
¿Las Plantas enferman?



Font: https://www.freepik.es/foto-gratis/mujer-sosteniendo-planta-sus-manos_8795303.htm#page=2&query=plantas%20enfermas&position=12&from_view=search&track=ais&uuid=a1f960a1-efbf-41f4-a543-820b9b548f49

guía docente

Estos materiales didácticos son para uso docente y de investigación. Queda prohibida su comercialización o modificación.

1. Introducción

Imagina que te han seleccionado para realizar prácticas este verano en un centro de investigación en el que trabajan en biología y biotecnología vegetal. Acaban de llegar al laboratorio dos muestras de una explotación agrícola de melocotón, el agricultor está preocupado porque algunos de los árboles presentan manchas y anillos en las hojas, además, una de las muestras presenta frutos con anillos depresores y deformaciones externas.



Fuente: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_2007_895_278_284.pdf

1. **¿Por qué es importante saber si las plantas/cosechas están sanas? ¿Es necesario investigar los factores que afectan las cosechas?**

2. **¿Qué podríamos hacer desde la biotecnología para prevenir/contener/luchar contra las enfermedades producidas por virus en las plantas?**

3. **¿Cómo creéis que la relación planta-virus puede resultar útil para la investigación?**

Se propone que en esta primera parte el alumnado, de forma individual tenga dos minutos para pensar en las respuestas a las preguntas formuladas. Pasado este tiempo se propone que se junten en grupos de 5 para hablar de las posibles respuestas. Esta segunda parte puede durar entre 6 y 8 minutos.

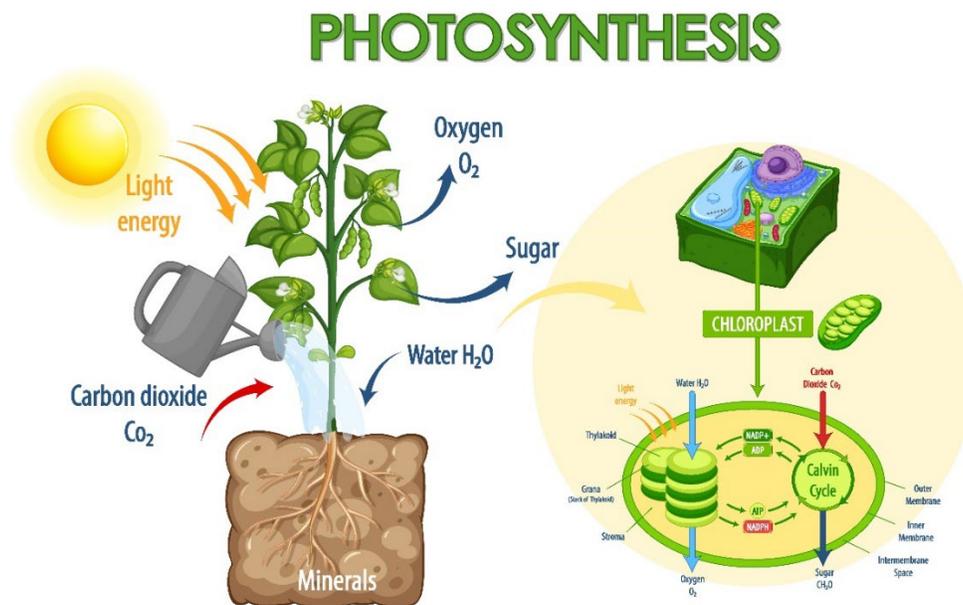
4. ¿Cómo diferenciamos a las plantas del resto de organismos? Por ejemplo, ¿de los animales?

	Animales	Plantas
Modo de obtener energía	<i>HETERÓTROFOS (CONSUMIDORES)</i>	<i>AUTÓTROFOS (PRODUCTORES)</i>
Capacidad de desplazamiento	<i>LOCOMOCIÓN LIBRE</i>	<i>INMÓVILES</i>
Forma de crecimiento	<i>AMPLIAS SUPERFICIES INTERNAS DEJAN DE CRECER</i>	<i>AMPLIAS SUPERFICIES EXTERNAS (CRECIMIENTO CONTINUO)</i>
Sensibilidad	<i>SI</i>	<i>NO (EXCEPTO TACTISMOS Y TROPISMOS)</i>
Pared celular	<i>RARO</i>	<i>COMÚN (CELULOSA)</i>

Las plantas a diferencia de los animales son organismos autótrofos, es decir, productores. Gracias a la luz y agua y elementos que captan por las raíces son capaces de producir su propia energía. La mayoría son inmóviles, es decir, nosotros podemos encontrarnos un lobo en el monte caminando, aparece y se va, sin embargo, las plantas no tienen esa capacidad. No pueden desplazarse. Además, estos organismos crecen ampliamente en superficies externas, se hacen altos y grandes, no como los animales que llega un momento en el que paran de crecer. No tienen la misma sensibilidad que los animales, aunque son capaces de percibir estímulos y reaccionar hacia ellos, en busca de luz por ejemplo; hay otras especies que tienen sensibilidad si les tocas y cierran sus hojas. Y por último y en lo más molecular, tienen pared celular en sus células, además de otros orgánulos que no poseen los animales, (¿por ejemplo? Cloroplastos).

2. Las plantas

Las plantas a diferencia de los animales son organismos autótrofos, es decir, productores. Gracias a la luz y agua y elementos que captan por las raíces son capaces de producir su propia energía. La mayoría son inmóviles, es decir, nosotros podemos encontrarnos un lobo en el monte caminando, aparece y se va, sin embargo, las plantas no tienen esa capacidad. No pueden desplazarse. Además, estos organismos crecen ampliamente en superficies externas, se hacen altos y grandes, no como los animales que llega un momento en el que paran de crecer. En otras palabras, el crecimiento de un animal está limitado por la edad, en cambio, el crecimiento de las plantas es ilimitado.



Fuente: https://www.freepik.es/vector-gratis/diagrama-que-muestra-proceso-fotosintesis-planta_14801378.htm#query=planta%20fotosintesis&position=4&from_view=search&track=ajs

Las plantas no tienen la misma sensibilidad que los animales, sin embargo, si son capaces de percibir estímulos y reaccionar hacia ellos, en busca de luz, por ejemplo; también hay otras especies que tienen sensibilidad si les tocas y cierran sus hojas. Y por último en materia fisiológica, las plantas tienen pared celular en sus células, además de otros orgánulos que no poseen los animales como por ejemplo los cloroplastos.

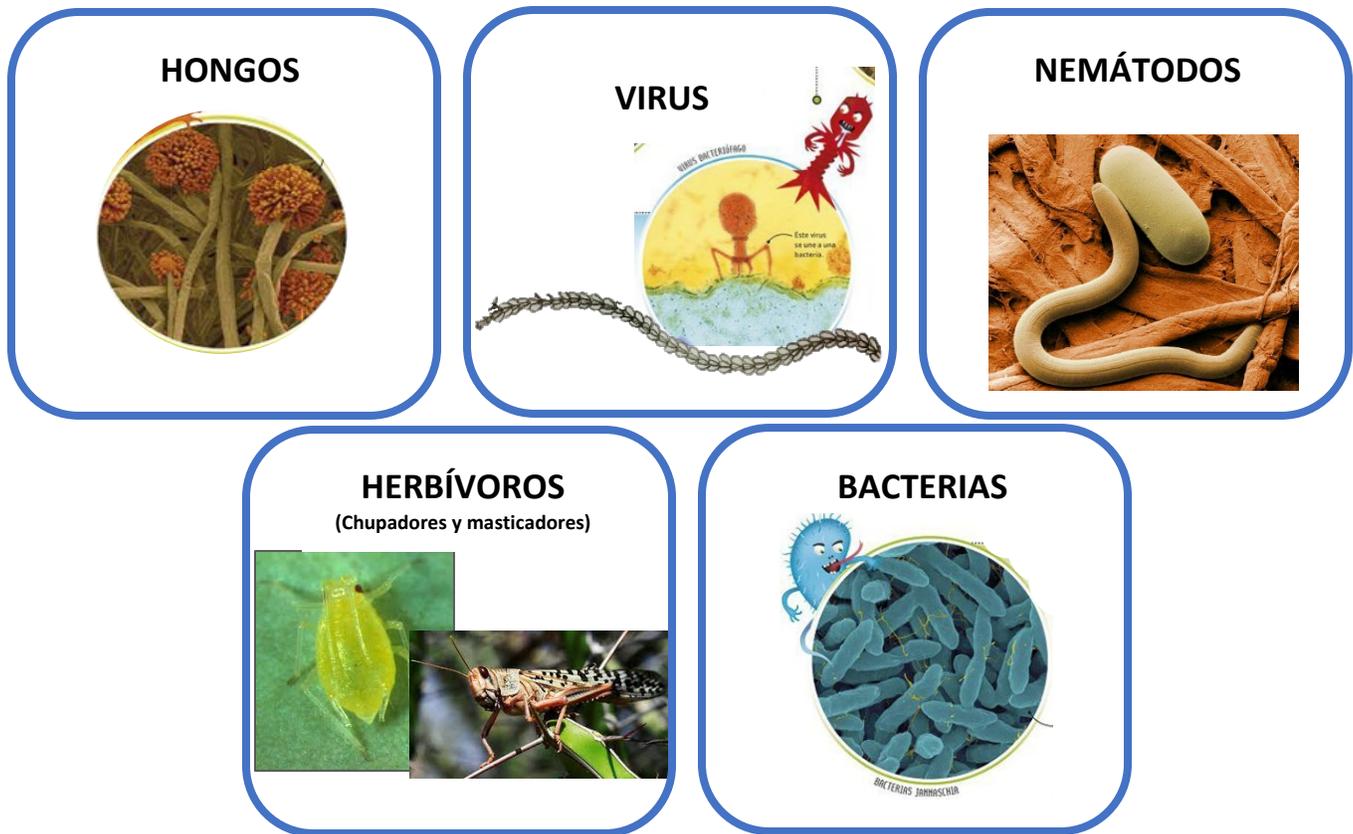
¿Las plantas pueden sufrir estrés?

3. Patógenos

Las plantas pueden sufrir varios tipos de estrés, los cuales dividimos en dos grandes grupos: estrés abiótico, el cual es causado por factores abióticos como el viento, la luz, el alto contenido en sales en el suelo, etc., y el estrés biótico, el cual es provocado por organismos vivos, como los patógenos.

Los patógenos son organismos que, para completar parte o todo su ciclo vital, viven en o sobre una planta, ocasionándole un perjuicio. Si no ocasiona una enfermedad no se considera un organismo patógeno. Existen otras relaciones entre seres vivos y plantas que no son patógenas, como las bacterias con relaciones de simbiosis.

Tipos de patógenos en plantas



Fuentes: <https://es.wikipedia.org/wiki/Nematoda>; https://www.weboryx.com/es/libreria/libros-infantiles-y-juveniles/fauna-y-flora/el-libro-de-las-bacterias-feos-qermenes-virus-malos-y-hongos-chungos?product_id=

4. Los virus

Los virus no se descubrieron hasta finales del siglo XIX. Aunque se sabe que ya en tiempos egipcios había virus, hasta 1899 no se descubrió el primer virus.

¿Sabéis en que organismo se descubrió el primer virus?

Un investigador estaba estudiando una enfermedad que causaba síntomas en las plantas de tabaco. Durante ese año otros investigadores también descubrieron un virus que afectaba a los animales.

¿Son los virus seres vivos?

Los virus son partículas diminutas, infecciosas y acelulares compuestas de material genético, ADN o ARN, rodeados de una cubierta proteica llamada cápside y que únicamente se pueden replicar dentro de una célula hospedadora. Los virus infectan a todo tipo de organismos, desde animales, plantas, bacterias e incluso a otros virus.

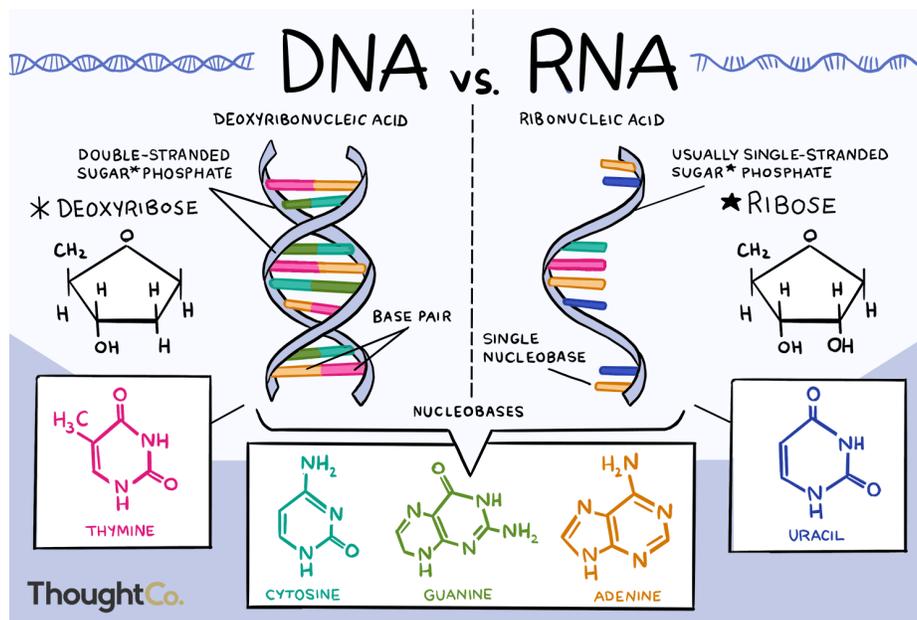
Es decir, los virus no son autosostenibles, necesitan un entorno celular para iniciar sus ciclos de reproducción y evolución: parásitos. Incapaces de perpetuarse en ausencia de un entorno celular. Pasan de un estado inerte potencialmente vivo a un estado vivo cuando infectan una estructura viva.

¿Todos los virus son iguales?

No, todos los virus no son iguales. Hay algunos virus que son capaces de infectar animales, y no todos, solo determinados animales, otros infectan plantas, incluso hay algunos que pueden infectar bacterias. Esto dependerá de su composición genética y proteica. Algunos virus pueden tener como material genético ADN, mientras que otro ARN. También dependerá de su parte externa.

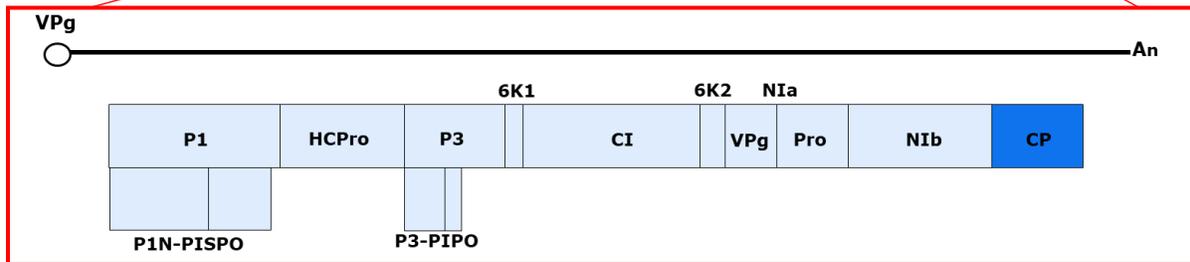
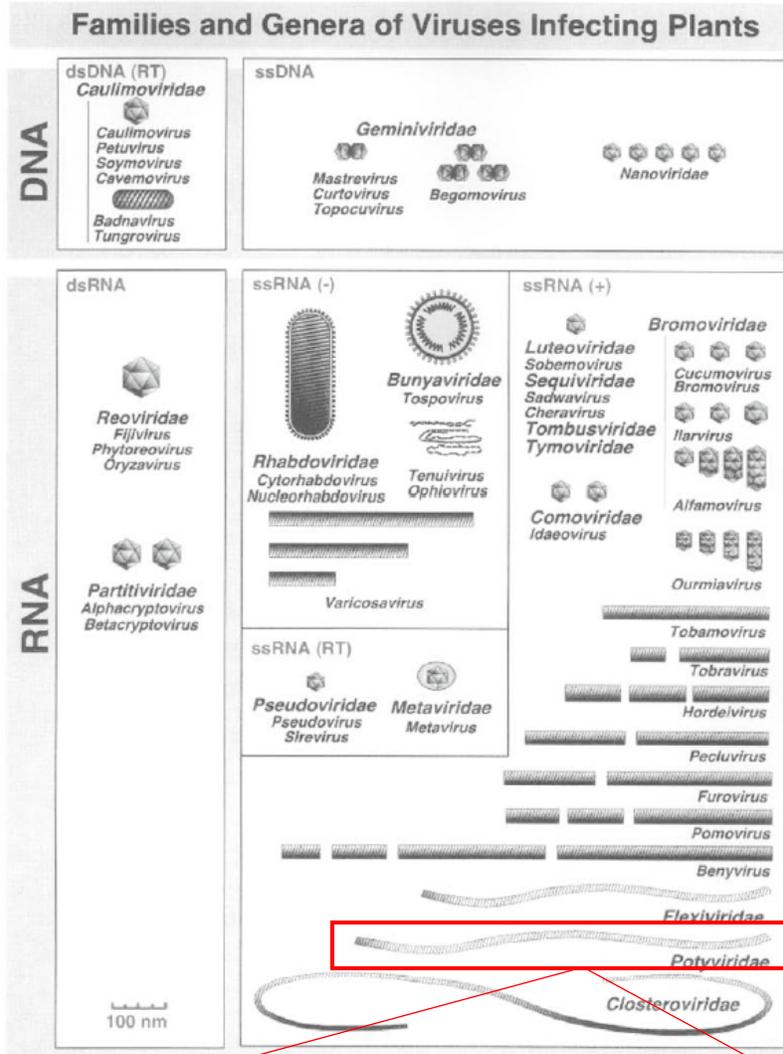
El dogma central de la biología

El ADN se compone de dos cadenas. Cada cadena está formada por ácidos desoxirribonucleicos (azúcares). Dependiendo de la base nitrogenada que tenga este azúcar, podremos encontrar los diferentes nucleótidos: adenina, timina, citosina y guanina. En el caso del ARN, este se compone de una única cadena, el azúcar que encontramos es una ribosa y en lugar de tener timina, el nucleótido que tenemos es uracilo.



Fuentes: Helmenstine, Anne Marie, Ph.D. "The Differences Between DNA and RNA." ThoughtCo, Apr. 5, 2023, [thoughtco.com/dna-versus-rna-608191](https://www.thoughtco.com/dna-versus-rna-608191)

Los virus se pueden clasificar según el componente de material genético (ADN o ARN). En plantas la mayoría son de ARN. Además, en los dos casos puede ser de cadena simple o de doble cadena. Y en el caso de ARN de cadena simple puede ser de polaridad positiva o negativa. Están cubiertos por una proteína (en plantas siempre). Y a veces pueden estar segmentados (varios segmentos de componente genético). El tamaño del genoma suele ser de unas 3-10 kb, más pequeño que el de virus animales.



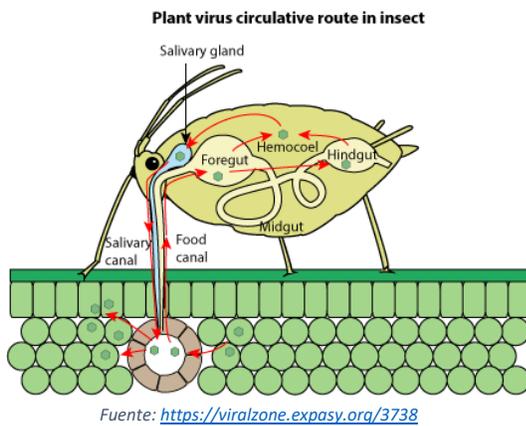
Fuente: Classification of plant viruses. From Virus Taxonomy, 8th Report of the National Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet et al., p. 18, Copyright Elsevier (2005).

Los *potyvirus* son un tipo de virus que pertenecen a la familia *Potyviridae*. Dentro de esta familia podemos encontrar muchos virus que pertenecen a diferentes géneros. Se caracterizan porque tienen una única cadena de ARN positiva, la cual se traduce en una poliproteína que dará lugar a diferentes productos proteicos. Morfológicamente estos virus son flexuosos y filamentosos, y el ARN está encapsidado por la proteína de cubierta o cápside.

¿Cómo se transmiten los virus en plantas?

En el caso de los virus de plantas hay diferentes mecanismos de transmisión: a través de semilla (la planta expulsa semillas que ya llevan el virus), propagación vegetativa (injerto, si unes dos plantas y una está infectada con un virus) transmisión mecánica (daño humano y ambiental, contacto entre dos plantas, con una que tiene zonas donde se ha producido la rotura de la pared vegetal), por vectores (bacterias, hongos, nematodos, artrópodos y principalmente insectos) y por el polen (el vegetal sufre una infección y traslada el virus al polen).

Se considera un vector de transmisión a organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre organismos, en el caso en el que estamos estudiando, entre plantas. El 70% de los virus vegetales están transmitidos por vectores patógenos. Los más comunes son los pulgones y la mosca blanca.



Los pulgones son insectos de uno a dos milímetros de largo; pueden ser de diferentes colores. Se alimentan chupando la savia (floema) de las plantas, pero como carecen de quimiorreceptores externos con funciones gustativas, se ven obligados a probar el contenido celular para discriminar dentro de la planta y localizar el floema. Hay cuatro especies que son capaces de transmitir más de 70 virus.

La transmisión por pulgones puede ser clasificada dependiendo del tiempo de adquisición y retención de los virus.

- No persistente: los virus retenidos por el vector menos de unas pocas horas.
- Semipersistente: los virus retenidos por el vector días y en ocasiones semanas.
- Persistente: los virus son retenidos por el vector de por vida.
 - o Circulativos: el virus debe ser internalizado y transportado a través de múltiples membranas celulares.
 - o Propagativos: el virus se replica en el vector, además de en el huésped (esto añade una amplificación del virus).

Los virus se caracterizan por ser dependientes de sus hospedadores en su ciclo de infección. Son parásitos obligados que necesitan infectar a células huésped para multiplicarse y llevar a cabo su ciclo infeccioso, desde la replicación, encapsulación, movimiento de célula a célula y transporte en larga distancia.

La entrada de viriones en las células de las plantas puede producirse a través de la pared celular mediada por heridas mecánicas en las células epidérmicas, o por insectos, ácaros, nemátodos y hongos que se alimentan de la planta.

Una vez en el interior celular se produce la desencapsidación debido a, entre otros, alteraciones de pH, cambios de Ca^{2+} intracelular que pueden llegar a desestabilizar la cubierta. Los viriones se desamblan para comenzar la replicación y traducción del genoma viral. Después de pasar por el proceso de traducción se obtienen proteínas estructurales como la proteína de cubierta (CP) y otras no estructurales como la replicasa y la proteína de movimiento (MP), además de otras proteínas virales específicas. Todo este proceso está catalizado por el complejo replicativo viral. El transporte posterior del material vírico desde las células inicialmente infectadas a las adyacentes o transporte a corta distancia se produce a través de los plasmodesmos, los cuales requieren ser modificados por parte de las proteínas de movimiento virales. Tras la infección de las células adyacentes, el virus accede al sistema vascular para infectar las partes distales de la planta en lo que se denomina transporte sistémico o a larga distancia. La salida del virus desde los tejidos vasculares da lugar de nuevo a la infección de las células adyacentes al tejido vascular mediante el transporte a corta distancia.

¿Cuáles son los síntomas más comunes por la infección viral en plantas?

Las infecciones virales suelen dar síntomas localizados, para producir infección sistémica deben atravesar barreras tisulares y la infección es de por vida. Sin embargo, rara vez matan a la planta. Incluso a veces los síntomas de virus pueden causar efectos de estrés abiótico.

- Mosaico
- Tumores o agallas
- Enanismo
- Marchitez
- Clorosis
- Anillos cloróticos
- Manchas anulares en las hojas
- Deformaciones en el fruto
- Abarquillamiento de la hoja

En general los virus suelen causar síntomas visibles, sin embargo depende del virus, de su capacidad de infección y del hospedador, puede ocurrir que algunos de los hospedadores no tengan síntomas, se dice entonces que son asintomáticos.

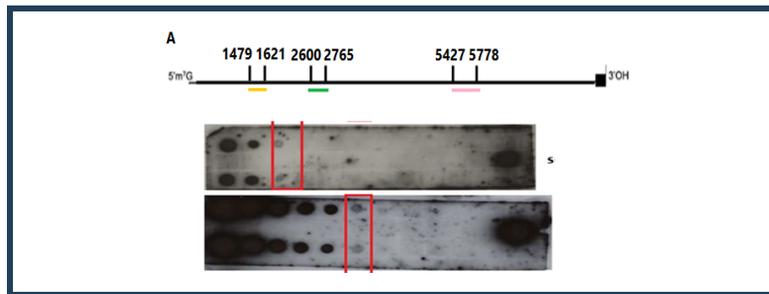
Para los virus vegetales no hay un método de control como tal, no tenemos fungicidas, bactericidas universales. El único control que tenemos es un diagnóstico precoz (método preventivo). Este diagnóstico precoz tiene que estar basado en métodos sensibles, rápidos y económicos.

¿Cuáles son los métodos de detección para virus en plantas?

Para determinar que es por un estrés abiótico y no biótico tenemos que probar a detectar la enfermedad, en este caso los virus. Los métodos de diagnóstico están basados en los dos componentes: componente proteico y genómico.

Algunos ejemplos son:

- **Hibridación molecular (*dot-blot*) y *Tissue printing*** (basado en el dot-blot pero evita el procesamiento de las muestras): estos son métodos de detección específicos, para ello se seleccionan regiones del genoma del virus que queremos detectar y que presentan una mayor especificidad (diferentes de las de otros virus) y se generan in vitro sondas marcadas con dioxigenina (una molécula pequeña con alta antigenicidad). Se pone la sonda en contacto con la muestra (ARN de la planta o *tissue print* con una hoja de la planta) y si esta hibrida, es decir se tiñe, significa que está infectada con el virus.



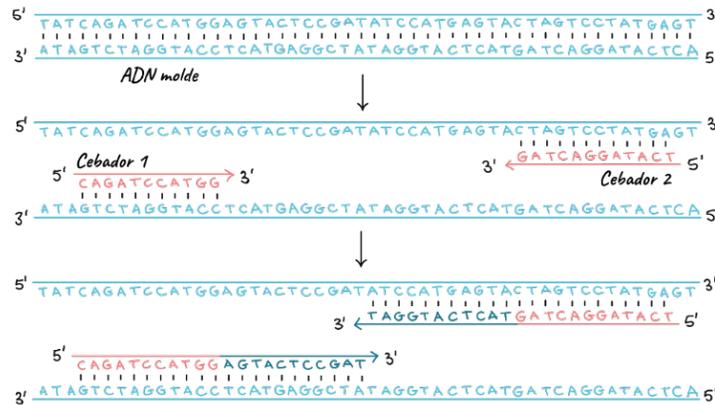
Fuente: propia de Clara Ontañón.

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** la PCR es una técnica básica de biología molecular que permite amplificar (es decir, obtener muchas copias de un fragmento de DNA) a partir de poco material de partida¹. La PCR utiliza unas secuencias cortas de ADN llamados iniciadores o cebadores para seleccionar parte del genoma que se quiere amplificar, y gracias a una polimerasa que trabaja a diferentes temperaturas, esta va copiando la secuencia de ADN comprendida entre los cebadores utilizados. La PCR se lleva a cabo en una máquina conocida como termociclador, que es el encargado de generar los cambios de temperatura necesarios para que se lleve a cabo la PCR. Estos cambios de temperatura producen la desnaturalización del ADN (95°C), cuando las dobles cadenas de ADN se abren quedando en cadenas sencillas. Luego empieza el alineamiento (40-60°C) donde los indicadores se unen a la secuencia de ADN que corresponden, quedando alineados y formando una pequeña región de doble cadena. Posteriormente la polimerasa se une a esta zona formando una pequeña región de doble cadena. Luego la polimerasa se une a esta zona de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3' agregando las bases correspondientes y formándose los puentes de hidrógeno entre ellas, estabilizando la unión. Por último, tenemos la extensión (72°C), donde

¹ Fuente:

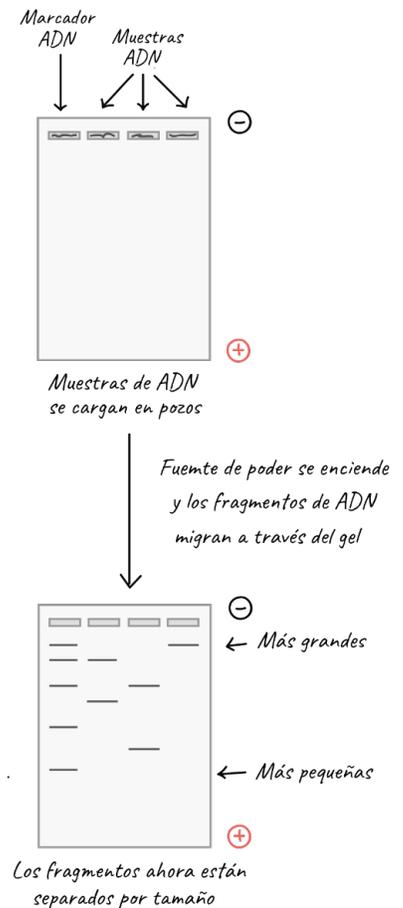
https://transferencia.fundacionrecerca.cat/docs/Gui%C3%B3%20docent%20Diagn%C3%B2stic%20de%20malalties%20gen%C3%A8tiques%20i%20experimentaci%C3%B3%20animal%20v6_es.pdf

la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los iniciadores que se habían alineado, previamente. El resultado de la PCR lo podemos ver mediante una técnica que llamamos electroforesis en gel de agarosa.

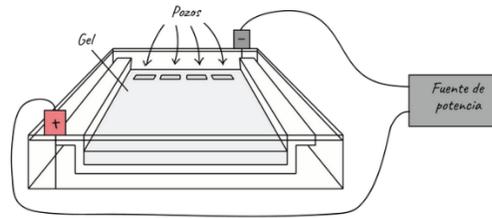


Fuente: <https://es.khanacademy.org/science/op-biology/a/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

- La RT-PCR: la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una variante de PCR. En la RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en un PCR tradicional. La amplificación exponencial mediante PCR en Transcripción Reversa supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Los principales usos de la RT-PCR están relacionados con el campo del Diagnóstico Molecular y con la investigación científica.
- **Electroforesis:** significa “movimiento por electricidad” y se trata de una técnica de biología molecular que permite separar los fragmentos de DNA por tamaño gracias a una matriz sólida formada por agarosa (polisacárido formado por repetidas unidades de agarosa). Al aplicar una corriente eléctrica sobre el gel, que se encuentra inmerso en un tampón conductor de electricidad, los fragmentos de DNA (cargados negativamente) se moverán hacia el polo positivo o ánodo. El gel sirve como matriz por donde el DNA viaja de forma inversamente proporcional a su tamaño: los fragmentos de mayor tamaño encuentran más dificultades para moverse por los agujeros de la matriz y por tanto, avanzan más hacia el ánodo. Para entendernos, imaginamos la siguiente situación: cogemos todas las sillas y mesas de la clase y las distribuimos aleatoriamente por el aula, muy juntas. Si un alumno



quiere cruzar la clase de punta a punta atravesando el mobiliario, lo tendrá mucho más fácil yendo solo que en grupo con más compañeros cogidos de la mano.



Fuente: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>

Aplicaciones biotecnológicas

La investigación para conocer mejor los virus, sus hospedadores y las enfermedades que pueden transmitir también ha permitido obtener aplicaciones biotecnológicas en otros campos:

- Generación de vectores virales para la expresión de productos de interés, como proteínas recombinantes, antivirales y otros.
- Producción de Virus Like-Particles (VLPs) y contribución de estas en diferentes ámbitos como la generación de vacunas.
- Control del movimiento y transmisión de virus en plantas.

5. Taller práctico

Te encargan procesar y analizar las muestras mandadas por el agricultor. Primero sacas las hojas de la bolsa de muestras y observas algunos insectos encima.

Actividad 1. Reconocimiento de plantas sanas vs enfermas

Muestra 1²		
Muestra 2³		

Nuestro primer objetivo va a ser clasificar las distintas muestras vegetales, frutos y hojas, que nos ha enviado el agricultor en la tabla según el síntoma que presenten. Para eso usaremos la tabla que encontraremos a continuación donde escribiremos "SI" o "NO" dependiendo de si las muestras presentan los síntomas de cada fila.

Síntomas	Muestra 1	Muestra 2
Mosaico	NO	NO
Manchas anulares en las hojas	SÍ	NO
Enanismo	NO	NO
Tumores o agallas	NO	NO

² Fuente: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_2007_895_278_284.pdf

³ Fuente: <https://certisbelchim.es/las-principales-enfermedades-del-melocotonero-y-como-tratarlas-certis-belchim/>

Anillos cloróticos	SÍ (FRUTO)	SÍ (HOJA)
Clorosis	NO	NO
Deformación en el fruto	SÍ	NO
Abarquillamiento de la hoja	NO	NO

Actividad 2. Recogida y observación de pulgones en lupa

Como se ha comentado anteriormente, algunos insectos actúan como vectores de diferentes virus. Los pulgones son insectos muy interesantes en la dispersión de los virus. Estos insectos muchas veces tienen capacidad de alimentarse de varios cultivos, son polívoros, lo que hace que puedan transmitir virus a diferentes plantas (por ejemplo, el pulgón negro de la faba, *Aphis fabae*).² Sin embargo, a veces también algunos pulgones son muy específicos: viven solamente sobre un cultivo (por ejemplo, el pulgón amarillo de la adelfa, *Aphis nerii*).

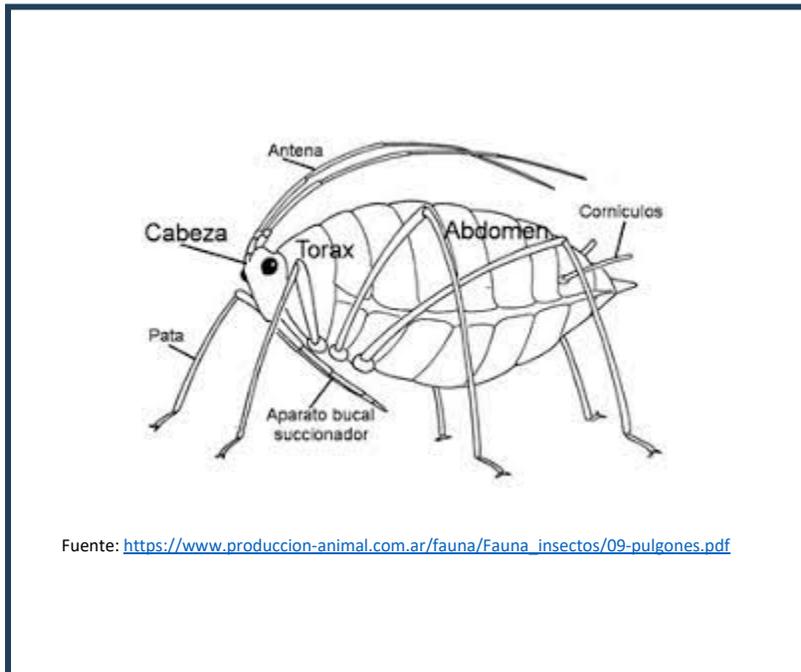
Los síntomas y daños más comunes que podemos observar en las plantas infectadas son:²

- Colonias de pequeños insectos amarillos, verdosos u oscuros.
- Debilitamiento de la planta, deformaciones y curvaturas en hojas.
- Disminución del desarrollo vegetativo de la planta en comparación con otras plantas de la misma variedad y similar fecha de plantación.
- Hojas y frutos pegajosos por la melaza que puede generar la colonización de hongos.
- Presencia de hormigas atraídas por la melaza.
- Transmisión de virus vegetales.
- Depreciación comercial o pérdidas de producción.



Foto 1. Vainas de habas cubiertas de pulgón. Fuente: <https://www.cocopot.es/blog/plagas-y-enfermedades/guia-completa-de-los-pulgones-que-son-y-como-se-comportan-sintomas-y-danos-medidas-preventivas-tratamientos-y-control-biologico>

Nuestro segundo objetivo va a ser observar y dibujar las partes de este vector, pulgón, poniendo mayor interés en el reconocimiento del aparato bucal succionador, que es por donde pueden adquirir los virus de las plantas.



- Cabeza: antenas, ojos y aparato bucal succionador.
- Tórax: patas.
- Abdomen: Sifúnculo y cauda, alas (dependiendo de algunos factores).

Actividad 3. Análisis de la presencia de virus

Los virus que pueden afectar a los frutales de hueso pertenecen básicamente a cuatro familias: *Potyvirus*, *Ilavirus*, y *Closterovirus* y *Nepovirus*. Dentro de ellas uno de los más importantes es el *Plum pox virus*, PPV. Una de las enfermedades virales más preocupantes para la producción de melocotón es la enfermedad de la Sharka. La Sharka es una enfermedad de frutales de hueso causada por el virus PPV, el único virus de frutales de hueso que se dispersa de forma natural por pulgones.

Existen varias cepas de este virus, pero los dos aislados principales que afectan al melocotonero son: el aislado Dideron (PPV-D) o común y el aislado Marcus o (PPV-M). Este último resulta especialmente agresivo, con una sintomatología que va desde manchas, anillos y clorosis en nervios de hojas, hasta los anillos depresores y deformaciones externas en los frutos, que suelen caer antes de la madurez. Además, los pétalos de algunas variedades muestran típicos síntomas de decoloración.⁴

A diferencia de lo que ocurre con hongos y bacterias, los virus no se pueden eliminar mediante la aplicación de productos químicos.

1. **¿Cómo podemos determinar si el virus está presente en las muestras que nos ha enviado el agricultor? ¿Qué técnica podríamos usar para determinarlo?**

Para poder ayudar al agricultor que nos ha proporcionado las muestras, necesitaremos determinar que virus (en el caso de ser una enfermedad vírica) se encuentra presente en las muestras que nos ha enviado. Para hacerlo usaremos la técnica PCR, que como hemos dicho amplifica fragmentos del ADN.

2. **¿Qué información necesitamos del virus para poder proceder con el análisis que proponéis?**

Para analizar las muestras a través de la PCR primero debemos saber que parte del genoma del virus vamos a amplificar, es decir los sitios específicos de unión de cebadores para este virus.

3. **En caso de que el virus este presente en las muestras que nos han enviado, ¿cómo creéis que podremos evitar la dispersión del virus hacia las plantas sanas?**

⁴ Fuente: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_2007_895_278_284.pdf

El control se basa en la prevención, erradicando (arrancando, quemando) las plantas contaminadas para evitar la dispersión hacia las plantas sanas⁵.

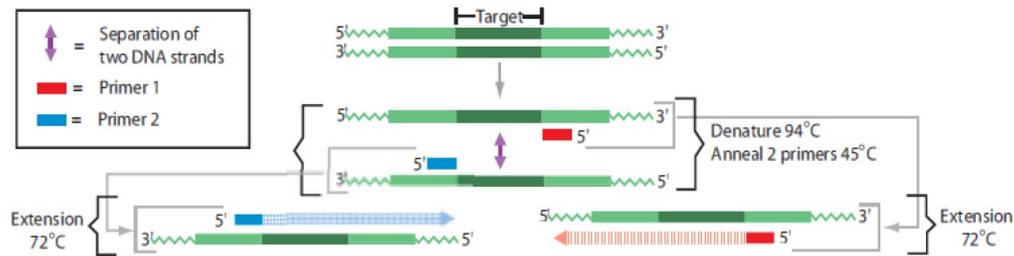
- 4. ¿Según los síntomas que hemos observado en las muestras de cuál de los dos aislados de PPV se puede tratar?**

Según los síntomas se trataría del aislado más agresivo, el aislado Marcus o (PPV-M), sin embargo siempre es necesaria la confirmación mediante técnicas moleculares o al menos inmunológicas.

⁵ Fuente: https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/12786/INTA_CIAP_InstitutodePatolog%c3%adaVegetal_Rossini_M_Deteccion_precoz_de-Sharka.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Protocolo: Detección del PPV-M por RT-PCR⁶

El PPV es un virus de ARN, es por eso que necesitamos utilizar la RT-PCR. En la primera etapa pasaremos nuestra muestra de ARN a ADNc mediante una enzima llamada transcriptasa inversa, que realiza el proceso de retrotranscripción. Una vez tenemos el ADNc, es necesaria la amplificación por PCR. Esta reacción utiliza un enzima conocido como Taq polimerasa, la cual fue originalmente purificada de una bacteria que habita en lugares a altas temperaturas (cercas a ebullición). La reacción de PCR incluye 2 oligonucleótidos sintéticos (15-30 nucleótidos), conocidos como “primers” o cebadores, la Taq, nucleótidos y el ADN extraído, conocido como “template” (molde). La región de ADN a amplificar se llama “target” (diana). En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizadas) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, posteriormente disminuye a una temperatura de entre 40-65°C que permite la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.



Fuente: <https://www.bioted.es/protocolos/DETECCION-VIH-RT-PCR.pdf>

Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces.

En el caso del PPV-D i PPV-M, la literatura⁷ indica que una buena ubicación para generar los diferentes cebadores en los sitios de unión son los siguientes:

⁶ Protocolo adaptado del protocolo DETECCION-VIH-RT-PCR de BIOTED: <https://www.bioted.es/protocolos/DETECCION-VIH-RT-PCR.pdf>
⁷ http://www.elis.sk/download_file.php?product_id=65&session_id=8fjp0s61bp94h4n39n2oi66gv6

<p>PPV-D: BOJ-3</p> <p> Cebador 1 mD5: 5'-TATGTCACATAAAGGCGTTCTC-3'</p> <p> Cebador 2 mD3: 5'-GACGTCCCTGTCTCTGTTG-3'</p>	<p>PPV-M: CAH-2</p> <p> Cebador 1 mM5: 5'-GCTACAAAGAACTGCTGAGAG-3'</p> <p> Cebador 2 mM3: 5'-CATTTCCATAAACTCCAAAAGAC-3'</p>
---	--

Materiales necesarios

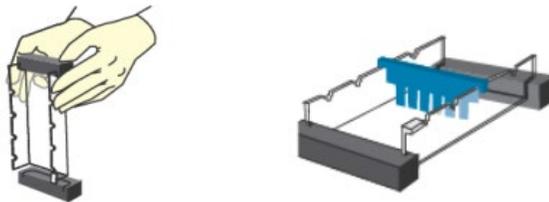
- Kit de detección de [VIH por RT-PCR](#): el kit contiene muestras, TAE 10X, agarosa, micropipeta y puntas.
- Microondas o placa calefactora.
- Sistema de electroforesis horizontal.
- Balanza

Protocolo

1. Preparación del gel de agarosa

a. Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar el peine para formar los pocillos.



b. Preparación del gel de agarosa

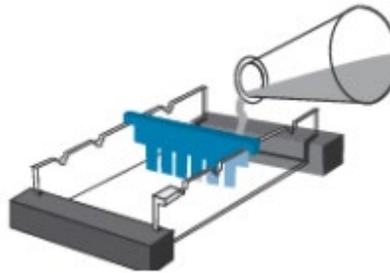
- Utilizar un vaso o Erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel.
- Para geles de 7 x 7 cm: Añadir 32 ml de Tampón de electroforesis 1 X más 0.30 gr de agarosa, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa. Para geles de 7 x 10 cm: Añadir 42 ml de Tampón de electroforesis 1 X más 0.40 gr de agarosa, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X.

- Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse una placa calefactora, en ambos casos, para que la

agarosa se disuelva se ha de llevar la solución a punto de ebullición. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

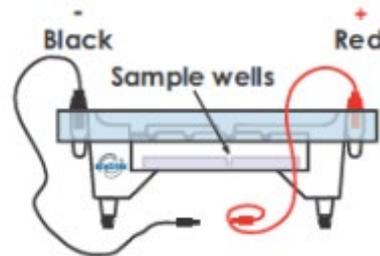
- Enfriar la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.
- Añadir la solución de agarosa al molde.



- Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera (si la electroforesis se realizase al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

c. Preparación del gel para la electroforesis

- Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topes.
- Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los pocillos más cerca del polo negativo (color negro).



- Llenar la cámara de electroforesis con 300 ml de Tampón de electroforesis.
- Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.
- Sacar el peine que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.
- Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

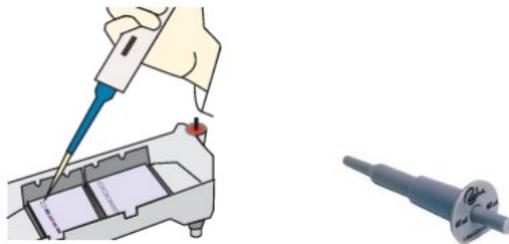
2. Siembra de gel y electroforesis

Nota: si no estás familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

- Muestras de electroforesis: Asegurarse de que toda la cantidad de la muestra está en el fondo del tubo, a veces algunas gotas pueden quedarse en las paredes de este. Para esto podemos centrifugar brevemente los tubos con la muestra en el interior.
- Se suministran 4 muestras diferentes presentadas en 4 tubos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras según el siguiente orden:

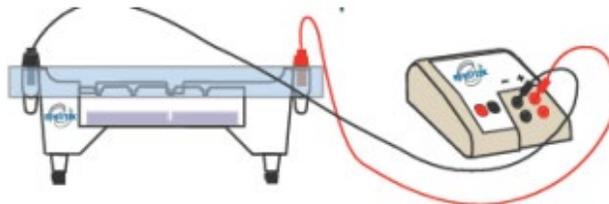
Pocillo	Muestra	Descripción
1	VERDE	Marcador
2	ROJO	Control positivo
3	LILA	Muestra 1 (melocotonero infectado)
4	AZUL	Muestra 2 (melocotonero sano)

- Sembrar 20 microlitos de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta (cada muestra lleva una punta de pipeta diferente, esto evita contaminaciones).



a. Llevar a cabo la electroforesis

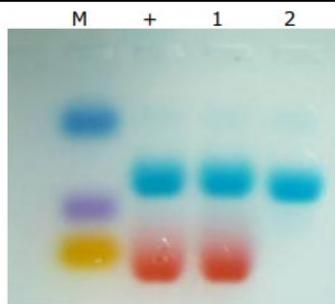
- Después que se han cargado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.
- Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva).



- Configurar la fuente de corriente a 75 voltios (30 minutos o a 150 voltios (20 minutos). Vigilar que los colorantes no salgan del gel.
- Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.
- Después de que la electroforesis ha terminado, apagar la fuente de corriente, desconectar los cables y sacar la cubierta.
- Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse).

6. Interpretación de los resultados

Dibuja o pega una fotografía de los resultados que habéis obtenido.



M: El marcador de peso molecular tiene 3 fragmentos (750 pb que corresponde con la banda azul oscuro, 450 pb que se corresponde con la banda morada, 300 pb que se corresponde con la banda amarilla).

+: Control positivo, sirve para controlar que la reacción de PCR funciona.

Muestra 1: Bandas 297 y 499 pb.

Muestra 2: Banda de 499 pb.

¿El PPV-M, es un virus de ADN o ARN?

El PPV-M es un virus de ARN.

1. ¿Para qué sirve el Control + de la PCR?

En todas las PCR es necesario incluir un Control +, esto sirve para estar seguros de nuestro resultado. Si el Control + no sale bien, significa que no podemos fiarnos de los resultados obtenidos ya que ni si quiera la muestra que debe salir correcta es así.

2. ¿Qué nos indica a presencia de una banda de 499 pb en todas las reacciones?

Nos indica que en todos los casos la reacción de la PCR ha funcionado, esto es muy importante en aquellos casos que no se observa la banda de 297 pb, de esta forma se descartan falsos negativos, la banda del PPV-M no se ha amplificado, pero si la de control de la PCR.

3. ¿Hay algún positivo en PPV-M entre las dos muestras que nos ha mandado el agricultor?

Sí, la Muestra 1 indica un individuo positivo en PPV-M.