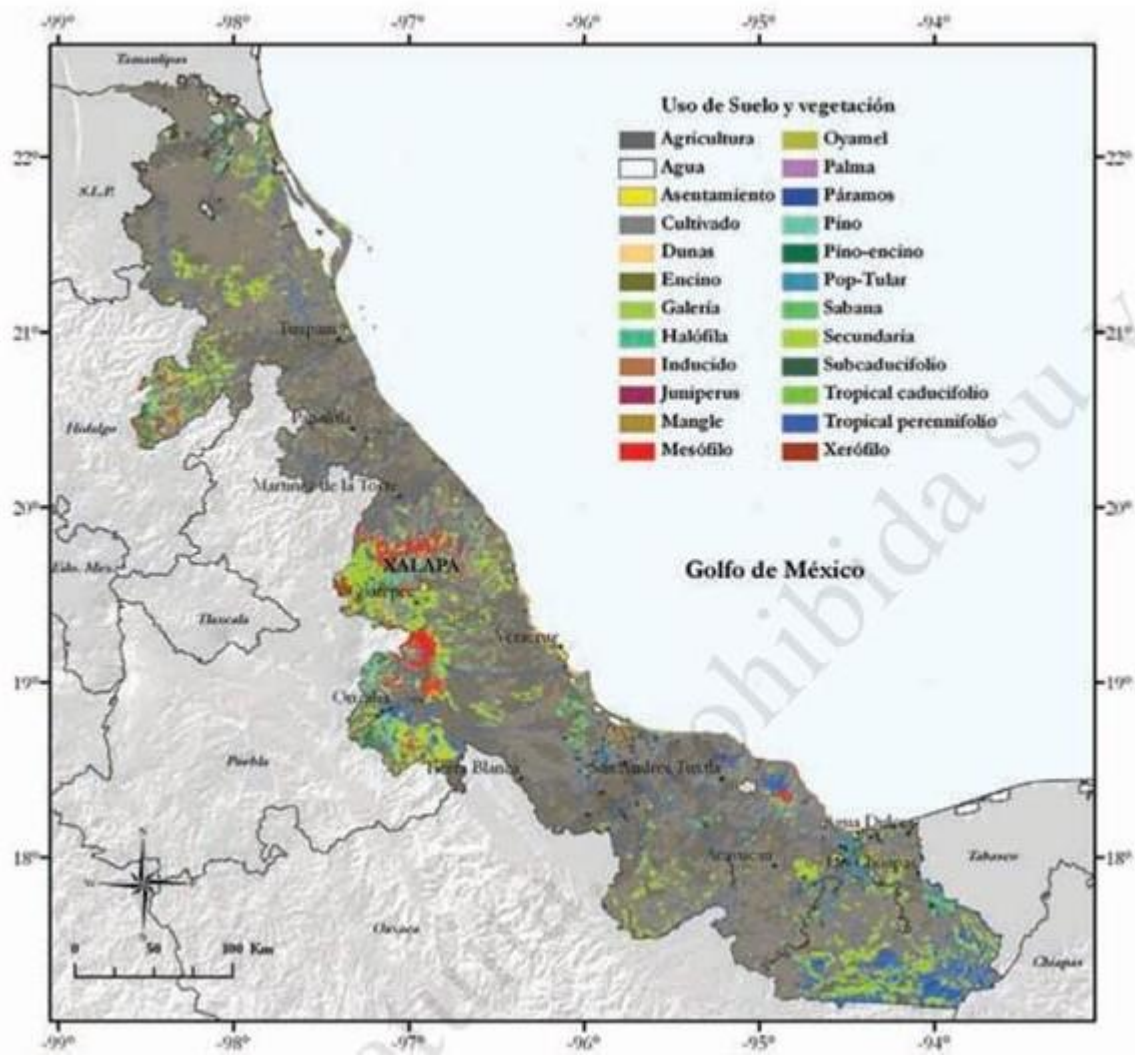


FIGURA 4. Tipos de vegetación del estado de Veracruz (CONABIO, 2011b).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	215 /222

Especies vegetales asociadas

Entre algunas de las principales especies vegetales que se pueden encontrar en los sitios de colecta destacan: *Pinus pseudostrobus*, *Pinus patula*, *Quercus oleoides*, *Abies religiosa*, *Bursera simarub*, *Parmentiera edulis*, *Psidium sartorianum*, *Guazuma ulmifolia*, *Heliocarpus appendiculatus*, *Neobuxbaumia tetetzo*, *Dasyilirion* sp., *Yucca periculosa*, *Agave lechuguilla*, *Forestiera angostifolia*, *Panicum barbinode*, *Pennisetum clandestinum*, *Cynodon plectostachyum*, *Digitaria decumbens*, *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Pyrus malus*, *Persea americana*.

MATERIAL PARA LA SALIDA AL CAMPO

- Bolsas de plástico con cierre
- Navaja, espátula o cuchillo para recolecta
- Frascos de vidrio 125 - 250 mL
- Etiquetas de papel albanene
- Probeta de plástico 500 -1000 mL
- Bolsas de papel estraza de 250 g o 15X30 cm.
- Bolsa de malla de plástico.
- Contenedor de plástico para transporte de material recolectado
- Libreta de campo de pasta gruesa
- Marcadores indelebles, bolígrafo y lápiz
- Cuerda de 10 m de largo y al menos de 3 cm de diámetro
- GPS
- Formol 4 -10%



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	216 /222

Material y reactivos para el laboratorio

Equipo, material y reactivos descrito previamente en cada práctica o experimento de éste Manual.

PROCEDIMIENTO

Recolección y preservación del material biológico

Los hongos, líquenes y algunas algas se recolectarán en áreas continentales de los estados de Puebla y Veracruz, mientras que los ejemplares de algas marinas serán en la costa de Veracruz. Las técnicas de recolecta y preservación se aplicarán de acuerdo a lo propuesto por Lot y Chiang (1986); Sánchez-González y González (2007).

Técnicas de recolección de algas marinas

Los ejemplares se desprenderán del sustrato con ayuda de una espátula, se colocarán en bolsas de plástico de 10X20 cm y se les agregará formol al 4% hasta cubrir la muestra, los datos de recolección se anotarán en una etiqueta de papel albanene grueso que se incorporará en la bolsa. El material será transportado al laboratorio para su revisión y determinación taxonómica.

Técnicas de recolección de hongos

Los ascomas y basidiomas previo a su recolección se les tomará fotografías "*in situ*", posteriormente serán desprendidos del sustrato con una espátula, se colocarán en bolsas de papel encerado o recipientes de plástico, con la guía de campo se caracterizarán en fresco, anotando las características morfológicas, tipo de sustrato y pruebas macro-químicas en las etiquetas respectivas. Los ejemplares se deshidratarán con una fuente de calor (puede ser un foco).

Técnicas de recolección de líquenes



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	217 /222

Los talos liquénicos serán desprendidos del sustrato con una espátula, se colocarán en bolsas de papel de estraza de 15X30 cm o de 250 g. y se colocará la etiqueta de identificación. Tanto los hongos como los líquenes se transportarán en una bolsa exclusiva para el material (lona) al laboratorio para su revisión y determinación taxonómica.

Determinación taxonómica

De los ejemplares recolectados de algas, se revisarán los caracteres morfológicos externos e internos y con la consulta de literatura especializada (p.e. Littler y Littler, 2000; Guiry y Guiry, 2019) serán identificados taxonómicamente.

En el caso de los hongos se harán preparaciones de esporas y observación de caracteres morfológicos, así como las pruebas macro-químicas y con la consulta de literatura especializada (p.e. Bessette et al., 2000) serán identificados taxonómicamente.

Para los líquenes además de los caracteres morfológicos, serán necesarias pruebas macro-químicas con hidróxido de potasio, hipoclorito de sodio y parafenilenediamina y con la consulta de literatura especializada (p.e Brodo et al., 2001) serán identificados taxonómicamente.

Aislamiento e identificación de compuestos orgánicos

El aislamiento de compuestos orgánicos presentes en los diferentes organismos recolectados en campo, se realizará por algún método de extracción, cromatografía en capa fina o columna, destilación simple y arrastre de vapor. Realización de las pruebas de identificación cualitativa del producto aislado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	218 /222

Prueba en un modelo biológico

El compuesto orgánico obtenido se aplicará para la evaluación de su efecto en un modelo biológico utilizados en el manual de Laboratorio de Investigación Formativa II.

Elaboración del informe

El informe se entregará por escrito en equipo y se expondrá ante el grupo.

Éste deberá contener la siguiente estructura:

- Carátula
- Título (explícito)
- Resumen
- Introducción
- Hipótesis (cuando aplica)
- Objetivos
- Material y método
- Resultados
- Discusión
- Conclusiones
- Literatura citada

CRITERIOS DE EVALUACIÓN.

Esta unidad representa el 25% de la calificación final de LIF II y se evaluará bajo los siguientes puntos:

Anteproyecto de investigación	30%
Trabajo en laboratorio	40%
Entrega del informe final	30%

LITERATURA CITADA

Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2014). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. New York: CRC Press.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	219 /222

Bessette, A. E., Roody, W. C. y Bessette, A. R. (2000). *North American Boletes: a color guide to the fleshy pored mushrooms*. United States of America, New York: Syracuse University Press.

Brizuela, M. A., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 15, 69-74.

Brodo, I. M., Sharnoff, S. D. y Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America*. New Haven, United States of America: Yale University Press.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2011a). *La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado*. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 440 pp.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2011b). *La biodiversidad en Veracruz: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología, A.C. México. 26 pp.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2013). *Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Biodiversidad del Estado de Veracruz*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México 140 pp.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2016). *EncicloVida*. CONABIO. México, Recuperado en 14 de junio de 2019. Disponible en línea en <http://www.enciclovida.mx>

Ermakova, S., Sokolova, R., Kim, S-M., Um, B-H., Isakov, V. y Zvyagintseva, T. (2011). Fucoïdanes from brown seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: Structural characteristics and anticancer activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 841-850.

Graham, L. E. y Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. USA: Prentice Hall.

Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2019). *Algae Base*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultado el 10 de junio 2019.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	220 /222

Guiry, M. D. y Guiry, G. M. 2018. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultado el 05 de enero de 2019.

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105, 1422-1432.

Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). *El Reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. México. Fondo de Cultura Económica.

Herrera-Campos, M. A, Lücking, R, Pérez-Pérez, R. E., Miranda-González, R., Sánchez, N., Barcenás-Peña, A., Carrizosa, A., Zambrano A., Ryan, Bruce D., y Nash III, Thomas H. (2014). Biodiversidad de líquenes en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85 (Supl. ene), S82-S99.

Lee, R. E. (2018). *Phycology*. USA: Cambridge University Press.

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. USA: Offshore Graphics Inc.

Lot, A. y Chiang, F. (Eds.) (1986). *Manual de Herbario, administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos*. México, D.F. Consejo Nacional de la Flora de México.

Pádua, D., Rochaa, E., Gargiuloa, D. y Ramosa, A. A. (2015). Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cáncer. *Phytochemistry Letters*, 14, 91–98.

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants usage. *Pharmacognosy reviews*, 6, 1.

Sánchez-González, A. y M. González L. (2007). Técnicas de recolecta y herborización de plantas. En: Contreras, R. A., Goyenechea, I., Cuevas, C. C. e Iturbe, U. (eds.). *La Sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Ciencia al Día 5*. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Sepúlveda, G.; Porta, H.; Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopato*, 21, 355-363.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. y Crouch, S. R. (2005). *Fundamentos de Química analítica*. Barcelona, España: Reverté.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA II



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	221 /222

Ye, H., Wang, K., Zhou, C., Liu, J. y Zeng, X. (2008). Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry*, 111, 428 - 432.

Webster, J. y Weber, R. W. S. (2007). *Introduction to Fungi*. USA: Cambridge University Press.

William, K., Michael, C., y Charlotte, S. (2006). *Conceptos de Genética*. Madrid, España: Pearson Educación.

Zhan, Z.; Ying, Y.; Ma, L.; Shan, W. (2011). Natural disesquiterpenoids., *Nat. Prod. Rep.*, 28, 594-629.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-BIO-ML02	22/01/2020	04	222 /222

Control de cambios

Fecha de revisión	Versión	Descripción de la modificación	Sección
03/05/2007	1	Ninguna (versión original)	
10/06/2009	2	Ninguna (cada unidad de aprendizaje tenía por separado las prácticas o experimentos y el proyecto)	
23/06/2017	3	Ninguna (versión original para el SGC laboratorios de docencia de la FES Zaragoza)	
22/01/2020	4	Corrección de redacción (reglamento general) Corrección en redacción de objetivos general y particulares de experimentos 1 y 2 Corrección en redacción de objetivos general y particulares experimento 3 Corrección en redacción del planteamiento del problema Incorporación de citas bibliográficas Ampliación de información en la introducción del proyecto de investigación Modificación en la redacción de objetivos Ampliación de información en material y métodos Ampliación de información en elaboración del informe	8 17 24 214 18, 224 205 215 216 225