
Les plantes emmalalteixen?



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

Fitxa estudiant

Aquests materials didàctics són per a ús docent i de recerca. Queda prohibida la seva comercialització o modificació.

1. Introducció

Imagina que t'han seleccionat per realitzar pràctiques aquest estiu en un centre de recerca en el qual treballen en biologia i biotecnologia vegetal. Acaben d'arribar al laboratori dues mostres d'una explotació agrícola de préssec, l'agricultor està preocupat perquè alguns dels arbres presenten taques i anells a les fulles, a més, una de les mostres presenta fruits amb anells depressors i deformacions externes.



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

Per què és important saber si les plantes/collites estan sanes? Cal investigar els factors que afecten les collites?

Què podríem fer des de la biotecnologia per prevenir/contenir/lluitar contra les malalties produïdes per virus a les plantes?

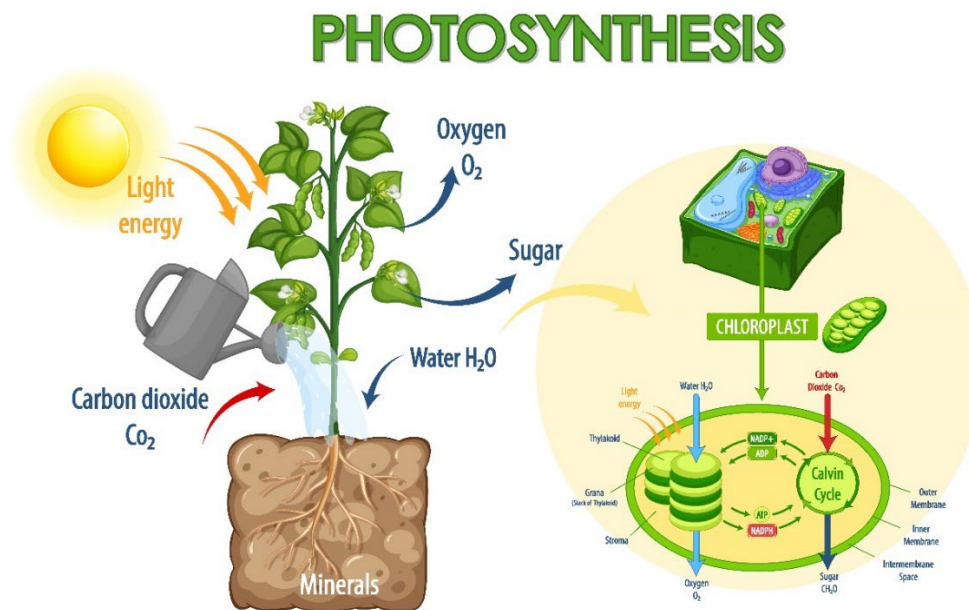
Com creieu que la relació planta-virus pot resultar útil per a la investigació?

Com diferenciem les plantes de la resta d'organismes, per exemple, dels animals?

	Animals	Plantes
Mode d'obtenir energia		
Capacitat de desplaçament		
Forma de creixement		
Sensibilitat		
Paret cel·lular		

2. Les plantes

Les plantes a diferència dels animals són organismes autòtrofs, és a dir, productors. Gràcies a la llum i aigua i elements que capten per les arrels són capaços de produir la seva pròpia energia. La majoria són immòbils, és a dir, nosaltres podem trobar-nos un llop al mont caminant, apareix i se'n va, però, les plantes no tenen aquesta capacitat. No poden desplaçar-se. A més, aquests organismes creixen àmpliament a superfícies externes, es fan alts i grans, no com els animals que arriba un moment en què paren de créixer. En altres paraules, el creixement d'un animal està limitat per l'edat, en canvi, el creixement de les plantes és il·limitat.



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

Les plantes no tenen la mateixa sensibilitat que els animals, però, sí són capaços de percebre estímuls i reaccionar cap a ells, a la recerca de llum, per exemple; també hi ha altres espècies que tenen sensibilitat si els toques i tanquen les seves fulles. I finalment en matèria fisiològica, les plantes tenen paret cel·lular en les seves cèl·lules, a més d'altres orgànuls que no posseeixen els animals com per exemple els cloroplasts.

Les plantes poden patir estrès?

3. Patògens

Les plantes poden patir diversos tipus d'estrès, els quals dividim en dos grans grups: estrès abiòtic, el qual és causat per factors abiòtics com el vent, la llum, l'alt contingut en sals a terra, etc., i l'estrès biòtic, el qual és provocat per organismes vius, com els patògens.

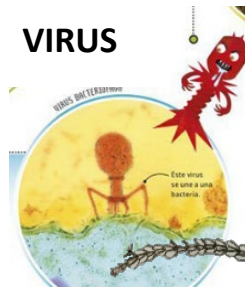
Els patògens són organismes que, per completar part o tot el seu cicle vital, viuen en o sobre una planta, ocasionant-li un perjudici. Si no ocasiona una malaltia no es considera un organisme patògen. Hi ha altres relacions entre éssers vius i plantes que no són patogèniques, com els bacteris amb relacions de simbiosi.

Tipus de patògens en plantes

FONGS



VIRUS

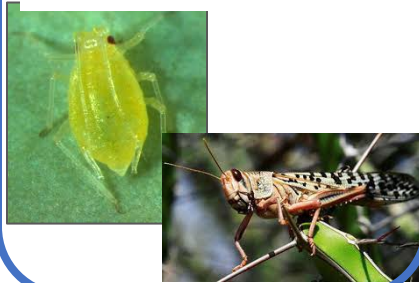


NEMATODES

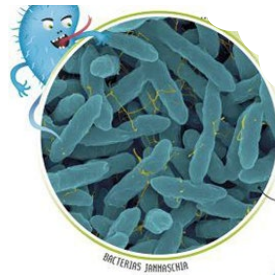


HERBÍVORS

(Xupadors i mastegadors)



BACTERIS



Fonts: <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-germenes-virus-malos-y-hongos-chungos?product_id=

4. Els virus

Els virus no es van descobrir fins a finals del segle XIX. Tot i que se sap que ja en temps egipcis hi havia virus, fins al 1899 no es va descobrir el primer virus.

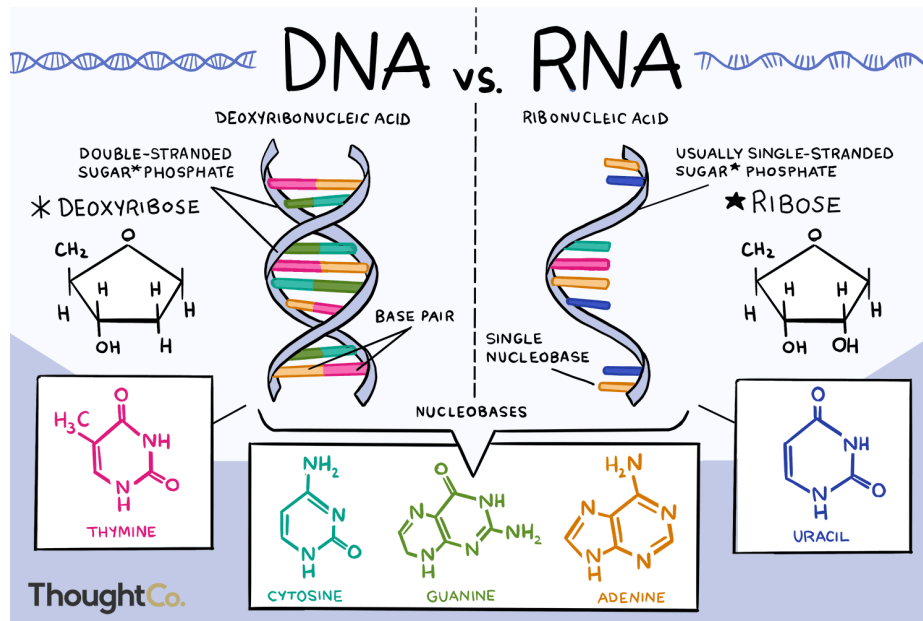
Sabeu en quin organisme es va descobrir el primer virus?

Són els virus éssers vius?

Tots els virus són iguals?

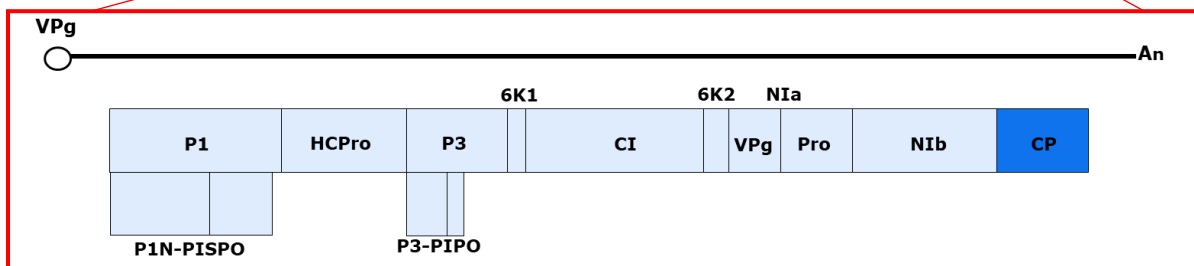
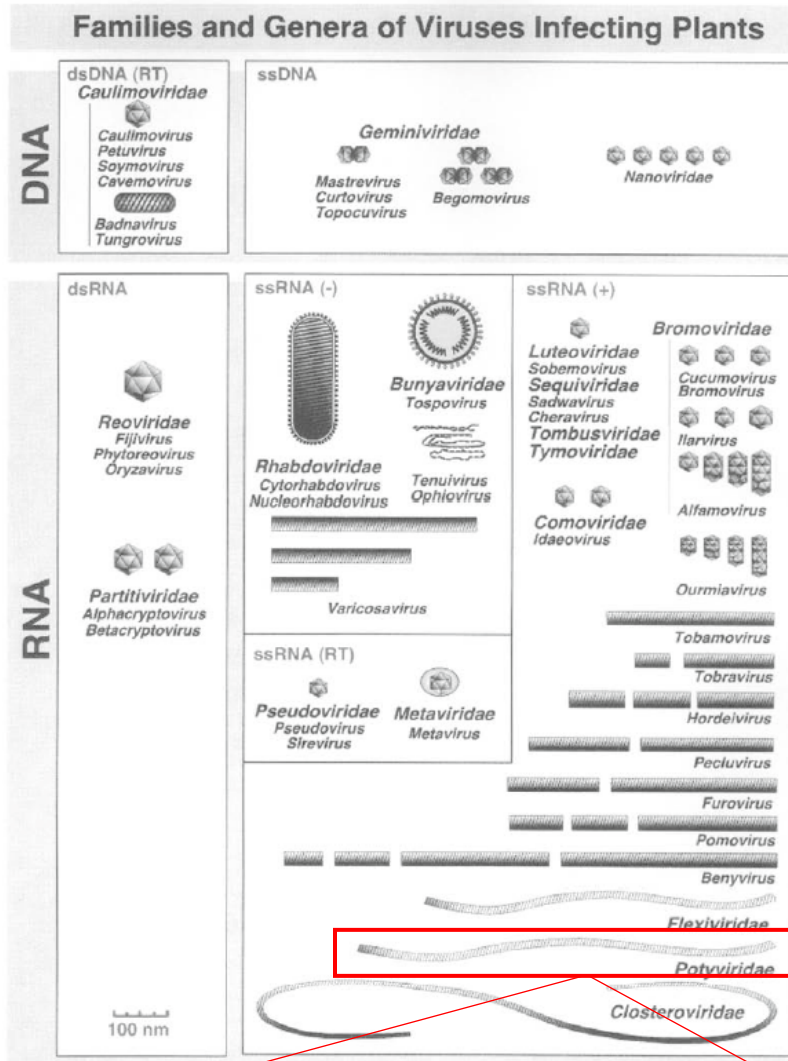
El dogma central de la biologia

L'ADN es compon de dues cadenes. Cada cadena està formada per àcids desoxiribonucleics (sucres). Depenent de la base nitrogenada que tingui aquest sucre, podem trobar-hi els diferents nucleòtids: adenina, timina, citosina i guanina. En el cas de l'ARN, aquest es compon d'una única cadena, el sucre que trobem és una ribosa i en lloc de tenir timina, el nucleòtid que tenim és uracil.



Fonts: 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)

Els virus es poden classificar segons el component de material genètic (ADN o ARN). En plantes la majoria són d'ARN. A més, en tots dos casos pot ser de cadena simple o de doble cadena. I en el cas d'ARN de cadena simple pot ser de polaritat positiva o negativa. Estan coberts per una proteïna (en plantes, sempre). I de vegades poden estar segmentats (diversos segments de component genètic). La mida del genoma sol ser d'unes 3-10 kb, més petit que el de virus animals.



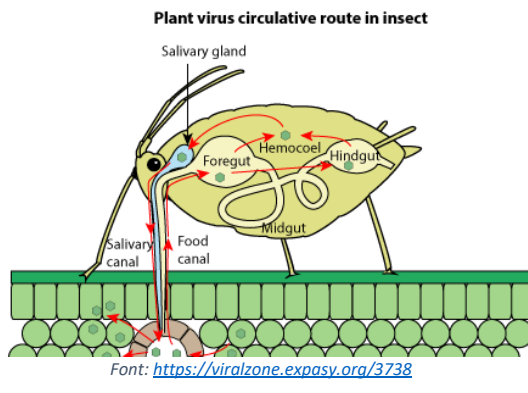
Font: Classification of plant viruses. From Virus Taxonomy, 8th Report of the National Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet et al., p. 18, Copyright Elsevier (2005).

Els *potyvirus* són un tipus de virus que pertanyen a la família *Potyviridae*. Dins d'aquesta família podem trobar molts virus que pertanyen a diferents gèneres. Es caracteritzen perquè tenen una única cadena d'ARN positiva, la qual es tradueix en una poliproteïna que donarà lloc a diferents productes proteïcs. Morfològicament aquests virus són flexuosos i filamentosos, i l'ARN està encapsidat per la proteïna de coberta o càpside.

Com es transmeten els virus en plantes?

En el cas dels virus de plantes hi ha diferents mecanismes de transmissió: a través de llavor (la planta expulsa llavors que porten el virus ja), propagació vegetativa (empelt, si hi ha dues plantes i una està infectada amb un virus) transmissió mecànica (dany humà i ambiental, contacte entre dues plantes, amb una que té zones on s'ha produït el trencament de la paret vegetal), per vectors (bacteris, fongs, nematodes, artròpodes i principalment insectes) i pel pol·len (el vegetal pateix una infecció i trasllada el virus al pol·len).

Es considera un vector de transmissió a organismes vius que poden transmetre malalties infeccioses entre organismes, en el cas en què estem estudiant, entre plantes. El 70% dels virus vegetals estan transmesos per vectors patògens. Els més comuns són els pugons i la mosca blanca.



Els pugons són insectes d'un a dos mil·límetres de llarg; poden ser de diferents colors. S'alimenten xuclant la saba (floema) de les plantes, però com que no tenen quimiorceptors externs amb funcions gustatives, es veuen obligats a provar el contingut cel·lular per discriminar dins la planta i localitzar el floema. Hi ha quatre espècies que són capaces de transmetre més de 70 virus.

La transmissió per pugons pot ser classificada depenent del temps d'adquisició i retenció dels virus.

- No persistent: els virus retinguts pel vector menys d'unes poques hores.
- Semipersistent: els virus retinguts pel vector dies i en ocasions setmanes.
- Persistent: els virus són retinguts pel vector de per vida.
 - o Circulatiu: el virus ha de ser internalitzat i transportat a través de múltiples membranes cel·lulars.
 - o Propagatiu: el virus es replica el vector, a més de en l'hoste (això hi afegeix una amplificació del virus).

Els virus es caracteritzen per ser dependents dels seus hostatgers en el seu cicle d'infecció. Són paràsits obligats que necessiten infectar cèl·lules hoste per multiplicar-se i dur a terme el seu cicle infectiu, des de la replicació, encapsulació, moviment de cèl·lula a cèl·lula i transport en llarga distància.

L'entrada de virions a les cèl·lules de les plantes es pot produir a través de la paret cel·lular mediada per ferides mecàniques a les cèl·lules epidèrmiques, o per insectes, àcars, nematodes i fongs que s'alimenten de la planta.

Una vegada a l'interior cel·lular es produeix la desencapsidació per, entre d'altres, alteracions de pH, canvis de Ca^{2+} intracel·lular que poden arribar a desestabilitzar la coberta. Els virions es desmoblen per començar la replicació i traducció del genoma viral. Després de passar pel procés de traducció s'obtenen proteïnes estructurals com ara la proteïna de coberta (CP) i d'altres no estructurals com la replicasa i la proteïna de moviment (MP), a més d'altres proteïnes virals específiques. Tot aquest procés està catalitzat pel complex replicatiu viral. El transport posterior del material víric des de les cèl·lules inicialment infectades a les adjacents o transport a curta distància es produeix a través dels plasmodesmes, els quals requereixen ser modificats per part de les proteïnes de moviment virals. Després de la infecció de les cèl·lules adjacents, el virus accedeix al sistema vascular per infectar les parts distals de la planta en el que s'anomena transport sistèmic o a llarga distància. La sortida del virus des dels teixits vasculars dona lloc de nou a la infecció de les cèl·lules adjacents al teixit vascular mitjançant el transport a curta distància.

Quins són els símptomes més comuns per la infecció viral en plantes?

Les infeccions virals solen donar símptomes localitzats, per produir infecció sistèmica han de travessar barreres tissulars i la infecció és de per vida. No obstant això, rara vegada maten la planta. Fins i tot de vegades els símptomes de virus poden causar efectes d'estrès abiòtic.

- Mosaic
- Tumors o agalles
- Nanisme
- Mustiesa
- Clorosi
- Anells cloròtics
- Taques anul·lars a les fulles
- Deformacions en el fruit
- Curvatura de la fulla

En general els virus solen causar símptomes visibles, però depèn del virus, de la seva capacitat d'infecció i de l'hostatger, pot ocórrer que alguns dels hostatgers no tinguin símptomes, es diu llavors que són asimptomàtics.

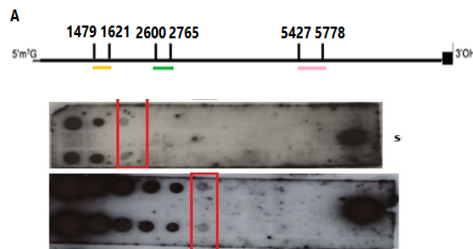
Per als virus vegetals no hi ha un mètode de control com a tal, no tenim fungicides, bactericides universals. L'únic control que tenim és un diagnòstic precoç (mètode preventiu). Aquest diagnòstic precoç ha d'estar basat en mètodes sensibles, ràpids i econòmics.

Quins són els mètodes de detecció per a virus en plantes?

Per determinar que és per un estrès abiòtic i no biòtic hem de provar de detectar la malaltia, en aquest cas els virus. Els mètodes de diagnòstic estan basats en els dos components: component proteic i genòmic.

Alguns exemples són:

- **Hibridació molecular (*dot-blot*) i Tissue printing** (basat en el *dot-blot* però evita el processament de les mostres): aquests són mètodes de detecció específics, per això se seleccionen regions del genoma del virus que volem detectar i que presenten una major especificitat (diferents de les d'altres virus) i es generen in vitro sondes marcades amb dioxigenina (una molècula petita amb alta antigenicitat). Es posa la sonda en contacte amb la mostra (ARN de la planta o *tissue print* amb una fulla de la planta) i si aquesta hibrida, és a dir es tenyeix, significa que està infectada amb el virus.



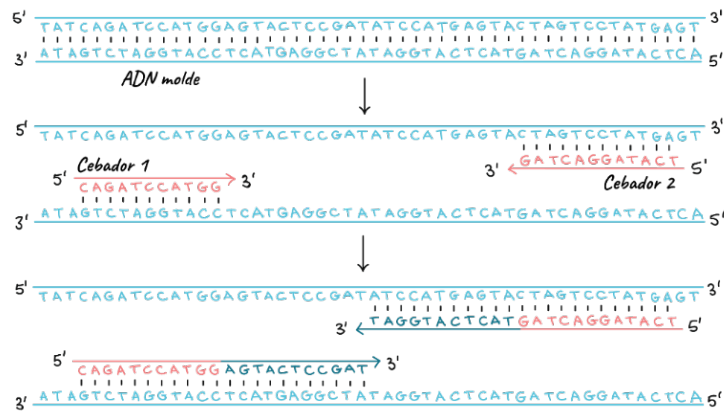
Font: propia de Clara Ontañón.

- **Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR):** la PCR és una tècnica bàsica de biologia molecular que permet amplificar (és a dir, obtenir moltes còpies d'un fragment de DNA) a partir de poc material de partida.¹ La PCR utilitza unes seqüències curtes d'ADN anomenats iniciadors o encebadors per seleccionar part del genoma que es vol amplificar, i gràcies a una polimerasa que treballa a diferents temperatures, aquesta va copiant la seqüència d'ADN compresa entre els encebadors utilitzats. La PCR es duu a terme en una màquina coneguda com a termociclador, que és l'encarregat de generar els canvis de temperatura necessaris perquè es dugui a terme la PCR. Aquests canvis de temperatura produeixen la desnaturalització de l'ADN (95°C), quan les dobles cadenes d'ADN s'obren quedant en cadenes senzilles. Després comença l'alineament (40-60°C) on els indicadors s'uneixen a la seqüència d'ADN que corresponen, quedant alineats i formant una petita regió de doble cadena. Posteriorment la polimerasa s'uneix en aquesta zona formant una petita regió de doble cadena. Posteriorment la polimerasa s'uneix a aquesta zona de doble cadena i comença a copiar en sentit 5' a 3' agregant les bases corresponents i formant-se els ponts d'hidrogen entre elles, estabilitzant la unió. Finalment, tenim l'extensió (72°C), on la polimerasa assoleix la seva màxima activitat i continua la síntesi dels fragments d'ADN a partir dels iniciadors que s'havien

¹ Font:

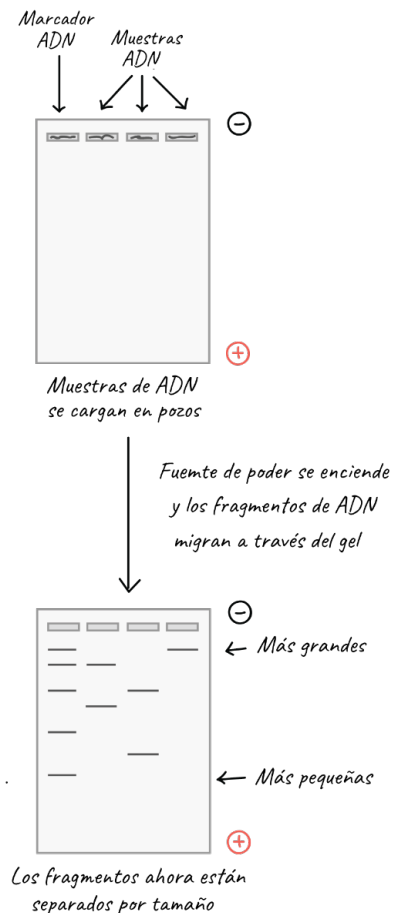
https://transferecia.fundaciorecerca.cat/docs/Gui%C3%B3%20docent%20Diagn%C3%B2stic%20de%20malalties%20gen%C3%A8tiques%20i%20experimentaci%C3%B3%20animal%20v6_es.pdf

alineat, prèviament. El resultat de la PCR el podem veure mitjançant una tècnica que anomenem electroforesi en gel d'agarosa.

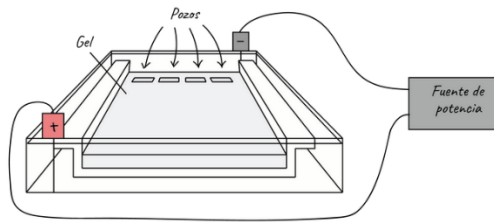


Font: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

- La RT-PCR: la reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa (RT-PCR) és una variant de PCR. A la RT-PCR, però, un bri d'ARN és retrotranscrita en ADN complementari (ADNc) fent servir un enzim anomenat transcriptasa inversa, i el resultat, s'amplifica en un PCR tradicional. L'amplificació exponencial mitjançant PCR en Transcripció Reversa suposa una tècnica altament sensible, que pot detectar un nombre de còpies d'ARN molt baix. Els principals usos de la RT-PCR estan relacionats amb el camp del diagnòstic molecular i amb la recerca científica.
- **Electroforesi:** significa "moviment per electricitat" i es tracta d'una tècnica de biologia molecular que permet separar els fragments de DNA per mida gràcies a una matriu sòlida formada per agarosa (polisacàrid format per repetides unitats d'agarosa). En aplicar un corrent elèctric sobre el gel, que es troba immers en un tampó conductor d'electricitat, els fragments de DNA (carregats negativament) es mouran cap al pol positiu o ànode. El gel serveix com a matriu per on el DNA viatja de forma inversament proporcional a la seva mida: els fragments de major grandària troben més dificultats per moure's pels forats de la matriu i per tant, avancen més cap a l'ànode. Per entendre'ns, imaginem la següent situació: agafem totes les cadires i taules de la classe i les distribuïm aleatòriament per l'aula, molt juntes. Si un/a alumne/a vol creuar la classe de punta a



punta travessant el mobiliari, ho tindrà molt més fàcil anant només que en grup amb més companys agafats de la mà.



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





Aplicacions biotecnològiques

La investigació per conèixer millor els virus, els seus hostes i les malalties que poden transmetre també ha permès obtenir aplicacions biotecnològiques en altres camps:

- Generació de vectors virals per a l'expressió de productes d'interès, com proteïnes recombinants, antivirals i altres.
- Producció de Virus Like-Particles (VLP) i contribució d'aquestes en diferents àmbits com ara la generació de vacunes.
- Control del moviment i transmissió de virus en plantes.

5. Taller pràctic

T'encarreguen processar i analitzar les mostres enviades per l'agricultor. Primer treus les fulles de la bossa de mostres i observes alguns insectes a sobre.

<p>Activitat 1. Reconeixement de plantes sanes vs malaltes</p> <p>Mostra 1²</p>		
<p>Mostra 2³</p>		

El nostre primer objectiu ha de ser classificar les diferents mostres vegetals, fruits i fulles, que ens ha enviat l'agricultor a la taula segons el símptoma que presentin. Per això farem servir la taula que trobarem a continuació on escriurem "SÍ" o "NO" depenent de si les mostres presenten els símptomes de cada fila.

² Font: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2Fagri_2007_895_278_284.pdf

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

Síntomes	Mostra 1	Mostra 2
Mosaic		
Taques anul·lars a les fulles		
Nanisme		
Tumors o agalles		
Anells cloròtics		
Clorosi		
Deformació en el fruit		
Curvatura de la fulla		

Activitat 2. Recollida i observació de pugons en lupa

Com s'ha comentat anteriorment, alguns insectes actuen com a vectors de diferents virus. Els pugons són insectes molt interessants en la dispersió dels virus. Aquests insectes moltes vegades tenen capacitat d'alimentar-se de diversos cultius, són polífags, cosa que fa que puguin transmetre virus a diferents plantes (per exemple, el pugó negre de la fava, *Aphis fabae*).² Tanmateix, de vegades també alguns pugons són molt específics: viuen només sobre un cultiu (per exemple, el pugó groc de l'adelfa, *Aphis nerii*).

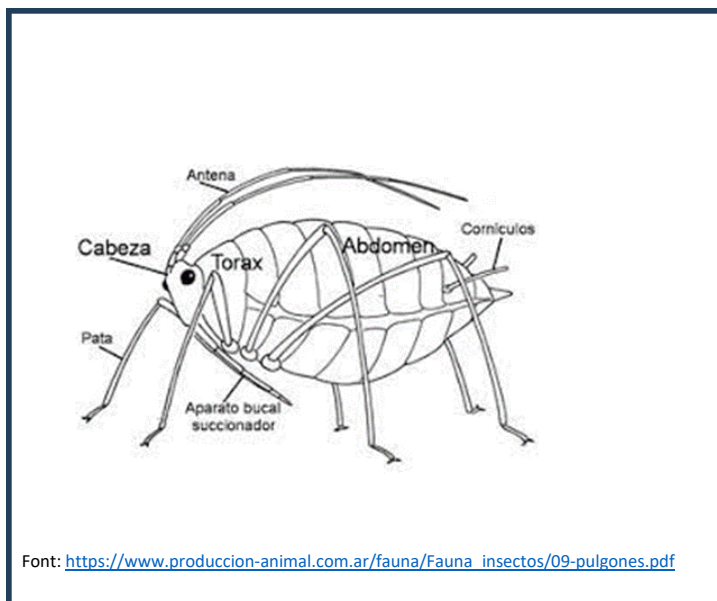
El nostre segon objectiu ha de ser observar i dibuixar les parts d'aquest vector, pugó, posant més interès en el reconeixement de l'aparell bucal xuclador, que és per on poden adquirir els virus de les plantes.²

- Colònies de petits insectes grocs, verdosos o foscos.
- Debilitament de la planta, deformacions i corba en fulles.
- Disminució del desenvolupament vegetatiu de la planta en comparació amb altres plantes de la mateixa varietat i similar data de plantació.
- Fulles i Fruits enganxosos per la melassa que pot generar la colonització de fongs.
- Presència de formigues atretes per la melassa.
- Transmissió de virus vegetals.
- Depreciació comercial o perdudes de producció.



Foto 1. Beines de faves cobertes de pugó. 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>

El nostre segon objectiu ha de ser observar i dibuixar les parts d'aquest vector, pugó, posant més interès en el reconeixement de l'aparell bucal xuclador, que és per on poden adquirir els virus de les plantes.



Font: https://www.produccion-animal.com.ar/fauna/Fauna_insectos/09-pulgones.pdf

Cap: antenes, ulls i aparell bucal succionador.

Tòrax: potes.

Abdomen: Sifúncul i cua, ales (depenent d'alguns factors).

Activitat 3. Anàlisi de la presència de virus

Els virus que poden afectar els fruiters de pinyol pertanyen bàsicament a quatre famílies: *Potyvirus*, *Ilavirus*, i *Closterovirus* i *Nepovirus*. Dins d'elles un dels més importants és el *Plum pox virus*, PPV. Una de les malalties virals més preocupants per a la producció de préssec és la malaltia de la Sharka. La Sharka és una malaltia de fruiters de pinyol causada pel virus PPV, l'únic virus de fruiters de pinyol que es dispersa de forma natural per pugons.

Hi ha diverses soques d'aquest virus, però els dos aïllats principals que afecten el presseguer són: l'aïllat Dideron (PPV-D) o comú i l'aïllat Marcus o (PPV-M). Aquest últim resulta especialment agressiu, amb una simptomatologia que va des de taques, anells i clorosi en nervis de fulles, fins als anells depressors i deformacions externes en els fruits, que solen caure abans de la maduresa. A més, els pètals d'algunes varietats mostren típics símptomes de decoloració.⁴

A diferència del que passa amb fongs i bacteris, els virus no es poden eliminar mitjançant l'aplicació de productes químics.

Com podem determinar si el virus és present en les mostres que ens ha enviat l'agricultor? Quina tècnica podríem fer servir per determinar-ho?

Quina informació necessitem del virus per poder procedir amb l'anàlisi que proposeu?

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

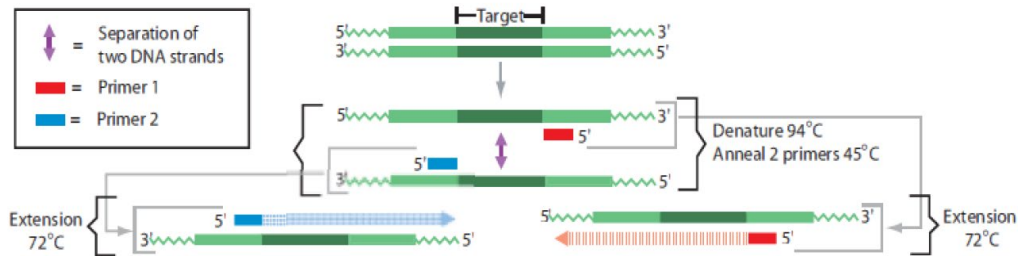
En cas que el virus estigui present a les mostres que ens han enviat, com creieu que podrem evitar la dispersió del virus cap a les plantes sanes?

Segons els símptomes que hem observat en les mostres de quin dels dos aïllats de PPV es pot tractar?

Protocol: Detecció del PPV-M per RT-PCR⁵

El PPV és un virus d'ARN, és per això que necessitem utilitzar la RT-PCR. En la primera etapa passarem la nostra mostra d'ARN a ADNc mitjançant un enzim anomenat transcriptasa inversa, que realitza el procés de retrotranscripció. Un cop tenim l'ADNc, és necessària l'amplificació per PCR. Aquesta reacció utilitza un enzim conegut com a Taq polimerasa, la qual va ser originalment purificada d'un bacteri que habita en llocs a altes temperatures (properes a ebullició). La reacció de PCR inclou 2 oligonucleòtids sintètics (15-30 nucleòtids), coneguts com a "primers" o encesos, la Taq, nucleòtids i l'ADN extret, conegut com a "template" (motlle). La regió d'ADN a amplificar s'anomena "target" (diana). En el primer pas de la reacció de PCR, les cadenes complementàries d'ADN se separen (desnaturalitzades) l'una de l'altra a 94°C, mentre que la Taq polimerasa roman estable. En el segon pas, conegut com a emparellament, posteriorment disminueix a una temperatura d'entre 40-65°C que permet la hibridació dels 2 encenedors, cadascun en un braç de l'ADN motlle. En el tercer pas, conegut com a extensió, la temperatura és elevada a 72°C i la Taq polimerasa afegeix nucleòtids als encaredors per completar la síntesi d'una nova cadena complementària.

⁵ Protocol adaptat del protocol DETECCIÓN-VIH-RT-PCR de BIOTED: <https://www.bioted.es/protocolos/DETECCION-VIH-RT-PCR.pdf>



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

Aquests tres passos, desnaturalització-emparellament-extensió, constitueix un cicle de PCR. Aquest procés es repeteix durant 20-40 cicles amplificant la seqüència objecte exponencialment. La PCR es duu a terme en un termociclador, un instrument que és programat per a un ràpid escalfament, refredament i manteniment de les mostres durant diverses vegades.

En el cas del PPV-D i PPV-M, la literatura⁶ indica que una bona ubicació per a generar els diferents encebadors en els llocs d'unió són els següents:

PPV-D: BOJ-3	PPV-M: CAH-2
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> Encebador 1 mD5: 5'-TATGTCACATAAAGGCGTTCTC-3' </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> Encebador 1 mM5: 5'-GCTACAAAGAACTGCTGAGAG-3' </div>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> Encebador 2 mD3: 5'-GACGTCCTGTCTCTGTTG-3' </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 10px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> Encebador 2 mM3: 5'-CATTCCATAAACTCCAAAAGAC-3' </div>

Materials necessaris

- Kit de detecció de [VIH per RT-PCR](#): el kit conté mostres, TAE 10X, agarosa, micropipeta i puntes.
- Microones o placa calefactors.
- Sistema d'electroforesi horitzontal.
- Balança

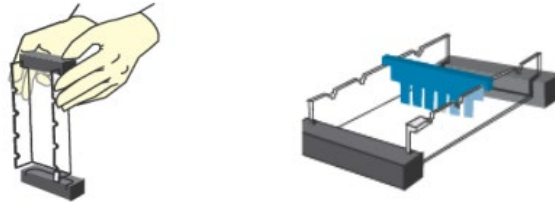
⁶ http://www.elis.sk/download_file.php?product_id=65&session_id=8fjp0s61bp94h4n39n2oi66gv6

Protocol

1. Preparació del gel d'agarosa

a) Preparació del motlle

Agafeu el motlle per fer els gels i tancar els extrems amb els topalls perquè no surti l'agarosa. Després col·locar la pinta per formar els pouets.

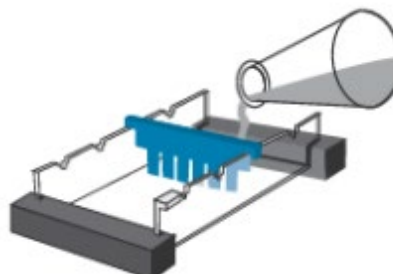


a. Preparació del gel d'agarosa

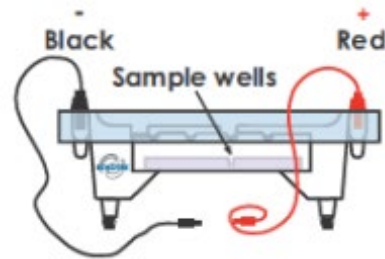
- Utilitzeu un vas o Erlenmeyer de 100 ml per preparar la solució del gel.
- Per a gels de 7 x 7 cm: afegiu 32 ml de tampó d'electroforesi 1 X més 0,30 gr d'agarosa, agiteu la barreja per dissoldre els grumolls d'agarosa. Per a gels de 7 x 10 cm: afegiu 42 ml de tampó d'electroforesi 1 X més 0,40 gr d'agarosa, agiteu la barreja per dissoldre els grumolls d'agarosa.

Verifiqueu que s'ha afegit els 450 ml d'aigua destil·lada al tampó de electroforesi 10 X.

- Escalfeu la barreja per dissoldre l'agarosa, el mètode més ràpid és la utilització d'un microones, també es pot utilitzar una placa calefactora, en ambdós casos, perquè l'agarosa s'hi dissolgui s'ha de portar la solució a punt d'ebullició. La solució final ha d'aparèixer clara sense partícules aparents.
- Refredeu la solució d'agarosa més o menys a 55°C (per accelerar el procés es pot refredar tot col·locant l'envàs sota una aixeta d'aigua i agitar). Si es produeix molta evaporació del líquid, afegiu-hi tampó d'electroforesi.
- Afegiu la solució d'agarosa al motlle.



- Deixeu que el gel solidifiqui. Per accelerar el procés es pot sembrar el gel en una nevera (si l'electroforesi es realitzarà l'endemà, conservar el gel a 4°C).
- b. Preparació del gel per a l'electroforesi
- Després que el gel s'ha solidificat amb molta cura treure els topalls.
 - Col·loqueu el gel a la cambra d'electroforesi correctament orientada amb els pouets més a prop del pol negatiu (color negre).



- Ompliu la cambra d'electroforesi amb 300 ml de tampó d'electroforesi.
- Comproveu que el gel està completament cobert de tampó.
- Traieu la pinta que ha format els pouets amb molta cura de no trencar cap pouet.
- Procediu a la sembra del gel i dur a terme l'electroforesi.

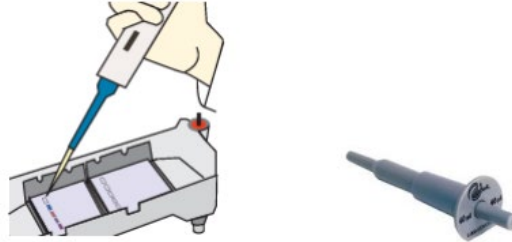
2. Sembrar de gel i electroforesi

Nota: si no esteu familiaritzat amb la sembra de gels d'agarosa, és recomanable que practiqueu la sembra de dur a terme l'experiment, o dur a terme l'experiment complet abans de realitzar-lo amb l'alumnat.

- Mostres d'electroforesi: comproveu que tota la quantitat de la mostra és al fons del tub; de vegades algunes gotes poden quedar-se a les parets d'aquest. Per això podem centrifugar breument els tubs amb la mostra a l'interior.
- Se subministren 4 mostres diferents presentades en 4 tubs cadascun d'un color, sembrar o carregar les mostres segons el següent ordre:

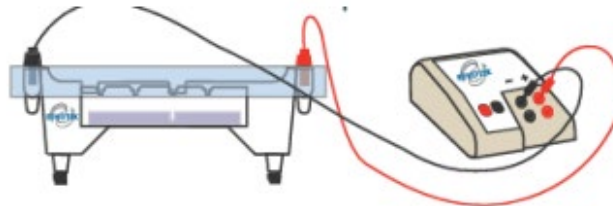
Pouet	Mostra	Descripció
1	VERD	Marcador
2	VERMELL	Control positiu
3	LILA	Mostra 1
4	BLAU	Mostra 2

- Sembreu 20 micròlits de cada mostra, utilitzar per a això la micropipeta de volum fix que se subministra amb una punta de pipeta (cada mostra porta una punta de pipeta diferent, això evita contaminacions).



a. Dugueu a terme l'electroforesi

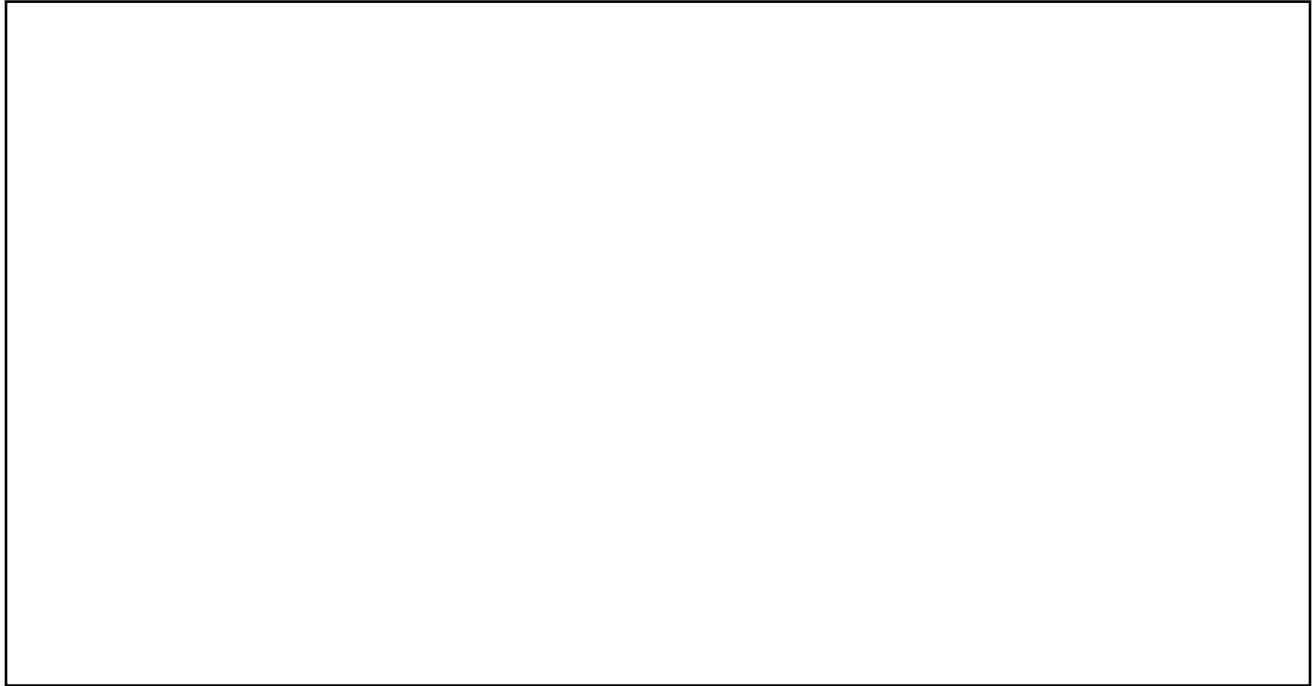
- Després que s'han carregat les mostres, acuradament col·locar la coberta de l'aparell d'electroforesi als terminals dels elèctrodes.
- Inserir la clavilla del cable negre a l'entrada de color negre de la font de corrent (entrada negativa). Inserir la clavilla del cable vermell a l'entrada de color vermell de la font de corrent (entrada positiva).




- Configureu la font de corrent a 75 volts (30 minuts o a 150 volts (20 minuts). Vigileu que els colorants no surtin del gel.
- Després de 10 minuts començarà a observar-se la separació dels colorants.
- Després que l'electroforesi ha acabat, apagueu la font de corrent, desconnecteu els cables i traieu la coberta.
- Col·loqueu el gel en un transil·luminador de llum blanca (si no en teniu, es pot usar un full de paper blanc).

6. Interpretació dels resultats

Dibuixa o enganxa una fotografia dels resultats que heu obtingut.



El PPV-M, es un virus de ADN o ARN?



Per a què serveix el Control + de la PCR?



Què ens indica a presència d'una banda de 499 pb en totes les reaccions?



Hi ha algun positiu en PPV-M entre les dues mostres que ens ha enviat l'agricultor?