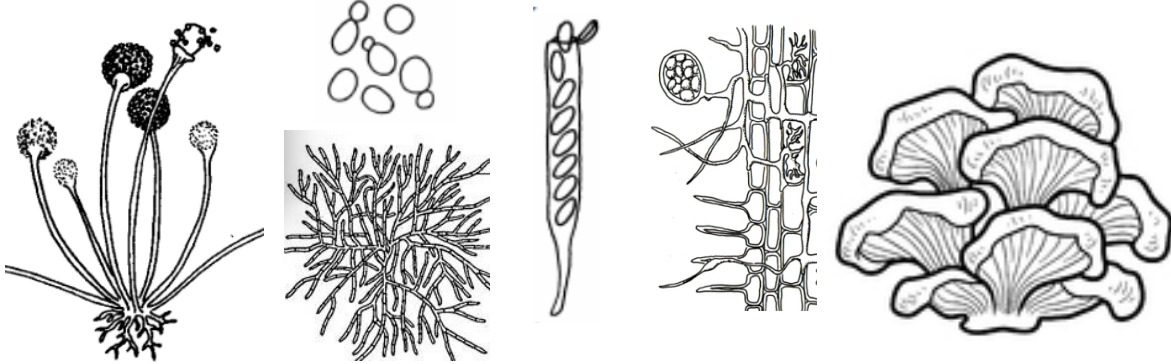




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS
LICENCIATURA EN BIOLOGIA



Manual de Prácticas del Laboratorio del curso de “BIOLOGÍA DE HONGOS”

Elaboró:

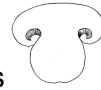
Dra. María Azucena Ortega Amaro

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

Nombre del alumno (a): _____

Calificación final del laboratorio: _____

San Luis Potosí, S.L.P.



PREFACIO

El laboratorio de “Biología de Hongos” esta dirigido a los estudiantes de la Licenciatura en Biología y se imparte en el cuarto semestre de la carrera. Es una actividad complementaria a las sesiones teóricas del curso y tiene como objetivo fortalecer los conocimientos obtenidos en el aula mediante la observación, el aislamiento, la identificación y la propagación de diferentes especies de hongos pertenecientes a los phylum Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. El calendario de actividades contempla el desarrollo de 7 prácticas en el laboratorio de “Fisiología Animal y Vegetal” de la Facultad de Ciencias. La mayoría de las prácticas contemplan 2 sesiones con una duración de 2 horas por sesión.

Objetivos específicos

- 1.- Capacitar al estudiante en la preparación de medios de cultivo para el aislamiento y crecimiento de hongos.
- 2.- Aplicar las principales técnicas de tinción, de aislamiento y de cultivo *in vitro* de hongos microscópicos.
- 3.- Adquirir destreza en la identificación morfológica (micro y macroscópica) de diferentes géneros y especies de hongos.
- 4.- Aplicar metodologías para el aislamiento de ADN fúngico y la identificación molecular de los mismos.
- 5.- Enfatizar la importancia de la ecología fúngica, con un enfoque principal a hongos con actividad biocontroladora y hongos promotores de crecimiento vegetal.



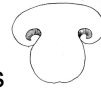
ÍNDICE

I. REGLAMENTO DEL LABORATORIO.....	4
II. BIOSEGURIDAD.....	6
III. EVALUACIÓN DEL LABORATORIO.....	7
IV. ELABORACIÓN Y ENTREGA DEL REPORTE.....	8
V. CALENDARIO DE PRACTICAS.....	9
PRÁCTICA 1. <i>Preparación de medios de cultivo.....</i>	10
PRÁCTICA 2. <i>Morfología macroscópica y microscópica de colonias fúngicas.....</i>	14
PRÁCTICA 3. <i>Hongos acuáticos. Aislamiento de quitridios</i>	22
PRÁCTICA 4. <i>Aislamiento de hongos a partir de diferentes sustratos</i>	25
PRÁCTICA 5. <i>Caracterización de los aislados fúngicos mediante pruebas moleculares.....</i>	30
PRÁCTICA 6. <i>Morfología de basidiomicetos y líquenes.....</i>	34
PRÁCTICA 7. <i>Determinación de la capacidad biocontroladora de hongos aislados en el semestre</i>	38



I. REGLAMENTO DEL LABORATORIO

1. Para ingresar al laboratorio, **es obligatorio el uso de la bata reglamentaria** (blanca, de algodón y manga larga) debidamente abrochada y de su manual instructivo.
2. Para el desarrollo de la práctica se deberá **portar zapato cerrado cómodo y seguro**.
3. **Evitar el uso de joyas** (anillos, pulseras, dijes, aretes largos, etc.) que puedan entrar en contacto con las muestras biológicas que se procesarán. Es requisito traer el pelo recogido y las uñas cortadas para evitar contaminación.
4. El tiempo de tolerancia para llegar y entrar al laboratorio será establecido por el maestro (a) y/o instructor.
5. Los útiles y pertenencias que no cumplan un contenido en la práctica, deberán ser colocados en el lugar indicado por el maestro (a) y/o instructor.
6. Al iniciar y terminar cada práctica, deberá **limpiar su mesa de trabajo** dejándola en el orden en que le fue entregada. En caso de trabajar con muestra biológicas el área de trabajo se desinfectará con benzal o algún germicida que le sea proporcionado por el maestro (a) y/o instructor.
7. **Jamás deberá iniciar una práctica sin estar seguro de lo que se va a hacer**, por lo que será su obligación leer previamente el manual y atender las indicaciones del maestro (a) y/o instructor.
8. Antes de empezar la práctica le será confiado material del laboratorio el cual tendrá que devolver al final de la misma. En algunas ocasiones, tendrá que aportar materiales o sustancias que sean requeridas para el desarrollo de una práctica particular.
9. Antes de empezar la práctica, deberá verificar la identidad de los productos químicos y biológicos. **No deberá oler ni probar los reactivos o muestras químicos-biológicos que desconozca**. No pipetear con la boca.
10. Por su seguridad queda estrictamente prohibido fumar y consumir alimentos o bebidas durante el desarrollo de las prácticas. De igual forma, queda prohibido llevarse cualquier tipo de cosas a la boca dentro del laboratorio.



11. Las prácticas deberán ser realizadas en orden ocupando el lugar asignado en las mesas de trabajo y no deberán desplazarse a otras mesas interviniendo en el trabajo de sus compañeros.
12. La práctica se debe desarrollar con limpieza evitando derramar sustancias en la mesa de trabajo y etiquetando debidamente las soluciones preparadas.
13. En caso de romper o derramar material contaminado, vierta inmediatamente el germinicida proporcionado en el laboratorio y deje actuar al menos 10 min. Antes de limpiar el área avise a su supervisor. De igual forma, en caso de algún accidente (cortadura, salpicadura con material contaminado o algún reactivo, quemadura, entre otros) avise a su supervisor.
14. **Jamás se deben verter los desechos biológicos a los lavabos**, sino en los recipientes correspondientes asignados por el instructor.
15. Bajo ninguna excusa se permitirá el ausentarse de la práctica.
16. No se permitirán visitas ajenas al laboratorio durante el desarrollo de la práctica.
17. Al término de la práctica, deberá cerciorarse que las llaves de gas, vacío y agua queden perfectamente cerradas.
18. **Lavarse las manos al entrar y al salir del laboratorio.**



II. BIOSEGURIDAD

El material biológico con el que se trabajará durante el semestre no representa un riesgo potencial para el estudiante, ya que las especies de hongos que se tienen en el laboratorio son cepas no patógenas para seres humanos. Sin embargo, en ciertas prácticas se aislarán hongos a partir de diferentes sitios (cuerpos de agua, ambiente, suelo, etc), cuyos estilos de vida pueden ser diversos, por lo que se mantendrán estrictas normas de seguridad para evitar riesgos por ingesta, inhalación o contacto directo.

Los riesgos específicos para el manejo de material biológico y/o reactivos se especifica en cada práctica.



III. EVALUACIÓN DEL LABORATORIO

El programa analítico del curso de Biología de hongos establece que el alumno deberá obtener una **calificación aprobatoria** en el laboratorio para acreditar la materia.

La evaluación general del curso de detalla en la siguiente tabla, haciendo énfasis en las prácticas de laboratorio, cuyo puntaje equivale a un 20% de la calificación de la materia.

Elaboración y/o presentación de:	Porcentaje
Exámenes parciales (5)	70%
Exámen ordinario (Trabajo final)	10%
Prácticas de Laboratorio (7)	20%
Total	100%

Cada práctica de Laboratorio se evaluará con una escala de calificación de 0 a 10, y se considerarán los siguientes aspectos:

Aspecto	Puntaje
Trabajo práctico*	1
Introducción	1
Observaciones**	8
Cuestionario**	
Resultados y conclusiones**	
Total	10

*Se evalúa el desempeño del estudiante durante la realización de la práctica. En ocasiones el alumno tendrá que solicitar acceso al laboratorio en horarios fuera de la práctica para dar seguimiento a sus cultivos, tinciones y observaciones generales. Esta participación también se tomará en cuenta.

**La ponderación de cada aspecto puede variar entre prácticas, englobando un total de 8 puntos del reporte.



IV. ELABORACIÓN Y ENTREGA DEL REPORTE

El reporte del laboratorio se evaluará de manera “individual” o en “equipo” (ver apartado **V. calendario de prácticas**). El reporte se realizará a mano y se entregará en hojas tamaño carta blancas conforme al siguiente contenido:

- a) **Portada.** En ella se debe especificar el título de la práctica, nombre del alumno(s) y/o equipo y la fecha de entrega.
- b) **Introducción a la práctica.** Esta sección no debe ser mayor a una cuartilla, el alumno deberá generar una introducción personalizada para su reporte; sustentada en revisión de bibliografía, citando en el texto las referencias consultadas.
- c) **Observaciones.** Incluyen dibujos y descripciones de lo realizado en el laboratorio en etapas particulares de un protocolo.
- d) **Cuestionario.** Abarca de tres a cuatro preguntas de investigación concretas.
- e) **Resultados.** Descripción de lo obtenido/logrado durante el desarrollo de la práctica.
- f) **Conclusiones**
- g) **Bibliografía.** Se recomienda emplear el formato APA para citar la fuente de donde se obtuvo la referencia bibliográfica.

Los reportes de una práctica concluida se entregarán al iniciar la práctica siguiente en el horario del laboratorio.



V. CALENDARIO DE PRÁCTICAS 2017

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	SESIONES	REPORTE
1.- Preparación de medios de cultivo	1 (2 horas)	En equipo
2.- Morfología macroscópica y microscópica de colonias fúngicas: a) Morfología del Phylum Zygomycota b) Morfología del Phylum Ascomycota	2 (4 horas)	En equipo
3.- Hongos acuáticos. Aislamiento de quitridios (2 sesiones): a) Preparación de los cebos b) Observación microscópica	2 (4 horas)	En equipo
4.- Aislamiento de hongos a partir de diferentes sustratos (3 sesiones)	3 (6 horas)	Individual
5.- Caracterización de los aislados fúngicos mediante pruebas moleculares (3 sesiones)	3 (6 horas)	Individual
6.- Morfología de basidiomicetos y líquenes	1 (2 horas)	En equipo
7.- Determinación de la capacidad biocontroladora de hongos aislados en el semestre (2 sesiones)	2 (4 horas)	Individual
Entrega de calificaciones		

Nota. La fecha de realización de cada práctica se incluirá en el calendario acorde al semestre enero-junio del año correspondiente.

PRÁCTICA 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

A) DATOS BÁSICOS DE LA PRÁCTICA

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad I. Introducción a la micología. Tema 1.10. Principales métodos y técnicas de estudio de los hongos: métodos de aislamiento e identificación, **medios de cultivo**, colorantes y reactivos.

B) INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos quimio-heterótrofos que sintetizan compuestos orgánicos necesarios para su crecimiento y para la obtención de energía a partir de fuentes orgánicas pre-existentes en el ambiente.

Los hongos se alimentan por absorción, teniendo un papel ecológico de saprófitos, parásitos y patógenos, simbioses y/o mutualistas. La adquisición de moléculas pequeñas (azúcares y aminoácidos) ocurre por difusión a través de la pared fúngica y la membrana celular, lo que permite una absorción directa. La internalización de moléculas pequeñas también depende de la presencia de transportadores específicos. Las moléculas orgánicas complejas (polisacáridos, proteínas, entre otras), requieren de un procesamiento previo a su absorción; en este proceso participan enzimas líticas secretadas por el hongo [1].

La fuente de carbono preferida por los hongos son los carbohidratos, teniendo la capacidad de absorber y metabolizar fácilmente azúcares como glucosa, xilosa, sacarosa y fructuosa. La mayoría de los hongos pueden ser crecidos en el laboratorio en medios de cultivo que contienen componentes naturales como: extracto de papa, extracto de malta, harina de maíz, jugo V8, entre otros. Además de las fuentes naturales, en el laboratorio se preparan medios sintéticos que contienen una fuente rica de azúcares, nitrógeno (sales de amonio), fósforo y hierro, así como un pH ligeramente ácido (pH 5-6). Para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes se pueden añadir antibióticos como cloranfenicol y ampicilina al medio de cultivo [2].

C) OBJETIVO

Preparar medios de cultivo ricos y medios selectivos para el crecimiento de hongos en sustratos sólidos y líquidos.

D) PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar: es importante etiquetar adecuadamente cada recipiente con el nombre del medio a preparar y la fecha. Rotular las cajas de Petri con nombre del medio, la fecha y el nombre del Laboratorista que lo elaboró. Al momento de sacar el material recién esterilizado del autoclave se deben utilizar guantes de protección térmica como medida de seguridad.

1.- Medio PDA (papa dextrosa agar)

Pesar 7.8 g del agar papa dextrosa (marca BD) y disolver en 200 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 min. Posteriormente, vaciar 20-25 mL del medio PDA en placas de Petri de 10 cm x 10 mm. Esperar a que solidifique el medio. Sellar las placas. Almacenar a 4°C.

2.- Medio YPD líquido (extracto de levadura, peptona y glucosa)

Pesar 1 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa y 2 g de peptona, disolver en 50 mL de agua destilada y aforar a un volumen final de 100 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

3.- Medio Agar Avena (hojuela de avena, extracto de levadura, glucosa y agar)

Pesar 2 g de avena y remojar en 50 mL de agua destilada durante 12 a 24 h. Filtrar a través de una gasa y centrifugar el filtrado 3 min a 3000 rpm. El volumen obtenido se ajusta a un volumen de 50 mL de agua destilada y se añaden 0.2 g de extracto de levadura, 0.5 g de glucosa y 1.5 g de agar bacteriológico. Aforar el medio a un volumen de 100 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 min. Posteriormente, vaciar 20-25 mL del medio en placas de Petri de 10 cm x 10 mm. Esperar a que solidifique el medio. Sellar las placas. Almacenar a 4°C.

4.- Medio Agar V8 (jugo V8)

Colocar 25 mL de jugo V8 en un tubo Falcón de 50 mL. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 min. Transferir el sobrenadante a un matraz de 500 mL y diluirlo en una proporción 1:4 (50:200 mL). Esterilizar durante 20 min. Se emplea una dilución 1:1 del medio esterilizado para preparar el medio sólido. Tome 100 mL del medio esterilizado y clarificado, agregue 100 mL de agua destilada estéril y 3 g de agar bacteriológico. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 min. Posteriormente, vaciar 20-25 mL del medio en placas de Petri de 10 cm x 10 mm. Esperar a que solidifique el medio. Sellar las placas. Almacenar a 4°C.

5.- Agar Sabouraud (glucosa, peptona y agar)

Pesar 2 g de glucosa, 1 g de peptona y 1.5 g de agar bacteriológico; aforar a un volumen de 100 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 min. Posteriormente, vaciar 20-25 mL del medio en placas de Petri de 10 cm x 10 mm. Esperar a que solidifique el medio. Sellar las placas. Almacenar a 4°C.

E) BIBLIOGRAFIA

- 1.- Moore D., Robson G. D., Trinci A. P. J. 2011. 21st Century Guidebook to fungi. Cambridge University Press.
- 2.- Janson J. R. The chemistry of fungi. 2008. RSC Publishing.

F) ANOTACIONES DE LA PRÁCTICA

REPORTE PRÁCTICA 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Aspectos a evaluar	Puntaje	Puntaje obtenido
Desempeño durante la práctica	1	
Reporte escrito	9	
Total	10	

Indicaciones para el reporte:

1.- Genere una **Introducción**, sustentada en una revisión bibliográfica, citando en el texto las referencias consultadas (1.0 punto)

2. **Observaciones.** En un esquema represente el proceso para preparar un medio de cultivo sólido y un medio de cultivo líquido para hongos (1.0 punto).

3.- Cuestionario.

a) ¿Qué características y/o componentes debe tener un medio de cultivo para la detección de hongos fosfodisolventes? ¿Cómo se observaría un crecimiento positivo para un hongo de este tipo? Represente con un dibujo (a color) un crecimiento positivo de un hongo fosfodisolvente (2.0 puntos)

b) Investigue la composición del agar “micosel” y del agar “rosa de bengala” así como su uso y/o aplicación en micología (2.0 puntos).

c) ¿Qué son los dermatofitos? ¿Qué medios de cultivo se emplean para su aislamiento? (2.0 puntos).

4.- **Bibliografía.** Cite la literatura revisada para responder las preguntas de investigación (1.0 punto)

PRÁCTICA 2. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE COLONIAS FÚNGICAS

A) DATOS BÁSICOS DE LA PRÁCTICA

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad I. Introducción a la Micología y en la Unidad II. Sistemática: clasificación y evolución de los hongos. Temas 2.3. Hongos terrestres inferiores: División **Zygomycota** y Trichomycota. 2.4. Hongos terrestres superiores: División Deuteromycota, **Ascomycota** y Basidiomycota. **Esta práctica consta de 2 sesiones.**

B) INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariontes, heterótrofos. Obtienen sus nutrientes por digestión extracelular (mediada por actividad de enzimas secretadas) seguido de la absorción de productos solubles. En su estado vegetativo, crecen en o sobre un sustrato, formando hifas y/o micelios (septados o cenocíticos); la mayoría de los hongos carecen de estructuras móviles, su pared celular está compuesta principalmente de glucanos y quitina. Los hongos pueden ser uninucleados o multinucleados, homotáticos o heterotáticos, haploides o diploides. Sus mecanismos de reproducción incluyen la sexual, asexual y parasexual, lo que genera propagulos microscópicos (esporas). Se caracterizan por ser de distribución cosmopolita, teniendo una importancia ecológica como saprófitos, simbiontes mutualistas ó parásitos. Una de las características fundamentales que permiten la identificación de los hongos es el análisis de las características macroscópicas y microscópicas de sus colonias [1].

C) OBJETIVO GENERAL

Analizar la morfología macroscópica y microscópica de hongos del *Phylum Zygomycota* y *Ascomycota* en dos sesiones prácticas.

C.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar, describir y analizar la morfología macroscópica de colonias fúngicas.
- Generar preparaciones para la observación de la morfología microscópica de hongos levaduriformes y filamentosos.
- Crecer un hongo de interés en un medio de cultivo líquido y un medio de cultivo sólido para comparar su morfología.
- Determinar la velocidad de crecimiento del hongo seleccionado.

D) MATERIAL REQUERIDO

- Colonias fúngicas crecidas en medio sólido
- Cinta adhesiva o scotch
- Colorante azul de tripan
- Cubreobjetos y portaobjetos
- Bisturí
- Medio de cultivo líquido YEPD, medio de cultivo sólido PDA.
- Asa bacteriológica.

E) ACTIVIDADES A DESARROLLAR DURANTE LA PRÁCTICA.

Las metodologías y técnicas a desarrollar en esta práctica están basadas en las descritas por Bonifaz-Trujillo (2012), con algunas modificaciones y adecuaciones acordes a los materiales y reactivos disponibles en el Laboratorio.

E.1.- ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE COLONIAS FÚNGICAS

- a. Describir el aspecto de la colonia proporcionada. En el caso de la mayoría de los hongos filamentosos esta puede ser aterciopelada, pulverulenta, algodonosa, rugosa, plegada, cerebriforme, granulosa, etc. En el caso de los hongos levaduriformes, la colonia es cremosa.
- b. Describir la consistencia de la colonia: dura, membranosa, blanda, suave, etc.
- c. Describir el relieve de la colonia: plana o elevada
- d. Describir la pigmentación, esta puede ser variable dependiendo del tipo de micelio y de la presencia de estructuras reproductivas. Además, el reverso de la colonia puede presentar un pigmento difusible.
- e. Describir el tipo de micelio: vegetativo, reproductivo.

E.2.- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA, PREPARACIONES EN FRESCO MEDIANTE LA TÉCNICA DE CINTA ADHESIVA O SCOTCH

- a. Colocar una pequeña gota de azul de tripan en el centro de un portaobjetos limpio.
- b. Cortar un fragmento de cinta scotch y tocar con el lado adhesivo un área de la colonia, en la periferia si la colonia está bien desarrollada, o bien, en el centro si se trata de una colonia joven.
- c. Coloque la cinta con el lado adhesivo hacia abajo sobre la laminilla ya preparada, coloque una gota adicional de colorante sobre la cinta, coloque un cubreobjetos y presione suavemente para eliminar burbujas de aire.
- d. Examinar al microscopio con los objetivos 10x y 40x. Anotar las siguientes características: aspecto del micelio (septado o cenocítico), uninucleado o multinucleado, el origen del micelio (verdadero o pseudomicelio), la función del micelio (vegetativo o de nutrición, o bien aéreo o reproductivo), el pigmento del

micelio: hialino (no pigmentado) o pigmentado (melánico o carotenoide), color y forma de las esporas, etc.

- e. Si se quiere sellar la preparación, se coloca alrededor del cubreobjetos barniz de uñas.

E.3.- INOCULAR UN CULTIVO LÍQUIDO Y UN CULTIVO SÓLIDO CON UNO DE LOS HONGOS DE INTERÉS.

E.3.1.- SIEMBRA DE UN CULTIVO LÍQUIDO

- a. Esterilizar el asa bacteriológica con la flama del mechero (hasta que se ponga al rojo vivo) y dejar enfriar.
- b. Tomar con el asa bacteriológica una pequeña porción de la colonia a resemar. Se realizará la siembra de un hongo levaduriforme y de un hongo filamentosos.
- c. Introducir el asa en el medio líquido para inocular el hongo de interés.
- d. Esterilizar nuevamente el asa por calor.
- e. Sellar bien el tubo e incubar a 28°C por lo menos 2 días.

E.3.2.- SIEMBRA DE CULTIVO SÓLIDO

- a. Esterilizar el bisturí con la flama del mechero y dejar enfriar.
- b. Cortar un pequeño segmento (< 1 cm) de la colonia a resemar, procurando tomar la muestra de la periferia de la colonia.
- c. Colocar el segmento a resemar en el centro de una caja de Petri, sobre el medio sólido PDA.
- d. Esterilizar nuevamente el bisturí por calor.
- e. Sellar bien la caja e incubar a 28°C por lo menos 2 días.

E.4. FORMACIÓN DE ZYGOSPORAS

- a. En un medio de cultivo sólido (PDA, YPD u otro) sembrar 2 cepas de *Rhizopus spp.*, cada una en un extremo de la placa. La siembra se realizará siguiendo el procedimiento descrito en el apartado E.3.2.
- b. Incubar las placas de Petri de 1 a 3 semanas a temperatura ambiente (en oscuridad o con luz parcial).
- c. Observar cada semana el desarrollo fúngico en búsqueda de zigosporas.

F. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Webster J, Weber R (2007) Introduction to Fungi (3 ed). UK: Cambridge University Press.
- 2.- Bonifaz-Trijullo J.A (2012) Micología Médica Básica (4 ed). Mc. Graw-Hill.

MORFOLOGÍA DEL PHYLUM ZYGOMYCOTA

En esta sesión se observarán las características macroscópicas y microscópicas de hongos pertenecientes al phylum Zygomycota, orden Mucorales.

Se realizarán las actividades descritas en los apartados **E.1**, **E.2**, **E.3.2** y **E.4**.

El instructor mostrará laminillas de preparaciones fijas de la colección de hongos del laboratorio para que el estudiante indentifique las principales características morfológicas de los Mucorales.

APÉNDICE. *Phylum Zygomycota – Orden Mucorales*

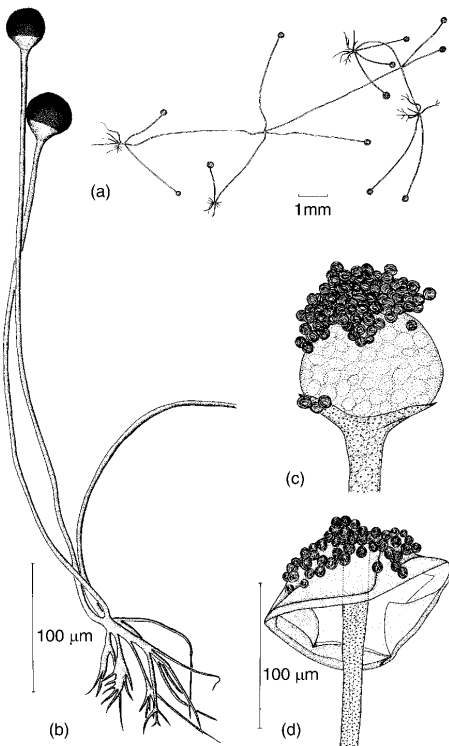


Figura 1. Reproducción **asexual** de *Rhizopus stolonifer*. a) desarrollo de rizoides, estolones y esporangios, b) esporangióforos con sus rizoides basales, c) esporangio con esporangiosporas, mostrando la columela, d) esporangio en forma de sombrero chino (columela invaginada). Imágen tomada de **Webster J, Weber R** (2007) *Introduction to Fungi* (3 ed). UK: Cambridge University Press.

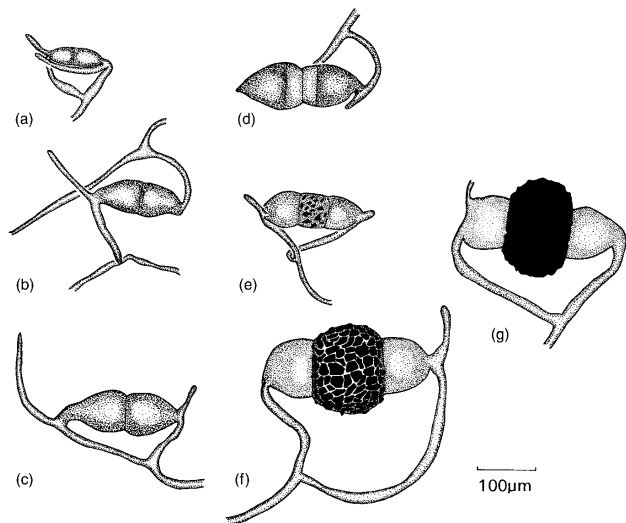


Figura 2. Reproducción **sexual**.

a-g, etapas de formación de zigosporas. a, b y c) formación de progametangios; d) formación del septo gametangial, el ápice queda dividido en dos células, gametangio terminal y célula suspensora; e) disolución del septo de fusión, cariogamia y formación del prozigosporangio; g y f) zigosporangio con una única zigospora. Imágenes tomada de **Webster J, Weber R** (2007) *Introduction to Fungi* (3 ed). UK: Cambridge University Press.

REPORTE PRÁCTICA 2. MORFOLOGÍA DEL PHYLUM ZYGOMYCOTA

Aspectos a evaluar	Puntaje	Puntaje obtenido
Desempeño durante la práctica	1	
Reporte escrito de la sesión 1	9	
Total	10	

Indicaciones para el reporte:

1.- Genere una **Introducción** para su reporte, sustentada en una revisión bibliográfica, citando en el texto las referencias consultadas (1.0 punto)

2.- **Observaciones. Describa el aspecto macroscópico y microscópico de 3 colonias de hongos del *Phylum Zygomycota* analizados en el laboratorio.** En ambos casos incluya un dibujo a color y nombre cada estructura. Para aspectos microscopicos indique el objetivo (4x, 10x ó 40x) que empleó para su observación (3 puntos).

3.- Resultados.

a) **Cultivo en medio sólido.** Indique cuantos días requirió el hongo seleccionado para generar una colonia madura. Haga un dibujo representando el crecimiento de la colonia en cm y por días (1, 3 y 7 días). Indique el nombre y clave numérica del *Zygomyceto* seleccionado (1.0 puntos).

b) **Reproducción sexual en Mucorales.** Represente con un dibujo el ensayo realizado para promover el desarrollo de zigosporas. Indique el nombre y clave numérica de los *Zygomycetos* seleccionados ¿Qué condiciones favorecen la formación de zigosporas? (1.0 puntos).

4.- **Cuestionario. Investigue una especie perteneciente a los siguientes géneros: a) *Harpella* y b) *Cunninghamella*.** Incluya su clasificación taxonómica, su ciclo de vida (describiendo ciclos de reproducción sexual y asexual según sea el caso) su ecología y en caso de tener aplicaciones para el ser humano, describa éstas brevemente (2.0 puntos)

5.- **Conclusiones generales** (1.0 punto)

6.- Incluya las referencias bibliográficas consultadas

MORFOLOGÍA DEL PHYLUM ASCOMYCOTA

En esta sesión se observarán las características macroscópicas y microscópicas de hongos pertenecientes a las clases Hemiascomycetes y Plectomycetes. Se realizarán las actividades E.1, E.2 y E.3.

El instructor mostrará laminillas de preparaciones fijas de la colección de hongos del laboratorio para que el estudiante indentifique las principales características morfológicas de Phylum Ascomycota.

APÉNDICE. *Phylum Ascomycota – orden Eurotiales*

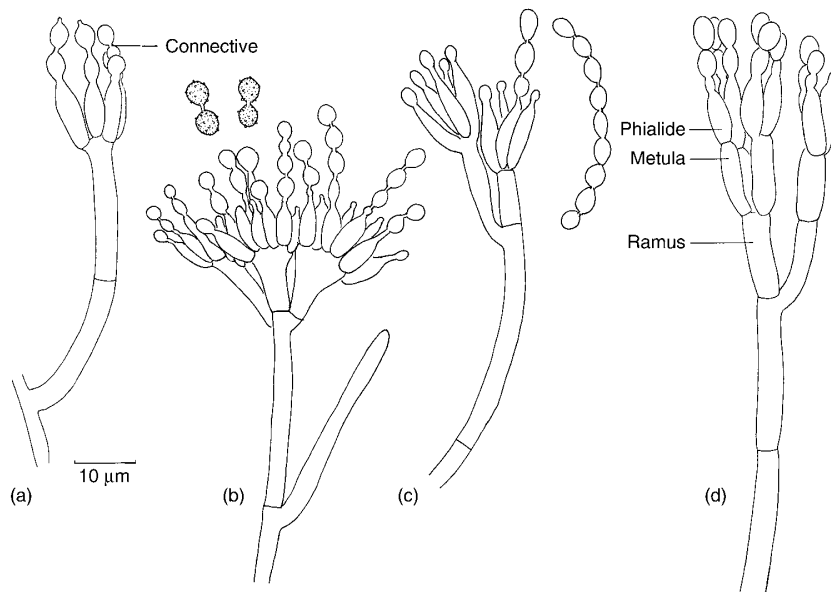


Figura 1. Conidióforos de 4 géneros de *Penicillium*. a) *Penicillium spinulosum*, (b) *Penicillium verruculosum*, (c) *Penicillium citrinum*, (d) *Penicillium expansum*. Imágen tomada de **Webster J, Weber R** (2007) *Introduction to Fungi* (3 ed). UK: Cambridge University Press.

ANOTACIONES DE LA PRÁCTICA

REPORTE PRÁCTICA 2. MORFOLOGÍA DEL PHYLUM ASCOMYCOTA

Aspectos a evaluar	Puntaje	Puntaje obtenido
Desempeño durante la práctica	1	
Reporte escrito de la sesión 2	9	
Total	10	

Indicaciones para el reporte:

1.- Genere una **Introducción** para su reporte, sustentada en una revisión bibliográfica, citando en el texto las referencias consultadas (1.0 punto)

2.- **Observaciones. Describa el aspecto macroscópico y microscópico de 8 colonias de hongos del *Phylum Ascomycota* observadas en el laboratorio.** En ambos casos incluya un dibujo a color y nombre cada estructura. Para aspectos microscopicos indique el objetivo (4x, 10x ó 40x) que empleó y sugiera a que *Orden o Género* al que pudiera pertenecer el hongo observado (4.0 puntos).

3.- **Resultados. Cultivo en medio sólido.** Indique cuantos días requirió el hongo seleccionado para generar una colonia madura. Haga un dibujo representando el crecimiento de la colonia en cm y por días (1, 3 y 5 días). Indique el nombre y clave numérica del *Ascomyceto* seleccionado (1.0 puntos).

4.- **Cuestionario. Investigue dos especies del *Phylum Ascomycota* que tengan alguna de las estructuras observadas en el laboratorio (ejm.- macroconidios, esclerocios, microconidios, fialides, etc).** Incluya su clasificación taxonómica, su ciclo de vida (describiendo ciclos de reproducción sexual y asexual según sea el caso) su ecología y en caso de tener aplicaciones para el ser humano, describa éstas brevemente (2.0 puntos)

5.- **Conclusiones** generales (1.0 punto).

PRÁCTICA 3. HONGOS ACUÁTICOS. AISLAMIENTO DE QUITRIDIOS

A) DATOS BÁSICOS DE LA PRÁCTICA

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad II. Sistemática: clasificación y evolución de los hongos. Temas 2.2. Hongos acuáticos: División Plasmodiophoromycota, **Quitridiomycota**, Hyphochytridiomycota y Oomycota. Unidad III. Crecimiento, desarrollo, diferenciación y nutrición de hongos. Tema 3.6. Diferencias entre hongos inferiores y superiores. **Esta práctica consta de 2 sesiones.**

B) INTRODUCCIÓN

Los hongos acuáticos, comúnmente conocidos como quitridios pertenecen al Phylum Chytridiomycota, el cual tiene cerca de 900 especies distribuidas en cinco órdenes: Chytridiales, Spizellomycetales, Monoblepharidales, Blastocladiales y Neocallimastigales. La mayoría de los quitridios son organismos aerobios, que generan zoosporas con un solo flagelo posterior; la excepción se encuentra en los Neocallimastigales que son anaerobios y pueden tener hasta 16 flagelos. Los quitridios habitan cuerpos de agua dulce, aunque también existen especies de agua salada. La mayoría de los quitridios son saprófitos, se alimentan de celulosa, quitina, queratina, etc., perteneciente a plantas en descomposición y restos de animales que se localizan en el suelo. Algunos quitridios son parásitos biotróficos de algas, diatomeas y plantas vasculares. Especies representativas de hongos acuáticos se muestran en la figura 1.

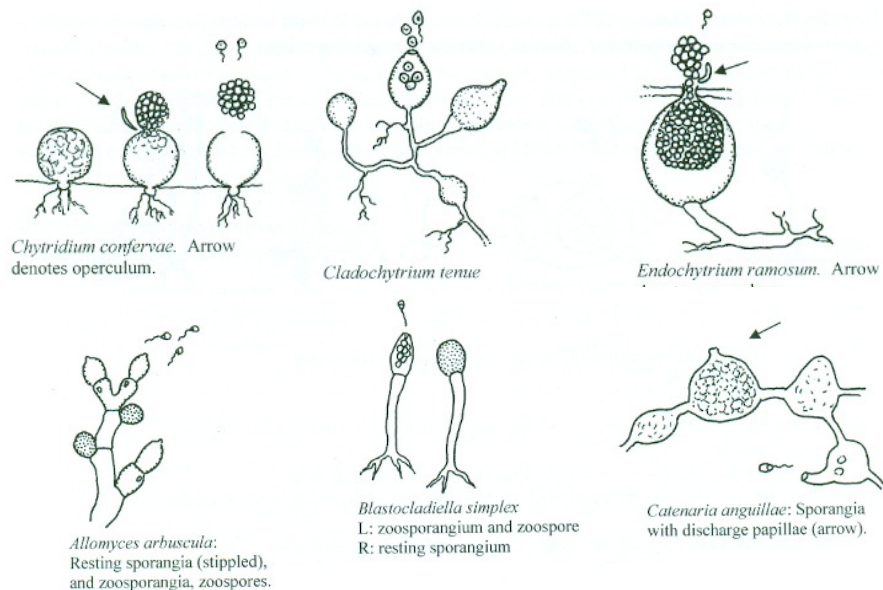


Figura 1. Estructuras de hongos acuáticos. Imagen tomada de Frank M. Dugan "The identification of fungi" An Illustrated Introduction with Keys, Glossary, and Guide to Literature. The American Phytopathological Society, 2012.

C) OBJETIVO GENERAL

Aislar hongos acuáticos de cuerpos de agua dulce e identificar las estructuras somáticas y/o reproductoras de éstos hongos.

D) MATERIAL REQUERIDO

- Muestras de agua de 3 sitios distintos
- Cebos: moscas, exoesqueletos de camaron, fragmentos de uñas, cabello, celofan, polen y/ó material vegetal.
- Cajas de Petri
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Colorante azul de tripan
- Microscopio

E) ACTIVIDADES A DESARROLLAR DURANTE LA PRÁCTICA**E.1.- ESTERILIZACIÓN DE LOS CEBOS**

Colocar el cebo de elección en un frasco de vidrio con tapa y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 min.

E.2.- PREPARACIÓN DE CAJAS DE PETRI CON CADA CEBO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ACUATICOS

Para el aislamiento de hongos acuáticos cada equipo seleccionará 3 cebos diferentes y conseguirá tres muestras de agua de lugares distintos. Los cebos se colocarán en cajas de Petri como se indica a continuación:

- Rotular 9 cajas de Petri (3 para cada cebo).
- Agregar las muestras de agua a las cajas de Petri (20 mL aprox.) preparadas con los 3 diferentes cebos.
- Dejar las cajas de Petri tapadas durante 8 días a temperatura ambiente.

E3.- OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO

Después del periodo de incubación, tomar muestras de agua o fragmentos de cada cebo y observar el desarrollo de hongos acuáticos.

- Analizar las muestras al esteroscopio en busca de estructuras somáticas y/o reproductoras.
- Tomar un portaobjetos, colocar parte de la muestra en la que se observan posibles estructuras de hongos acuáticos, teñir con azul de tripan, colocar un cubreobjetos y observar al microscopio.

REPORTE PRÁCTICA 3. HONGOS ACUÁTICOS.

AISLAMIENTO DE QUITRIDIOS

Aspectos a evaluar	Puntaje	Puntaje obtenido
Desempeño durante la práctica	1	
Reporte escrito	9	
Total	10	

Indicaciones para el reporte:

1.- Genere una **Introducción** para su reporte, sustentada en una revisión bibliográfica, citando en el texto las referencias consultadas (1.0 punto)

2.- Observaciones. Dibujar y describir las estructuras (hongos y protistas) encontradas en los cuerpos de agua incubados con los diferentes cebos. Indique a qué *orden*, *género* o *especie* pudieran pertenecer. Indique el sitio del cual obtuvo su muestra de agua (3.0 puntos).

3.- Cuestionario

a) Represente con un dibujo conidios acuáticos de los géneros *Lemonniera* y *Anguillospora*. Haga una breve descripción de las características de dichos conidios y del rol ecológico de estos hongos (1.0 punto)

b) ¿Qué técnicas moleculares se pueden emplear para la identificación de hongos acuáticos? (1.0 punto)

4.- Resultados y Conclusiones

a) ¿Qué cebo permitió aislar mayor cantidad de hongos acuáticos? (1.0 punto)

b) ¿Existe alguna relación entre el cebo empleado y el tipo de estructura aislada? (1.0 punto)

c) ¿Qué se podría mejorar en el laboratorio para aislar e identificar hongos acuáticos? (1.0 punto).

PRÁCTICA 4. AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE DIFERENTES SUSTRATOS

A) DATOS BÁSICOS DE LA PRÁCTICA

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad III. Crecimiento, desarrollo, diferenciación y nutrición de hongos. Tema 3.4. Características de crecimiento de los hongos: habilidad de colonización. Unidad IV. Genética, reproducción y esporulación. **Esta práctica consta de 3 sesiones.**

B) INTRODUCCIÓN

La mayoría de los hongos tienen como hábitat natural al suelo, donde juegan un papel importante como saprófitos que descomponen la materia orgánica; otros actúan como parásitos de plantas, animales, e incluso de otros hongos. Asimismo, una gran cantidad de hongos actúa como contaminantes del medio provocando pérdidas en la industria, los laboratorios, e incluso pueden actuar como patógenos oportunistas en huéspedes propensos. Los hongos contaminantes se distribuyen a través de esporas en el aire y actúan como alérgenos, pudiendo causar cuadros de hipersensibilidad. Los hongos alergénicos de mayor importancia son algunas especies de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium* y *Penicillium* (Fig. 1). Todos ellos pertenecientes al *Phylum Ascomycota*. Por otro lado, dentro de los principales hongos aislados como contaminantes presentes en nuestro medio se incluyen a géneros del *Phylum Zygomycota* como *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, entre otros.

La mayoría de los hongos contaminantes crecen en aproximadamente 48 h y su morfología completa se presenta entre 3 a 5 días. Se emplean como medios habituales para su aislamiento el medio sólido de Sabouraud y el agar papa-dextrosa (PDA).

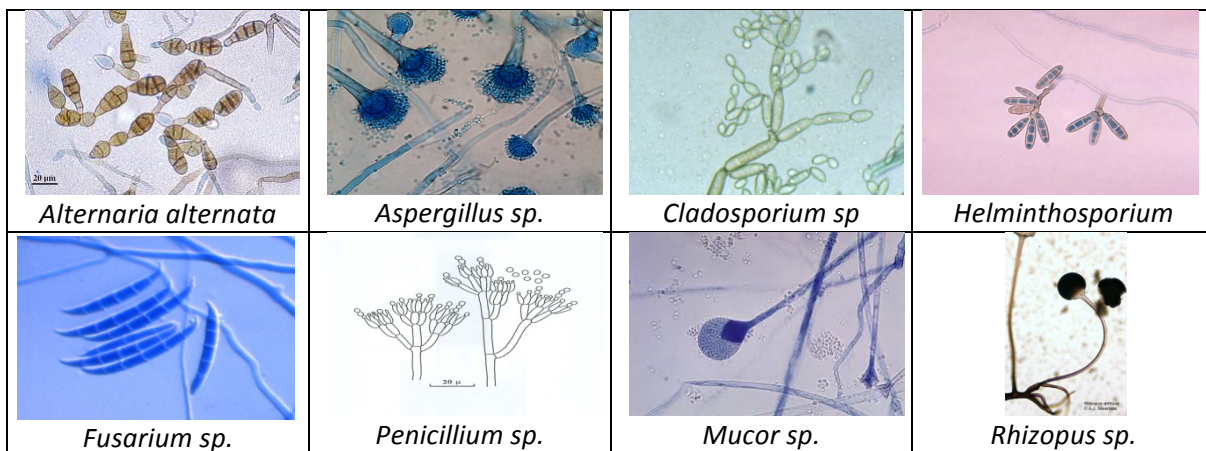


Figura 1. Principales géneros aislados de muestras ambientales.

C) OBJETIVOS

- Aislar hongos a partir de sustratos de interés
- Analizar la morfología de la colonia de los hongos aislados
- Observar e identificar las características microscópicas de la colonia (micelio, formas reproductivas, pigmentos, etc).
- Asignar un posible género al hongo aislado en base a las observaciones realizadas

D) MATERIAL REQUERIDO

- Placas de Petri con medio de cultivo sólido PDA, agar avena, agar jugo V8.
- Medio PDA recién preparado (sin gelificar, mantenido a 45°C)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Colorante azul de tripano (tripan) ó safranina
- Microscopio
- Recipiente con alcohol al 96%
- Pinzas de disección
- Aguja de disección
- Bisturí
- Caja de Petri estéril con PDA (cubitos de agar de 1 cm²)
- Caja de Petri nueva y soporte para portaobjetos
- Pipeta pasteur
- Papel parafilm

E) ACTIVIDADES A DESARROLLAR DURANTE LA PRÁCTICA

Aislamiento de hongos a partir de sustratos de interés: suelo, agua no potable, vegetales, alimentos contaminados, ambiente aéreo, etc.

Sesión 1**E.1. Técnica de dilución y vaciado en placa**

Esta técnica se emplea para aislar hongos de sustratos líquidos o sólidos muy contaminados.

1. Preparar una serie de 5 tubos con 4.5 ml de agua estéril (rotularlos del 1 al 5)
2. Suspender la muestra en estudio (1 g de sustrato sólido ó 1 mL de sustrato líquido) en 9 mL de agua estéril.
3. Homogenizar perfectamente la muestra.
4. Tomar 0.5 mL de la suspensión anterior al primer tubo y así sucesivamente al último tubo, generando diluciones seriadas.
5. De los tubos 3 y 5, tome una alícuota de 1 mL, colóquela en un caja de Petri estéril y vacie 25 mL de medio PDA fundido y enfriado a 45°C.
6. Homogenizar por rotación, dejar solidificar e incubar a 28°C.
7. Hacer observaciones cada 48 h hasta la aparición de crecimiento fúngico.

8. Contar las colonias desarrolladas y calcular el número de propágulos por gramo o por mL de cada muestra.

E.2. Técnica de exposición de placas

Esta técnica es empleada para aislar hongos a partir del ambiente aéreo.

1. Colocar las cajas de Petri con medio PDA, agar avena y agar jugo V8 en el sitio en el cual se quiere hacer el aislamiento.
2. Destapar y exponer las cajas de Petri al ambiente durante 5 a 10 minutos y taparlas.
3. Incubar las cajas de Petri a 28°C, hacer observaciones cada 48 h hasta la aparición de crecimiento fúngico.

Sesión 2

E.3. Monocultivo del hongo de interés

1. Seleccionar 2 colonias con morfologías macroscópicas de interés y resembrarlas en medio PDA. Con la ayuda de un bisturí tome un segmento del agar que contenga el hongo de interés teniendo cuidado de no tomar material de otros hongos.
2. Coloque el segmento de agar en una caja de Petri con agar PDA
3. Dejar que la colonia se desarrolle por 48 a 72 h

E.4. Preparación de un microcultivo

1. Con un bisturí estéril se cuadricula el medio de cultivo de la caja de Petri con PDA en cuadros de aproximadamente 1 cm² (esto se realiza en la campana de flujo laminar).
2. Montar la cámara de microcultivo. Para ello empleé una caja de Petri estéril, fije en la base 2 palos de madera o de vidrio, coloque encima un portaobjetos.
3. Transferir uno de los cuadros de PDA al portaobjetos que esta en la cámara de microcultivo.
4. Con una aguja de disección estéril o con una asa bacteriológica estéril se lleva el inóculo del hongo de interés a las orillas superiores e inferiores del cuadro de PDA. Posteriormente, se coloca con cuidado un cubreobjetos sobre el cuadro de PDA inoculado.
5. Finalmente, se agregan 2ml de agua ó de glicerol estéril, en el fondo de la cámara de microcultivo para mantener la humedad, sin mojar el área de crecimiento del hongo. Sellar la cámara de microcultivo con parafilm. Incubar a 28°C por 24 a 48h.

E.5. Tinción del microcultivo con safranina o azul de tripan

1. Levantar suavemente el cubreobjetos con unas pinzas
2. Retirar el exceso de agar con la ayuda de un bisturí
3. Fijar la preparación con metanol hasta evaporación
4. Teñir con el colorante seleccionado por 15 min
5. Lavar ligeramente con agua destilada
6. Lavar con alcohol al 96%
7. Bañar con xilol durante 5 min
8. Montar la laminilla para su observación con glicerol al 50%. Para ello coloque una gota de glicerol sobre el portaobjetos, sitúe el cubreobjetos encima del glicerol, evite la formación de burbujas. Selle su preparación colocando barniz alrededor del cubreobjetos. Observar al microscopio.

E.6. Observación de la morfología microscópica del monocultivo

1. Coloque una gota de colorante azul de tripan sobre una portaobjetos, tome una muestra de la colonia de interés con cinta Scotch y observe la morfología al microscopio.

REPORTE PRÁCTICA 4. AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE DIFERENTES SUSTRATOS

Aspecto	Puntaje	Puntaje obtenido
Desempeño durante la práctica	1	
Reporte escrito	9	
Total	10	

Indicaciones para el reporte

1.- Genere una **introducción** para su reporte, siendo esta acorde al posible género o especie aislado. (1.0 punto)

2.- ¿Cuál sería la hipótesis para esta práctica? (1.0 punto)

3.- Observaciones y Resultados

a) Determine el número de propágulos obtenidos de acuerdo al procedimiento del apartado E.1. ¿Qué ventaja o desventaja tendría el emplear las primeras dos diluciones para determinar el número propágulos? (1.0 punto)

b) Dibujo y descripción de la **morfología macroscópica** de la colonia seleccionada. Considere: la descripción de la morfología inicial vista en la placa del aislado (apartado E.2) y el crecimiento del monocultivo o cultivo puro (apartado E.3). ¿Cómo es la velocidad de crecimiento del hongo seleccionado? (2.0 puntos)

c) Dibujo y descripción de la **morfología microscópica** de la colonia seleccionada. Considere: a) la descripción de la morfología de un microcultivo (apartado E.4, E.5) y la observación rápida empleando cinta Scotch. b) ¿Existe alguna diferencia en las observaciones al realizar tinciones con azul de tripan, lugol o safranina? c) Dé el fundamento de cada colorante. (2.0 puntos).

4.- **Conclusión** sobre el posible género aislado. Justifique su respuesta basado en revisión bibliográfica. Investigue el ciclo de vida (reproducción sexual y/o asexual) del posible hongo aislado o de un hongo con morfología semejante. (2.0 puntos).

PRÁCTICA 5. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS MEDIANTE PRUEBAS MOLECULARES

A) DATOS BÁSICOS DE LA PRÁCTICA

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad II. Sistemática: clasificación y evolución de los hongos. Tema 2.7. Origen, evolución y filogenia de los hongos: principales teorías y la sistemática molecular (filogenias de rRNA-ITS). Unidad IV. Unidad 4. Genética, reproducción y esporulación Tema 4.1. Genética fúngica: características moleculares, ADN y cromosomas. Esta práctica consta de 3 sesiones.

B) INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos se caracterizan por tener una gran cantidad de moléculas de ARN y un alto contenido de polisacáridos que pueden aparecer como contaminantes en procesos de extracción de ADN genómico. En particular, la contaminación del ADN con carbohidratos puede afectar la actividad de enzimas de restricción y de ADN polimerasas en procesos posteriores de análisis del ADN extraído. Los hongos filamentosos también se caracterizan por tener paredes celulares muy rígidas, lo que requiere de un método eficiente para romper la pared, durante el aislamiento de ácidos nucleicos. En esta práctica se empleará el método de extracción descrito por Weiland (1997) con ciertas modificaciones; este método se basa en el uso de solventes orgánicos para la extracción de ADN.

La identificación molecular de especies de hongos se basa en la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de regiones del ADN ribosomal. Los genes que codifican los ARN ribosomales se encuentran en unidades repetidas en tándem, y se localizan en sitios llamados "regiones de organización nucleolar". Cada unidad consiste de regiones que se transcriben [las cuales contienen a los genes 18S, 5.8S y 26 S y las regiones ETS (External Transcribed Spacers)], y de regiones que no se transcriben o NTS (non-transcribed spacer). Dentro de la región que se transcribe, se encuentran las regiones ITS (Internal Transcribed Spacers). Estas regiones se localizan a cada lado del gen del RNA ribosomal 5.8S y se describen como ITS1 e ITS2. La longitud y la secuencia de los ITS son variables, y son de importancia taxonómica, e incluso permiten hacer estudios de filogenia-evolución.

C) OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los hongos aislados en la práctica 4 mediante análisis de la región ITS del ADN ribosomal.

C.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer el ADN genómico de los hongos
- Analizar la integridad del ADN mediante electroforesis en gel

- Determinar la concentración de ADN obtenido
- Amplificar la región ITS del ADN ribosomal empleando oligos específicos

D) MATERIAL Y SOLUCIONES REQUERIDAS

- Mezcla de Extracción (Tritón 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM)
- Solución de Fenol:cloroformo en proporción 1:1 (v/v)
- Cloroformo
- Etanol absoluto y al 75%
- Acetato de amonio 4M
- RNAsa
- Reactivos para PCR (Buffer Tris-HCl 10X, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 10 mM, oligonucleótido sentido y antisentido, enzima Taq ADN polimerasa).
- Tubos eppendorf
- Tubos para PCR
- Puntas de micropipeta
- Micropipetas
- Agarosa
- Buffer TAE1X

E) ACTIVIDADES A DESARROLLAR DURANTE LA PRÁCTICA

Sesión 1

E.1.- Extracción de ADN del hongo

- 1.- Crecer el hongo en un medio de cultivo líquido (medio rico) al menos 3 días antes de la extracción de ADN.
- 2.- Centrifugar el cultivo durante 5 min a 3,500 rpm para coleccionar la pastilla celular. Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 500 µL de agua destilada estéril. Centrifugar nuevamente durante 5 min a 3,500 rpm. Retirar el agua con una pipeta.
Nota: el volumen de agua a añadir puede variar dependiendo del tamaño de la pastilla (el instructor le indicará si debe cambiar dicho volumen).
- 3.- Agregar 200 µL de la Mezcla de Extracción. Resuspender suavemente el paquete celular con la punta de una pipeta.
- 5.- Agregar 200 µL de una solución fenol:cloroformo (1:1 v/v), y un volumen equivalente a 100 µL de perlas de vidrio. Agitar en el vortex durante 1 min e incubarlo 1 min en hielo (repetir el proceso 8 veces vortex-incubación).
- 6.- Agregar 200 µL de agua destilada, centrifugar durante 5 min a 13,000 rpm.
- 7.- Pasar la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio, con cuidado de no tomar la interfase.
- 8.- Agregar un volumen de cloroformo (es decir, si se tienen 500 microlitros de fase acuosa, añadir 500 µL de cloroformo), centrifugar 5 min a 13,000 rpm y obtener la fase acuosa.
- 9.- Añadir 2 volúmenes de etanol al 100% y 10 µL de acetato de amonio 4M. Incubar las muestras a -20°C por lo menos 2 hrs.

Sesión 2

Continuación del protocolo de extracción de ADN.....

- 10.- Centrifugar por 8 minutos a 13,000 rpm, decantar el sobrenadante.
- 11.- Agregar 1 ml de etanol al 70%, centrifugar 5 min a 7,500 rpm. Decantar y dejar secando la pastilla (10 min o hasta que se haya evaporado el etanol).
- 12.- Resuspender la pastilla en 30 μ L de agua destilada estéril.
- 13.- Tomar 2 μ L del ADN extraído y separarlo en un gel de electroforesis al 0.8%
- 14.- Guardar el ADN a -20°C
- 15.- Tratar el ADN con 1 μ L de la enzima RNAsa, incubando 30 min a 37 °C en el termoblock para eliminar el ARN remanente.

E.2. Cuantificación del ADN

- 1.- Tome 1.5 μ L del ADN obtenido para cuantificarlo por absorción espectrofotométrica a una longitud de onda de 260 nm, en el equipo NanoDrop 2000.
- 2.- Ajuste la concentración del ADN a 200 ng/ μ L

Sesión 3**E.3. Amplificación de las regiones ITS por PCR**

- 1.- Emplear 1 microlitro del ADN (200 ng/ μ L) para amplificar por PCR las regiones ITS.
- 2.- Tomar un tubo de PCR y colocar los siguientes reactivos en el orden de aparición:

Agua destilada	37 μ L
Buffer de PCR 10X	5 μ L
Cloruro de Magnesio 50 mM	3 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
Oligo ITS sentido	1 μ L
Oligo ITS antisentido	1 μ L
ADN molde	1 μ L
Taq polimerasa	1 μ L

Condiciones de amplificación

Un ciclo de:

98°C 30 s

Treinta y cinco ciclos de:

98°C 10 s

60°C 30 s

72°C 1 min 30 s

Un ciclo de

72°C 8 min

- 3.- Preparar un gel de electroforesis al 1% y separar 10 μ L del producto de PCR obtenido.
- 4.- Adquirir la imagen del gel en el Fotodocumentador y analizar los resultados.

F. BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Weiland, J.J. (1997).** Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. *Fungal Genetics Newsletter* **44**: 60 – 66.

REPORTE PRÁCTICA 5. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS MEDIANTE PRUEBAS MOLECULARES

1.- Genere una **Introducción** para su reporte, sustentada en una revisión bibliográfica, citando en el texto las referencias consultadas (1.0 punto)

2.- **Observaciones* y Resultados.** En un esquema describa y represente: a) cada etapa del proceso de extracción de ADN*, b) la región que amplifican los oligos ITS4 e ITS5, y c) incluya el gel de electroforesis e indique el tamaño de los fragmentos de PCR obtenidos (2.0 puntos).

3.- La siguiente secuencia es un ejemplo de una región ITS de un hongo:

```
GGGCCTTTCGAGTTGTAGGCTTTGCCTGCTATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGC
CCGCCGATTGGACATATTCAAACCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACTTAATAGTTACAACCTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTGTACCTTCAAGCTTTG
CTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGACTCGCCTCAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGGAG
CGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGATCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTA
GGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
```

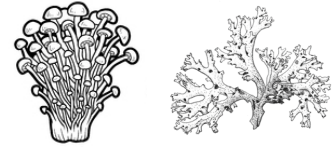
- a) El instructor proporcionará una serie de secuencias de regiones ITS en formato electrónico. Entre a la página del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) en la aplicación BLAST (nucleotide BLAST), pegue cada secuencia en el espacio correspondiente y lleve a cabo una búsqueda empleando la opción megablast.
- b) ¿A qué *Phylum*, orden, género y especie podría pertenecer dicha secuencia ITS? (2.0 puntos)

4.- Cuestionario

- a) ¿Cuál es la finalidad de emplear acetato de amonio en el método de extracción de ADN de hongos? (1.0 punto)
- b) ¿Qué otros protocolos se pueden emplear para extraer ADN de hongos? En qué se fundamentan? (1.0 puntos)
- c) ¿Qué otros métodos podemos emplear para hacer una caracterización molecular de un hongo desconocido? (1.0 punto)

6.- **Conclusiones** generales de la práctica (1.0 punto)

PRÁCTICA 6. MORFOLOGÍA DE BASIDIOMICETOS Y LIQUENES



A) DATOS BÁSICOS DE LA PRÁCTICA

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad II. Sistemática: clasificación y evolución de los hongos. Tema 2.4. Hongos terrestres superiores: División Deuteromycota, Ascomycota y **Basidiomycota**. Tema 2.5. **Líquenes**: Deuterolíquenes, Ascolíquenes y Basidiolíquenes. Unidad IV. Unidad 4. Genética, reproducción y esporulación. Esta práctica consta de 1 sesión.

B) INTRODUCCION

El *Phylum* Ascomycota, en la clase Hymenoascomycetes, orden Lecanorales, agrupa a todos aquellos géneros de hongos (micobiontes) capaces de formar asociaciones simbióticas con algas verdes o cianobacterias (fotobiontes) para formar un talo específico de un líquen. Existen cerca de 13 500 especies de micobiontes, mientras que el número de especies de fotobiontes conocidos es mucho menor (cerca de 100). A pesar que la mayoría de los micobiontes pertenecen a los ascomicetos, hay evidencia de algunas especies (aprox. 20) pertenecientes al *phylum* Basidiomycota también participan en este tipo de simbiosis. Los líquenes se caracterizan por tolerar ciclos de hidratación-deshidratación constantes, además toleran temperaturas extremas, alta radiación solar y tienden a colonizar hábitats poco accesibles para plantas superiores, por ejemplo, rocas o suelos infértiles, también se encuentran asociados a la corteza de árboles. Los tres tipos más comunes de talos de líquenes son: crustáceos, foliosos y fruticulosos.

El *Phylum* Basidiomycota constituye más de 30,000 especies de hongos clasificados en cuatro clases: *Homobasidiomycetes*, *Heterobasidiomycetes*, *Ustilaginomycetes* y *Uredinomycetes*. En esta diversidad pueden encontrarse hongos saprofitos, parásitos de plantas, simbiontes (formando micorrizas de manto y de orquídeas), entre otros. Los cuerpos fructíferos de muchos basidiomicetos son comestibles, algunos son venenosos y otros inducen efectos alucinógenos. La mayoría de los basidiomicetos desarrollan micelios septados, sin embargo, existen algunas especies que son dimórficas. La estructura de reproducción sexual característica de este *phylum* es el basidio, de acuerdo a su morfología podemos encontrar holobasidios (producidos por *Homobasidiomycetes*, carecen de septos) y heterobasidios (producidos por *Heterobasidiomycetes*, se encuentran divididos por septos). En el caso de *Ustilaginomycetes* y *Uredinomycetes*, las teliosporas (esporas dicarióticas de pared gruesa) dan lugar a los basidios. Generalmente un basidio genera 4 basidiosporas, aunque la cantidad puede ser variable entre especies.

C) OBJETIVO GENERAL

Observar la morfología de algunos Basidiomicetos y de líquenes

C.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar al microscopio la estructura de teliosporas de *Ustilago maydis*
- Observar la morfología macroscópica de cuerpos fructíferos y microscópica de basidiosporas.
- Observar las morfologías de diversos líquenes pertenecientes a las Sierra de Álvarez (San Luis Potosí).

D) ACTIVIDADES A DESARROLLAR DURANTE LA PRÁCTICA**D.1. Observación de teliosporas producidas por el hongo biotrófico *Ustilago maydis* en granos de maíz**

- 1.- Seleccione un grano de maíz infectado con *Ustilago maydis* o huitlacoche
- 2.- Abra el grano suavemente con la ayuda de un bisturí.
- 3.- Tome una sección oscura del grano y disgréguela suavemente en agua para obtener las teliosporas.
- 4.- Coloque una gota de la muestra sobre el portaobjetos para su observación.

D.2. Observación macroscópica y microscópica de cuerpos fructíferos

- 1.- Se observarán los cuerpos fructíferos de 3 hongos: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes*.
- 2.- Describir macroscópicamente a los 3 hongos: color, tamaño, forma del sombrero, tallo, tipo de himenio, presencia de escamas, etc.

D.3. Esporada en masa. Corte el pie del hongo (*Agaricus bisporus*) y coloque el sombrero con las laminillas hacia abajo encima de un portaobjetos. Déjelo de esta forma de 1 a 2 días. Las esporas se depositarán sobre el vidrio y podrán ser observadas al microscopio.

D.4. Observación macroscópica y microscópica de líquenes. El instructor proporcionará muestras de líquenes diversos, se describirá su estructura, con énfasis en la presencia de apotecios, ricinas, isidios, soredios, entre otras estructuras.

H. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Webster J, Weber RWS. Introduction to Fungi. Third edition. Cambridge University Press, 2007.

ANOTACIONES DE LA PRÁCTICA

REPORTE. PRÁCTICA 6. MORFOLOGÍA DE BASIDIOMICETOS Y LÍQUENES

Aspecto	Puntaje	Puntaje obtenido
Desempeño durante la práctica	1	
Reporte escrito	9	
Total	10	

Indicaciones para el reporte:

1.- Genere una **Introducción** para su reporte, sustentada en una revisión bibliográfica, citando en el texto las referencias consultadas (1.0 punto)

2.- Observaciones.

a) Dibuje y describa las teliosporas de *Ustilago maydis* observadas en el laboratorio (1.0 punto).

b) Dibuje la morfología macroscópica de las especies de basidiomicetos observados en el procedimiento "b". Describa el tipo de himenio, el color y la forma de las basidiosporas de cada especie (1.0 punto).

c) Dibuje y describa la morfología macroscópica de los líquenes observados; indique el tipo de talo en cada caso (1.0 punto).

3.- Cuestionario

a) Mencione tres especies del *Phylum Basidiomycota* que producen teliosporas. Describa el ciclo de reproducción sexual de uno de ellos e indique ¿qué importancia biológica tienen las teliosporas en dicha especie? (1.0 punto).

b) ¿Cuántos tipos distintos de himenio se han descrito en basidiomicetos? Para cada tipo de himenio, dé un ejemplo de un especie representativa y un dibujo alusivo a su morfología (1.0 puntos)

c) ¿Qué sustratos se emplean para la producción comercial de *Pleurotus* spp.? ¿Qué aportaciones nutricionales brinda este hongo? (1.0 puntos)

d) Investigue ¿Cuántas especies de líquenes hay en México? Describa dos de ellas, indicando su distribución geográfica, y sus principales características morfológicas (1.0 punto)

4.- Referencia bibliográfica (1.0 punto)

PRÁCTICA 7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE HONGOS AISLADOS EN EL SEMESTRE

A) DATOS BÁSICOS DE LA PRÁCTICA

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad V. Unidad 5. Ecología e importancia ecológica de los hongos. Tema 5.5. Los hongos como agentes de control biológico Esta práctica consta de 2 sesiones.

B) INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*. Las especies del género *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: “Competición directa por el espacio o por los nutrientes”, “producción de metabolitos antibióticos”, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y “parasitismo directo” de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos. Estos mecanismos pueden actuar de forma coordinada y su participación en los procesos de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma*, del hongo al que antagoniza, del tipo de cultivo y de condiciones ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura o la concentración de hierro [1,3].

Por otro lado, *Trichoderma spp.* ejerce efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas y participa en la inducción de una resistencia localizada o sistémica contra una gran variedad patógenos. El efecto positivo de *Trichoderma* sobre el crecimiento de la raíz, de brotes, el aumento del área foliar y el incremento en peso seco de plantas se ha asociado a un aumento en la calidad nutricional y un aumento en la síntesis de hormonas de la planta inducida por el hongo. El incremento en el desarrollo de la planta correlaciona con la penetración de *Trichoderma* en el sistema radicular de la misma [3].

En esta práctica, utilizaremos el sistema de confrontación *in vitro*, técnica que sirve para analizar el efecto de los hongos sobre el crecimiento de otros hongos. Como testigo positivo de biocontrol se incluirán cepas de *Trichoderma* en el análisis. Por otro lado, se evaluará el papel de *Trichoderma* sobre la germinación *in vitro* de especies vegetales.

C) OBJETIVO GENERAL

Determinar el comportamiento de los hongos aislados en el semestre y de especies del género *Trichoderma* mediante análisis de confrontación *in vitro*.

C.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si el hongo aislado en la práctica 4 tiene actividad biocontroladora
- Observar la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. sobre otros hongos.
- Determinar la biomasa y producción de clorofila en plántulas de chile germinadas *in vitro* con y sin *Trichoderma* spp.

D. ACTIVIDADES A DESARROLLAR DURANTE LA PRÁCTICA

D.1. Confrontación *in vitro*

- 1.- Inocular placas de Petri con un disco de aproximadamente 5 mm de diámetro, obtenido de las colonias de hongos a confrontar (los discos se deben de colocar en puntos equidistantes).
- 2.- Incubar las placas de Petri en la estufa a 28°C.
- 3.- Observar el crecimiento de los hongos cada dos días. Un ejemplo de una actividad biocontroladora observada mediante confrontación *in vitro* se muestra en la figura 1.

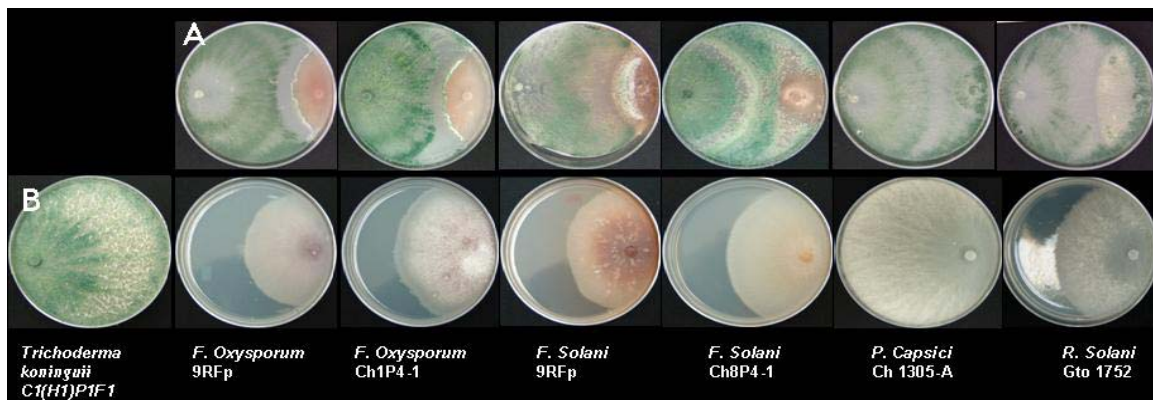


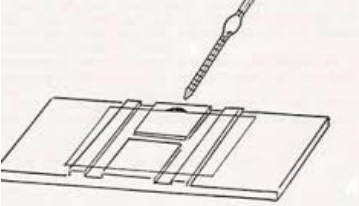
Figura 1. Confrontación *Trichoderma koningii* vs hongos patógenos de plantas. Cultivo dual. Línea A: cepa de *Trichoderma koningii* (lado izquierdo de la caja) confrontada con el hongo patógeno (lado derecho de la caja). Línea B: controles de crecimiento, para *Trichoderma koningii* y para los hongos *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* y el oomiceto *Phytophthora capsici*. Imagen obtenida por Ortega-Amaro 2007.

D.2. Ensayo de germinación *in vitro* y promoción de crecimiento inducido por *Trichoderma* spp.

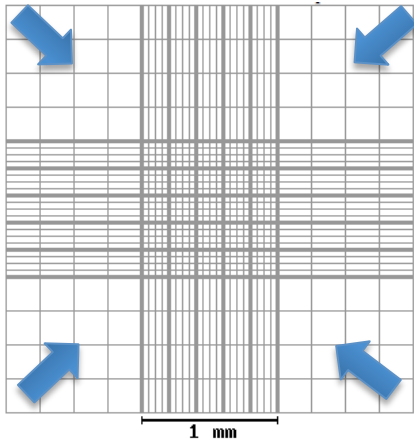
- 1.- Desinfectar superficialmente el material vegetal [semillas de chile (*Capsicum annum*)]. Para ello lave las semillas 4 veces con agua destilada estéril. Agregue etanol al 96% por 1 min (no exceder este tiempo). Lave nuevamente 4 veces con agua destilada estéril. Agregue cloro al 20% durante 5 min. Enseguida, lave 4 veces con agua destilada estéril. **NOTA:** el lavado consiste en poner un volumen de agua, agitar por 2 min, retirar el volumen de agua y repetir nuevamente.
- 2.- Colocar las semillas desinfectadas en el medio de cultivo MS 0.5x (aprox. 30 semillas)

3.- Colectar las esporas de *Trichoderma spp.* a partir de un cultivo en placa (PDA o Sabouraud). Para ello, coloque 1 mL de agua en la placa y colecte las esporas con la micropipeta. Deposite las esporas a un tubo eppendorf.

4.- Cuantifique las esporas de *Trichoderma spp.* en una cámara de Neubauer. Para ello, tome la cámara, coloque el cubreobjetos y con la ayuda de una micropipeta, añada 10 microlitros de esporas en la parte superior (ver figura) y permita que se distribuyan por debajo del cubreobjetos.



5.- Cuente al microscopio el número de esporas presentes en los 4 cuadros grandes de los extremos (superior e inferior, izquierdo y derecho) de la cámara, como se muestra en la siguiente figura.



Cámara de Neubauer.

Área de la cámara en un cuadro grande = 1 mm x 1 mm = 1 mm²; Volúmen = 1 mm² x 1 mm = 1 mm³ = 1 x 10⁻⁴ mL ó 0.0001 mL.

6.- Una vez obtenido el número de esporas en los cuatro grandes. Emplee la siguiente fórmula para calcular la concentración de esporas:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{número de cuadros}}$$

7.- Ajuste la concentración a 1 x 10⁴ esporas/mL

8.- Inocule las semillas con las esporas (aprox. 20 microlitros por semilla). Deje un control sin inocular.

9.- Incube las plantas 1 semana en la cámara de crecimiento.

10.- Al cabo de este tiempo determine: a) el número de semillas germinadas, b) el peso del material vegetal y c) el contenido de clorofila.

D.3. Determinación del contenido de clorofila

El contenido de clorofila (μg clorofila/ g peso fresco) será determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 645 y 663 nm, empleando el método de extracción en acetona al 80% descrito por Arnon (1949). Este método permite determinar la clorofila a, b y total.

Procedimiento:

- a) Macere el material vegetal en un tubo eppendorf con la ayuda de un pistilo en presencia de acetona al 80% (1 mL).
- b) Centrifugue el extracto a una velocidad de 13,000 rpm durante 1 min.
- c) El sobrenadante (libre de partículas suspendidas) se lleva al espectrofotometro para determinar la absorbancia.
- d) Para calcular el contenido de clorofila en las muestra analizadas emplee las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = [(12.7 \times \text{Abs}_{663\text{nm}} - 2.7 \times \text{Abs}_{645\text{nm}}) \times 0.75] / \text{peso de la muestra}$$

$$\text{Clorofila b} = [(22.9 \times \text{Abs}_{645\text{nm}} - 4.7 \times \text{Abs}_{663\text{nm}}) \times 0.75] / \text{peso de la muestra}$$

$$\text{Clorofila total} = [(20.2 \times \text{Abs}_{645\text{nm}} + 8.05 \times \text{Abs}_{663\text{nm}}) \times 0.75] / \text{peso de la muestra}$$

E. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Webster J, Weber RWS. Introduction to Fungi. Third edition. Cambridge University Press, 2007.
- 2.- Arnon DI (1949). Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**:1-15.
- 3.- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* Species - Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts . *Nature Review Microbiology* **2**:43-56.

REPORTE. Práctica 7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE HONGOS AISLADOS EN EL SEMESTRE

Aspecto	Puntaje	Puntaje obtenido
Desempeño durante la práctica	1	
Reporte escrito	9	
Total	10	

Indicaciones para el reporte:

1.- Genere una **Introducción** para su reporte, sustentada en una revisión bibliográfica, citando en el texto las referencias consultadas (1.0 punto)

2.- Observaciones (1.5 puntos)

- a) Haga un dibujo de cada pareja de hongos confrontados y describa sus observaciones.
- b) Describa el efecto de *Trichoderma spp.* sobre la germinación y crecimiento *in vitro* de *Capsicum annuum* (puede incluir dibujos o imágenes del experimento).

3.- Cuestionario

- a) Además de hongos del género *Trichoderma* ¿Qué otros microorganismos tienen actividad biocontroladora? Reporte al menos 3 ejemplos (1.0 punto)
- b) Describa a los hongos nematófagos del género *Gamsylella* y su mecanismo de acción (1.0 punto)
- c) Que información nos puede proporcionar la cuantificación de clorofila en extractos vegetales (1.0 punto)

4.- Resultados (2.0 puntos)

- a) Incluya el cálculo y la concentración de esporas obtenida a partir de la cámara de Neubauer
- b) Incluya los datos de: a) número de semillas germinadas en tratamientos con *Trichoderma* vs. controles, b) el peso del material vegetal y c) el contenido de clorofila. En cada caso, incluya un gráfico que compare el resultado del material tratado y no tratado.

5.- Conclusiones (1.5 puntos)

- a) ¿Qué concluye del ensayo de confrontación *in vitro*? Especifique si alguno de los hongos aislados en el semestre ejerce algún efecto sobre el crecimiento de otros hongos
- b) ¿Qué concluye del ensayo realizado con *Trichoderma* para promover la germinación y crecimiento *in vitro* de semillas de *Capsicum annuum*?