



Créditos: 6

2023/2023

Biología Celular y
Fisiología

Turno: Matutino

Máximo estudiantes: 8

Semestre: 8º



SEMESTRAL

Técnicas Moleculares con ADN

Gerardo Rodríguez Alvarado

HORARIO

TEORIA:

Jueves 12:00 a 14:00

LUGAR:

Fac. Biología

PRÁCTICA:

Lunes 07:00 a 11:00

LUGAR:

Lab PV. IIAF

CAMPO ACUMULATIVAS:

LUGAR:

OBJETIVO: el alumno aprenderá a utilizar equipo y protocolos de laboratorio para extraer y analizar ácidos nucleicos.

REQUISITOS:

El alumno aprenderá protocolos de extracción y análisis de ADN, y el manejo de equipo de laboratorio: micropipetas, cámaras electroforéticas, nitrógeno líquido, centrifugas.

Ayuda \$\$\$ para el transporte al LabPV-UMSNH en la Posta Veterinaria, carr. Morelia-Aeropuerto

Gerardo Rodríguez Alvarado
FORMACIÓN ACADÉMICA

Biólogo. 1982. Fac. Ciencias Biológicas, Universidad A. Nuevo León
Maestría. Fitopatología. 1986. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
Doctorado. Fitopatología. 1992. University of California, Riverside, CA, Estados Unidos.

LUGAR DE TRABAJO

Laboratorio de Patología Vegetal. IIAF, UMSNH. Km 9.5 car. Morelia-Zinapecuaro,
Tarimbaro, Michoacán. Tel: (443) 322-3500 x 5226

gerardo.rodriguez@umich.mx

PUBLICACIONES (últimos 3 años)

- Santillán-Mendoza, Pineda-Vaca, D., Fernández-Pavía, S. P. Montero-Castro, J. C., Goss, E. M., Benítez-Malvido, J. and **Rodríguez-Alvarado, G.** 2019. Genetic diversity of *Fusarium mexicanum*, causal agent of mango and big-leaf mahogany malformation in Mexico. Molecular Biology Reports <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04832-5>
- Santillán-Mendoza, R., Fernández-Pavía, S. P., O'Donnell, K., Ploetz, R. C., Ortega-Arreola, R., Vázquez-Marrufo, G., Benítez-Malvido, J., Montero-Castro, J. C., Soto-Plancarte, A., and **Rodríguez-Alvarado, G.** 2018. A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. Plant Disease ISSN: 0191-2917 e-ISSN: 1943-7692.
- Reyes-Tena, A., Vallejo-González, R., Santillán-Mendoza, R., **Rodríguez-Alvarado, G.**, Larsen, J. Fernández-Pavía, S. P. 2018. *Pythium arrhenomanes* causal agent of root rot on yellow maize in Mexico. Australasian Plant Disease Notes (2018) 13:6
- Soto-Plancarte, A., Fernández-Pavía, S. P., **Rodríguez-Alvarado, G.**, López- Pérez, L., Fernández-Pavía, Y. L., Pedraza-Santos, M. E. y Álvarez-Vargas, J. E. 2018. Tipos de compatibilidad A1 y A2 de *Phytophthora capsici* y *P. drechsleri* coexisten en plantas ornamentales de vivero. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2). DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-5
- Soto-Plancarte, A., **Rodríguez-Alvarado, G.**, Fernández-Pavía, Y.L., Pedraza-Santos, M. E., López-Pérez, L., Díaz-Celaya, M., Fernández-Pavía, S. P. 2017. Isolation and diagnosis protocols of *Phytophthora* spp. applied research approach. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8 (8): 1867-1880.
- J. Wang, S. P. Fernández-Pavía, M. M. Larsen, E. Garay-Serrano, R. Gregorio-Cipriano, **G. Rodríguez-Alvarado**, N. J. Grunwald, E. M. Goss. 2017. High levels of diversity an population structure in the potato late blight pathogen at the Mexico center of origin. Molecular Ecology 26 (4): 1091–1107.
- Mukhtar, I., Vázquez-Marrufo, G., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Fernandez-Pavia, S. P. and **Rodríguez-Alvarado, G.** 2017. First report of *Erysiphe trifoliorum* causing powdery mildew of *Melilotus indicus* L. in Mexico. Plant Disease 101 (1): 246.

SNI nivel I

26 tesis dirigidas: 4 doctorado, 5 maestría, 17 licenciatura.

PROGRAMA DE LA MATERIA



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

FACULTAD DE BIOLOGÍA



NOMBRE DEL CURSO: Técnicas Moleculares con ADN

CARGA HORARIA: 6 horas/semana. 4 horas Laboratorio, 2 horas Teoría

CRÉDITOS: 6

ÁREA ACADÉMICA: Biología Celular y Fisiología

FECHA DE ELABORACIÓN: enero 2019

FECHA DE REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DEL PROGRAMA: febrero 2019

PARTICIPANTES EN LA ELABORACIÓN: Gerardo Rodríguez Alvarado

PARTICIPANTES EN LA REVISIÓN: Gerardo Rodríguez Alvarado

PARTICIPANTES EN EL DESARROLLO: Gerardo Rodríguez Alvarado

PERFIL PROFESIONAL DEL PROFESOR: Biólogo con Doctorado en Fitopatología y con experiencia laboral y docente en actividades relacionadas con técnicas moleculares utilizadas en el manejo de patógenos de plantas

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes en el aislamiento de ácidos nucleicos es la prevención de su degradación durante el procedimiento de extracción. Esto es aun más importante cuando se requiere extraer RNA. Durante el procesamiento y metabolismo de RNA en las células ocurre de manera normal rompimiento y degradación de moléculas de RNA gracias a que las células poseen una amplia variedad de nucleasas con actividad específica y no específica. Debido a la amplia distribución de nucleasas y al daño potencial que pueden ocasionar durante el aislamiento de RNA, es importante asegurar que la actividad de estas enzimas sea inhibida totalmente. Una buena preparación de ácidos nucleicos totales o RNA es indispensable para su posterior utilización en diversas técnicas de análisis molecular.

I. OBJETIVO

Proporcionar a los estudiantes experiencia en el uso de equipo de laboratorio y de técnicas de extracción y análisis de ácidos nucleicos de plantas y de patógenos causantes de enfermedades en plantas.

II. CONTENIDO PROGRAMÁTICO:

Teoría: 32 horas.

Prácticas de laboratorio y campo: 64 horas.

Unidad 1 (13 horas). Aspectos básicos de los ácidos nucleicos.

Objetivo: Que el alumno conozca los conceptos básicos sobre los ácidos nucleicos presentes en plantas y patógenos vegetales.

1. Estructura de los ácidos nucleicos.
2. Tipos de ácidos nucleicos presentes en virus vegetales.
3. Características de ácidos nucleicos de hongos.

Unidad 2 (13 horas). Aspectos sobre la preparación del material de laboratorio para el manejo de ácidos nucleicos de plantas y patógenos vegetales.

Objetivo: Que el alumno conozca los aspectos básicos sobre el manejo de equipo de laboratorio utilizado en los protocolos de extracción de ácidos nucleicos de plantas y de patógenos vegetales.

1. Entrenamiento en el uso de micropipetas.
2. Uso apropiado de balanzas.
3. Características y uso de microcentrifugas.
4. Manejo de agitadores.
5. Uso del temociclador.
6. Cálculos de porcentajes, proporciones, molaridad.
7. Protocolos para esterilizar material de vidrio, plástico y de soluciones amortiguadoras.
8. Vestimenta adecuada en un laboratorio de biología molecular.

Unidad 3 (13 horas). Generalidades de los protocolos empleados en la extracción de ácidos nucleicos de hongos patógenos de plantas.

Objetivo: Que el alumno conozca los métodos utilizados en la extracción de ácidos nucleicos de plantas y de patógenos vegetales.

1. Protocolo para la extracción de ADN genómico de hongos.
2. Extracción de ADN genómico de hongos usando un kit comercial.
3. Extracción de ácidos nucleicos totales de plantas.

Unidad 4 (13 horas). Electroforesis.

Objetivo: Que el alumno conozca los diversos tipos de electroforesis de ácidos nucleicos.

1. Entrenamiento para usar aparatos de electroforesis.
2. Preparación de geles de agarosa.
3. Como teñir geles de agarosa. Cuidados necesarios con el bromuro de etidio.
4. Documentar bandas de ADN en geles de agarosa.

Unidad 5 (13 horas). Extracción de ARNs de doble cadena.

Objetivo: Que el alumno conozca las características y protocolos de análisis de ARN de doble cadena.

1. Características de ARN de doble cadena.
2. Protocolo para la extracción de ARN de doble cadena.
3. Preparación de geles de poliacrilamida.
4. Electroforesis de geles de poliacrilamida.
5. Tinción de geles de poliacrilamida.

Unidad 6 (15 horas). Técnica de PCR.

Objetivo: Que el alumno conozca los aspectos básicos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1. Aspectos básicos de PCR.
2. Usos de PCR.
3. Amplificación de genes ribosomales.
4. Amplificación de genes nucleares.
5. Amplificación usando primers específicos para identificar organismos.

Unidad 7 (16 horas). Análisis ISSRs.

Objetivo: Que el alumno conozca aspectos teóricos y protocolos de análisis ISSR.

1. Aspectos básicos de ISSRs.
2. ISSR PCR.
3. Análisis de geles.
4. Generación de matriz.
5. Análisis de diversidad genética usando ISSRs.

III. PRÁCTICAS DE LABORATORIO.

1. Manejo de micropipetas, micro centrifugas, agitadores, balanzas.
2. Cálculos para preparar soluciones.
3. Pulverización de material vegetal y micelio de hongos con nitrógeno líquido.
4. Protocolo I de extracción de ácidos nucleicos de material vegetal.
5. Análisis de ADN genómico por electroforesis en geles de agarosa.
6. Documentación de geles de agarosa.
7. Extracción de ácidos nucleicos totales.
8. Análisis por geles de agarosa de ácidos nucleicos totales.
9. Reacciones de PCR para amplificar genes ribosomales y nucleares.
10. Purificación de fragmentos amplificados con un kit comercial.
11. Obtención de secuencias consenso.
12. Análisis Blast para identificar hongos patógeno de plantas.
13. Reacciones de PCR para análisis ISSRs.
14. Documentación de bandas ISSR en geles de agarosa.
15. Generación de una matriz de datos.
16. Análisis de diversidad genética por ISSRs.

IV. METODOLOGÍA Y DESARROLLO GENERAL DEL CURSO.

Este es un curso teórico – práctico. El instructor habrá exposiciones orales de los temas relacionados con las actividades de laboratorio. Los alumnos serán divididos en equipos en donde cada equipo contara con una estación de trabajo en las mesas del laboratorio de Patología Vegetal (IIAF). Los alumnos llevaran a cabo protocolos de extracción y análisis de ácidos nucleicos de patógenos vegetales.

Los alumnos deberán registrar sus actividades en una libreta. Es decir, deberán anotar protocolos, notas, resultados, fotos, comentarios, etc., en una libreta destinada

exclusivamente para tal propósito, la cual será entregada al finalizar el curso al instructor. Esta libreta de notas formara parte de la evaluación final de los alumnos.

V. SISTEMA GENERAL DE EVALUACIÓN.

EVALUACIÓN DE LA PARTE TEÓRICA

Numero de exámenes parciales:

1ro (unidades 1 a la 3) 50%

2do. (Unidades 4 a la 7). 50%

SUMA TOTAL 100%

EVALUACIÓN DE LA PARTE PRÁCTICA.

Participación 10 %

Libreta de prácticas 80 %

Seminario 10 %

SUMA 100%

Al final del curso solo se obtendrá una calificación, para que el promedio pueda realizarse es necesario que ambas partes (teoría y práctica) sean aprobatorias.

CALIFICACIÓN FINAL = TEORÍA+PRÁCTICA/2

VI. SALIDA A CAMPO

No se realizarán salidas a campo

VII. CORRELACIÓN CON OTRAS MATERIAS.

Microbiología, Micología, Biología molecular.

VIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades en aula (Teoría)

Unidad 1 semana 1 y 2.

Estructura de los ácidos nucleicos.

Tipos de ácidos nucleicos presentes en virus vegetales.

Características de ácidos nucleicos de hongos.

Unidad 2 semana 3 y 4.

Aspectos sobre la preparación del material de laboratorio para el manejo de ácidos nucleicos de plantas y patógenos vegetales.

Unidad 3 semana 5 y 6.

Generalidades de los protocolos empleados en la extracción de ácidos nucleicos de hongos patógenos de plantas.

Extracción de ARN de doble cadena.

Extracción de ácidos nucleicos totales.

Extracción de ADN de hongos.

Unidad 4 semana 7 y 8.

Tipos de materiales y equipos utilizados en electroforesis.

Geles de poliacrilamida.

Geles de agarosa.

Unidad 5 semana 9 y 10.

Extracción y análisis de ARNs de doble cadena.

Características de ARN de doble cadena.

Protocolo para la extracción de ARN de doble cadena.

Preparación de geles de poliacrilamida.

Electroforesis de geles de poliacrilamida.

Tinción de geles de poliacrilamida.

Unidad 6 semana 11 a la 13.

Protocolos para utilizar PCR.

Aspectos básicos de PCR.

Usos de PCR.
Amplificación de genes ribosomales.
Amplificación de genes nucleares.
Amplificación usando primers específicos para identificar organismos.

Unidad 7 semana 14 a la 16.

Teoría y aspectos prácticos sobre el uso del análisis por ISSRs.
Aspectos básicos de ISSRs.
ISSR PCR.
Análisis de geles.
Generación de matriz.
Análisis de diversidad genética usando ISSRs.

Actividades en laboratorio y campo (Prácticas).

1. Preparación de medio de cultivo líquido para hongos.
2. Inoculación de medio de cultivo líquido con aislamientos de *Fusarium*.
3. Colecta de material vegetal.
4. Pulverización de material vegetal con nitrógeno líquido.
5. Extracción de ácidos nucleicos totales de plantas.
6. Análisis por electroforesis de ácidos nucleicos totales de plantas.
7. Extracción de ácidos nucleicos de hongos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Jones, P., Qiu, J., and Rickwood, D. 1994. RNA. Isolation and Analysis. Bios Scientific Publishers. Oxford, UK.
- Rogers, S. O. and Bendich, A. J. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. En: Plant Molecular Biology Manual. Second Edition. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort (eds.). Kluwer Academic Publishers. London.
- Green, M. R. and Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Fourth Edition. Cold Spring harbor. New York, USA.