



Créditos: 6

2024/2024

Biología Celular y Fisiología

Turno: Vespertino

Máximo estudiantes: 8

Semestre: 8°



SEMESTRAL

Técnicas Moleculares con ADN

Gerardo Rodríguez Alvarado

HORARIO

TEORIA:	Miércoles: 14:00-16:00	LUGAR:	Edificio R
PRÁCTICA:	Jueves: 14:00-18:00	LUGAR:	Lab Pat Veg 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. Se proporcionará **BECA \$\$\$** 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 (Recientes)

- Mondragón-Flores et al. 2022. Caracterización y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Phytophthora cinnamomi* causante de pudrición de raíz en aguacate en Zitácuaro, Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2109-4>
- Montoya-Martínez et al. 2022. [Weeds Harbor *Fusarium* Species that Cause Malformation Disease of Economically Important Trees in Western Mexico.](#) Plant Disease. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1339-RE>
- Montoya-Martínez et al. 2021. Malformation disease in *Tabebuia rosea* (Rosy Trumpet) Caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. Plant Disease. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1942-RE>
- Benítez-Malvido et al. 2021. Antagonistic interactions between fusaria species and their host plants are influenced by host taxonomic distance: a case study from Mexico. Front. Ecol. Evol. | doi: 10.3389/fevo.2021.615857.
- Gaiser et al. 2020. Phylogenomic analysis of a 55.1 kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* Species Complex. Phytopathology <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE>
- Santillán-Mendoza et al. 2020. Genetic diversity of *Fusarium pseudocircinatum* in the central western region of Mexico: the case of big-leaf mahogany malformation disease. Molecular Biology Reports 47: 6599–6609.

SNI nivel I

Tesis dirigidas: 5 doctorado, 7 maestría, 18 licenciatura.

U.M.S.N.H



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO FACULTAD DE BIOLOGÍA

PROGRAMA DE LA MATERIA TÉCNICAS MOLECULARES CON ADN

Datos generales:

Semestre: Séptimo, Octavo, Noveno

Área académica: Biología Celular y Fisiología

Carga horaria: 6 horas por semana (Teoría 2, laboratorio 4, campo 0)

Número de semanas del semestre: 16

Número de créditos: 6

Fecha de elaboración: abril de 2016

Participantes en la elaboración: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, Dr. Miguel Martínez Trujillo

Fecha de la última revisión: agosto de 2020

Participantes en la última revisión: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, Dr. Miguel Martínez Trujillo

Profesores que imparten la materia: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

Correlación directa con otras materias:

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.

Objetivo general

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.

Contenidos

Teoría: 32 horas.

Prácticas de laboratorio y campo: 64 horas.

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

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

- 1.1 Estructura de los ácidos nucleicos
- 1.2 Tipos de ácidos nucleicos presentes en virus vegetales
- 1.3 Características de ácidos nucleicos de hongos

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

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.

- 2.1 Entrenamiento en el uso de micropipetas.
- 2.2 Uso apropiado de balanzas.
- 2.3 Características y uso de microcentrifugas.
- 2.4 Manejo de agitadores.
- 2.5 Uso del temociclador.
- 2.6 Cálculos de porcentajes, proporciones, molaridad.
- 2.7 Protocolos para esterilizar material de vidrio, plástico y de soluciones amortiguadoras.
- 2.8 Vestimenta adecuada en un laboratorio de biología molecular.

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

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

- 3.1 Protocolo para la extracción de ADN genómico de hongos.
- 3.2 Extracción de ADN genómico de hongos usando un kit comercial.
- 3.3 Extracción de ácidos nucleicos totales de plantas.

Unidad 4. Electroforesis. (13 horas).

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

- 4.1 Entrenamiento para usar aparatos de electroforesis.
- 4.2 Preparación de geles de agarosa.
- 4.3 Como teñir geles de agarosa. Cuidados necesarios con el bromuro de etidio.
- 4.4 Documentar bandas de ADN en geles de agarosa.

Unidad 5. Extracción de ácidos nucleicos totales. (13 horas).

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

- 5.1 Características de ARN.
- 5.2 Protocolo para la extracción de ácidos nucleicos totales.
- 5.3 Preparación de reactivos y equipo libres de nucleasas.

Unidad 6. Técnica de PCR. 15 horas).

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

- 6.1 Aspectos básicos de PCR.
- 6.2 Usos de PCR.
- 6.3 Amplificación de genes ribosomales.
- 6.4 Amplificación de genes nucleares.
- 6.5 Amplificación usando primers específicos para identificar organismos.

Unidad 7. Análisis ISSRs. (16 horas)

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

- 7.1 Aspectos básicos de ISSRs.
- 7.2 ISSR PCR.
- 7.3 Análisis de geles.

7.4 Generación de matriz.

7.5 Análisis de diversidad genética usando ISSRs.

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.

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Práctica 1. Manejo de micropipetas, micro centrifugas, agitadores, balanzas.

Práctica 2. Cálculos para preparar soluciones.

Práctica 3. Pulverización de material vegetal y micelio de hongos con nitrógeno líquido.

Práctica 4. Protocolo I de extracción de ácidos nucleicos de material vegetal.

Práctica 5. Análisis de ADN genómico por electroforesis en geles de agarosa.

Práctica 6. Documentación de geles de agarosa.

Práctica 7. Extracción de ácidos nucleicos totales.

Práctica 8. Preparación de geles de libres de nucleasas.

Práctica 9. Electroforesis de geles de agarosa para analizar ácidos nucleicos totales.

Práctica 10. Reacciones de PCR para amplificar genes ribosomales y nucleares.

Práctica 11. Purificación de fragmentos amplificados con un kit comercial.

Práctica 12. Obtención de secuencias consenso.

Práctica 13. Análisis Blast para identificar hongos patógenos de plantas.

Práctica 14. Reacciones de PCR para análisis ISSRs.

Práctica 15. Documentación de bandas ISSR en geles de agarosa.

Práctica 16. Generación de una matriz de datos.

Práctica 17. Análisis de diversidad genética por ISSRs.

EVALUACIÓN

EVALUACIÓN DE LA PARTE TEÓRICA

Examen final: Valor 100 puntos

EVALUACIÓN DE LA PARTE PRÁCTICA.

Participación 20 %

Libreta de prácticas 80 %

Suma total: 100 puntos

CALIFICACIÓN FINAL = TEORÍA+PRÁCTICA/2

- Se requiere la asistencia a clases que pide el reglamento general de exámenes de la UMSNH para tener derecho a la evaluación final. En caso de que el alumno repruebe (5 o menos) el alumno tendrá derecho a examen extraordinario bajo los lineamientos del dicho reglamento.

BIBLIOGRAFÍA

Green, M. R. and Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Fourth Edition. Cold Spring harbor. New York, USA.

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.

PROPUESTA DE CALENDARIO DE ACTIVIDADES

SEMANA 1 (6 al 9 de febrero)	SEMANA 2 (12 al 16 de febrero)
Estructura de los ácidos nucleicos.	Tipos de ácidos nucleicos presentes en virus vegetales. Características de ácidos nucleicos de hongos.
SEMANA 3 (19 al 23 de febrero)	SEMANA 4 (26 febrero al 1 marzo)
Aspectos sobre la preparación del material de laboratorio para el manejo de ácidos nucleicos de plantas y patógenos vegetales.	Cont... Aspectos sobre la preparación del material de laboratorio para el manejo de ácidos nucleicos de plantas y patógenos vegetales.
SEMANA 5 (4 al 8 marzo)	SEMANA 6 (11 al 15 marzo)
Generalidades de los protocolos empleados en la extracción de ácidos nucleicos de hongos patógenos de plantas.	Extracción de ácidos nucleicos totales. Extracción de ADN de hongos.
SEMANA 7 (18 al 22 marzo)	SEMANA 8 (25 al 29 marzo)
Tipos de materiales y equipos utilizados en electroforesis.	Geles de poliacrilamida. Geles de agarosa.
SEMANA 9 (1 al 5 de abril)	SEMANA 10 (8 al 12 de abril)
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.
SEMANA 11 (15 al 19 de abril)	SEMANA 12 (22 al 5 de 26)
Protocolos para utilizar PCR. Aspectos básicos de PCR. Usos de PCR.	Amplificación de genes ribosomales. Amplificación de genes nucleares.
SEMANA 13 (29 abril al 3 mayo)	SEMANA 14 (6 al 10 de mayo)
Amplificación usando primers específicos para identificar organismos.	Teoría y aspectos prácticos sobre el uso del análisis por ISSRs. Aspectos básicos de ISSRs.
SEMANA 15 (13 al 17 de mayo)	SEMANA 16 (2° al 24 de mayo)
ISSR PCR. Análisis de geles.	Generación de matriz. Análisis de diversidad genética usando ISSRs.