
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

Guia docent

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 recerca?

Es proposa que en aquesta primera part l'alumnat, de forma individual tingui dos minuts per pensar en les respostes a les preguntes formulades. Passat aquest temps es proposa que s'ajuntin en grups de 5 per parlar de les possibles respostes. Aquesta segona part pot durar entre 6 i 8 minuts.

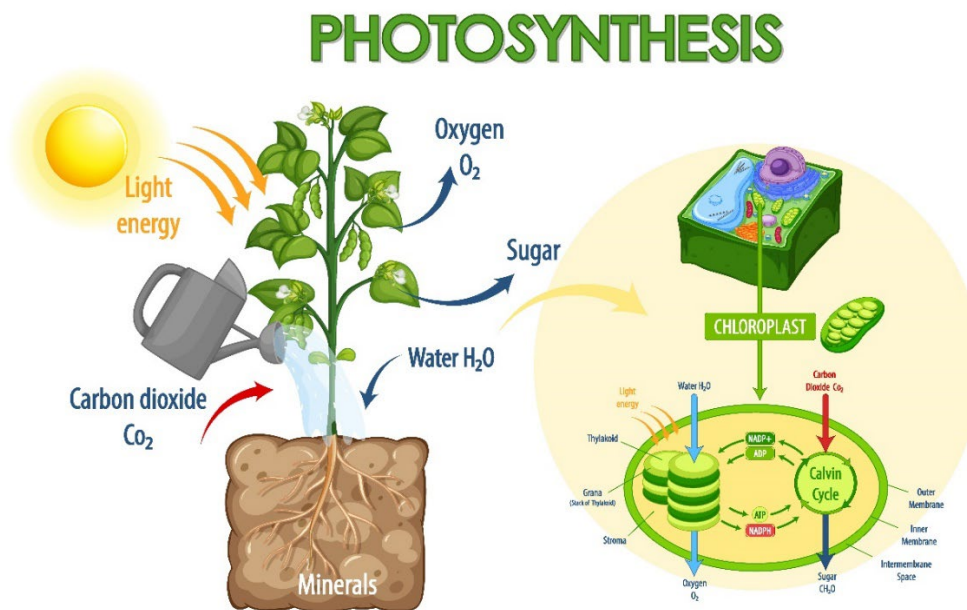
Com diferenciem les plantes de la resta d'organismes? Per exemple, dels animals?

	Animals	Plantes
Mode d'obtenir energia	<i>HETERÒTROFS (CONSUMIDORS)</i>	<i>AUTÒTROFS (PRODUCTORS)</i>
Capacitat de desplaçament	<i>LOVOMOCIÓ LLIURE</i>	<i>IMMÒBILS</i>
Forma de creixement	<i>ÀMPLIES SUPERFÍCIES INTERNES DEIXEN DE CRÉIXER</i>	<i>ÀMPLIES SUPERFÍCIES EXTERNES (CREIXEMENT CONTINU)</i>
Sensibilitat	<i>SÍ</i>	<i>NO (EXCEPTE TACTISMES I TROPISMES)</i>
Paret cel·lular	<i>RAR</i>	<i>COMÚ (CEL·LULOSA)</i>

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 en superfícies externes, es fan alts i grans, no com els animals que arriba un moment en què paren de créixer. No tenen la mateixa sensibilitat que els animals, tot i que són capaços de percebre estímuls i reaccionar cap a ells, a la recerca de llum per exemple; hi ha altres espècies que tenen sensibilitat si els toques i tanquen les seves fulles. I finalment i en el més molecular, tenen paret cel·lular en les seves cèl·lules, a més d'altres orgànuls que no posseeixen els animals, (per exemple? Cloroplasts).

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 en superfícies externes, es fan alts i grans, no com els animals que arriba un moment en què no creixen més. 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 que poden percebre estímuls i reaccionar cap a ells, a la recerca de llum, per exemple; també hi ha altres espècies que tenen sensibilitat, si les 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.

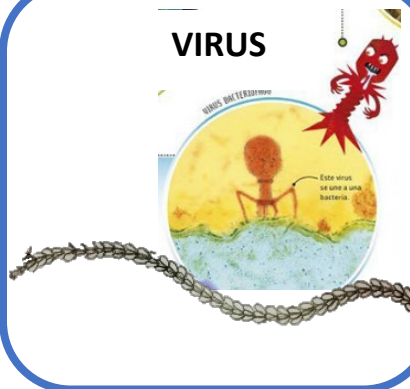
Els patògens són organismes que, per completar part o tot el seu cicle vital, viuen en o sobre una planta, ocasionant-li un perjudici. Si no ocasiona una malaltia no es considera un organisme patogen. Hi ha altres relacions entre éssers vius i plantes que no són patogèniques, com els bacteris amb relacions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

Tipus de patògens en plantes

FONGS



VIRUS

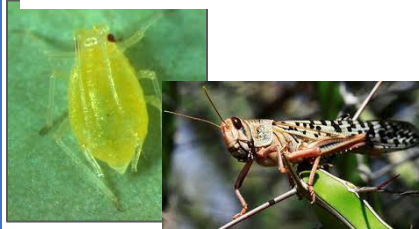


NEMATODES



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 se'n va descobrir el primer.

Sabeu en quin organisme es va descobrir el primer virus?

Un investigador estava estudiant una malaltia que causava símptomes a les plantes de tabac. Durant aquest any altres investigadors també van descobrir un virus que afectava els animals.

Són els virus éssers vius?

Els virus són partícules diminutes, infeccioses i acel·lulars compostes de material genètic, ADN o ARN, envoltats d'una coberta proteica anomenada càpside i que únicament es poden replicar dins d'una cèl·lula hoste. Els virus infecten tota mena d'organismes, des d'animals, plantes, bacteris i fins i tot a altres virus.

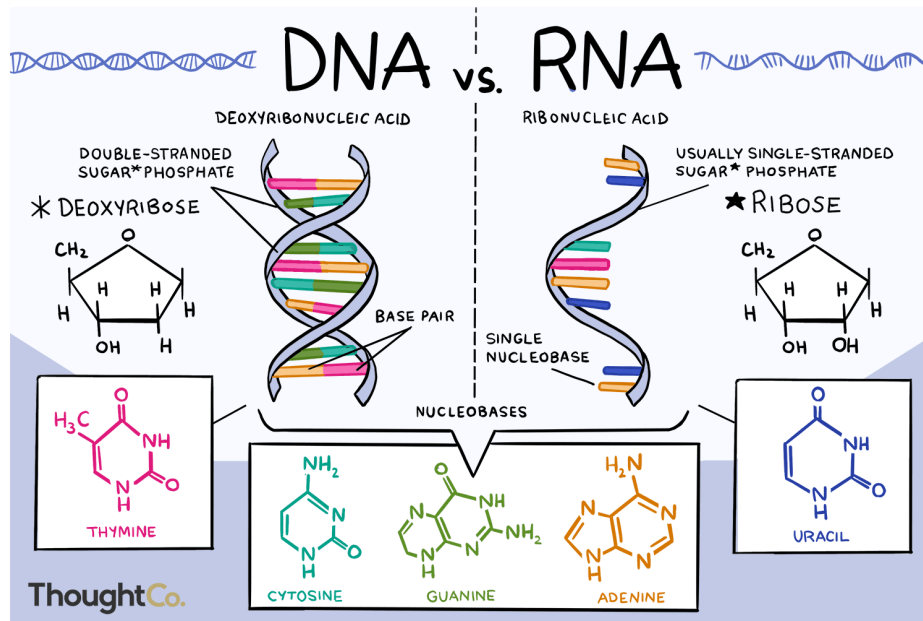
És a dir, els virus no són autosostenibles, necessiten un entorn cel·lular per iniciar els seus cicles de reproducció i evolució: paràsits. Incapaços de perpetuar-se en absència d'un entorn cel·lular. Passen d'un estat inert potencialment viu a un estat viu quan infecten una estructura viva.

Tots els virus són iguals?

No, tots els virus no són iguals. Hi ha alguns virus que són capaços d'infectar animals, i no tots, només determinats animals, d'altres infecten plantes, fins i tot n'hi ha alguns que poden infectar bacteris. Això dependrà de la seva composició genètica i proteica. Alguns virus poden tenir com a material genètic ADN, mentre que un altre ARN. També dependrà de la seva part externa.

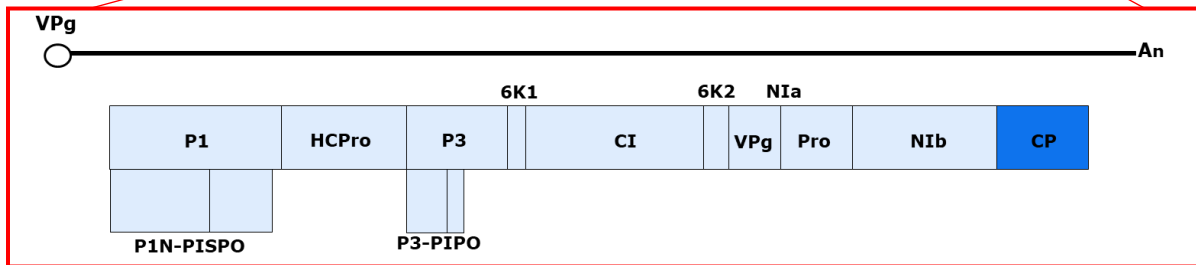
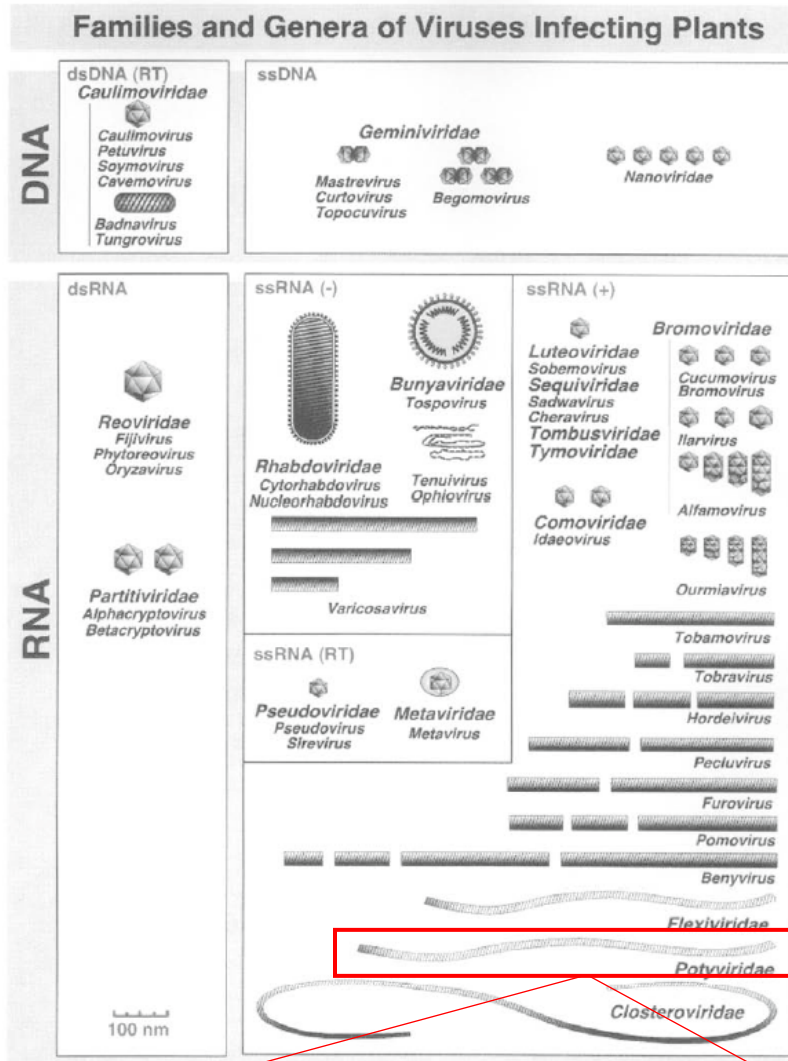
El dogma central de la biologia

L'ADN es compon de dues cadenes. Cada cadena està formada per àcids desoxiribonucleics (sucres). Depenent de la base nitrogenada que tingui aquest sucre, podrem trobar 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.



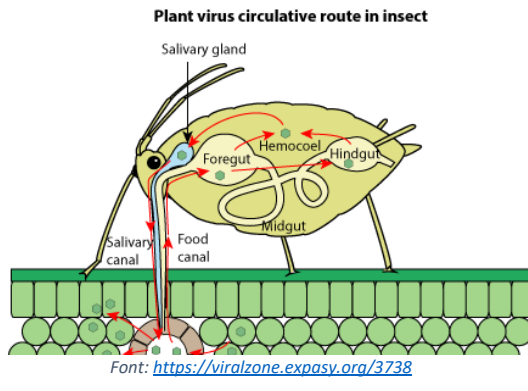
Font: Classification of plant viruses. From Virus Taxonomy, 8th Report of the National Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet et al., p. 18, Copyright Elsevier (2005).

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 ja porten el virus), 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 que 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 a causa de, entre d'altres, alteracions de pH, canvis de Ca^{2+} intracel·lular que poden arribar a desestabilitzar la coberta. Els virions se separen per començar la replicació i traducció del genoma viral. Després de passar pel procés de traducció s'obtenen proteïnes estructurals com 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.

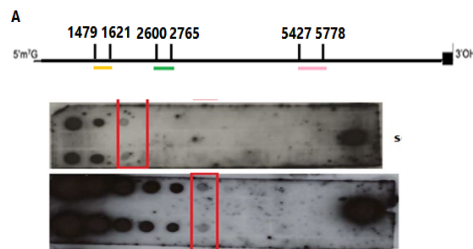
Per als virus vegetals no hi ha un mètode de control com a tal, no tenim fungicides, bactericides universals. L'únic control que tenim és un diagnòstic precoç (mètode preventiu). Aquest diagnòstic precoç ha d'estar basat en mètodes sensibles, ràpids i econòmics.

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 tots dos components: component proteic i genòmic.

Alguns exemples:

- **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.



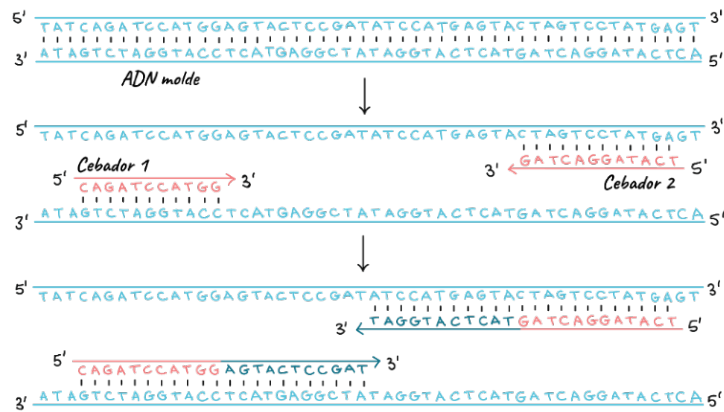
Font: propia de Clara Ontañón.

- **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 a aquesta zona formant una petita regió de doble cadena. Després 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

¹ Font:

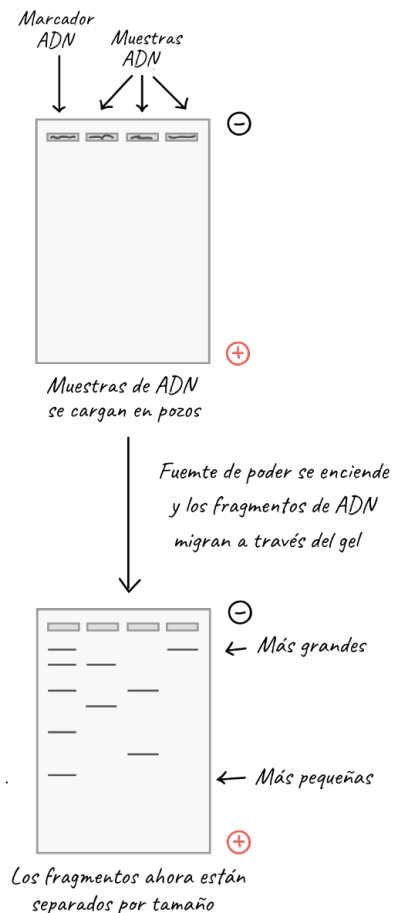
https://transferecia.fundaciorecerca.cat/docs/Gui%C3%B3%20docent%20Diagn%C3%B2stic%20de%20malalties%20gen%C3%A8tiques%20i%20experimentaci%C3%B3%20animal%20v6_es.pdf

d'ADN a partir dels iniciadors que s'havien alineat, prèviament. El resultat de la PCR el podem veure mitjançant una tècnica que anomenem electroforesi en gel d'agarosa.

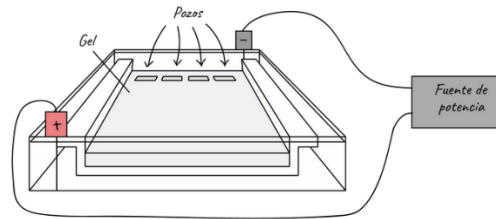


Font: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

- 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 alumne 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 hostatgers 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 (VLPs) i contribució d'aquestes en diferents àmbits com 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.

Activitat 1. Reconeixement de plantes sanes vs malaltes

Mostra 1²		
Mostra 2³		

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.

Síntomes	Mostra 1	Mostra 2
Mosaic	NO	NO
Taques anul·lars a les fulles	SÍ	NO
Nanisme	NO	NO
Tumors o agalles	NO	NO

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/>

Anells cloròtics	SÍ (FRUIT)	SÍ (FULLA)
Clorosi	NO	NO
Deformació en el fruit	SÍ	NO
Curvatura de la fulla	NO	NO

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*).

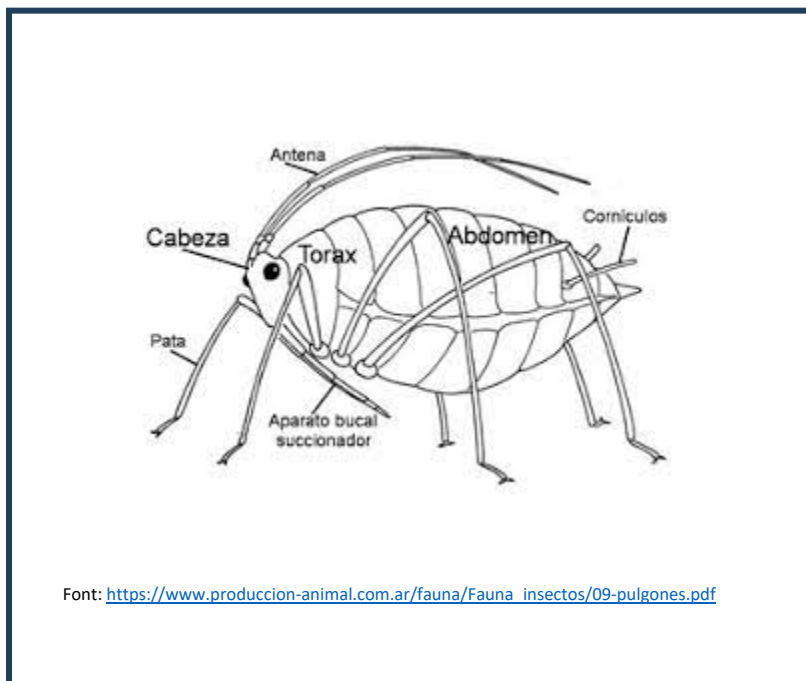
Els símptomes i danys més comuns que podem observar a les plantes infectades són:²

- Colònies de petits insectes grocs, verdosos o foscos.
- Debilitament de la planta, deformacions i curvatures 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 pèrdues de producció.



Foto 1. Beines de faves cobertes de pugó. Font: <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.



Cap: antenes, ulls i aparell bucal xuclador.

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?

Per poder ajudar l'agricultor que ens ha proporcionat les mostres, necessitarem determinar que virus (en el cas de ser una malaltia vírica) es troba present en les mostres que ens ha enviat. Per fer-ho farem servir la tècnica PCR, que com hem dit amplifica fragments de l'ADN.

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

Per analitzar les mostres a través de la PCR primer hem de saber que part del genoma del virus vam amplificar, és a dir, els llocs específics d'unió d'encebadors per a aquest virus.

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?

El control es basa en la prevenció, erradicant (arrencant, cremant) les plantes contaminades per evitar la dispersió cap a les plantes sanes⁵.

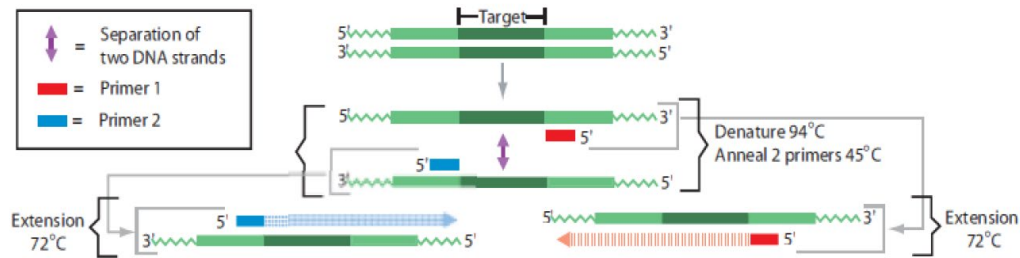
Segons els símptomes que hem observat en les mostres de quin dels dos aïllats de PPV es pot tractar?

Segons els símptomes es tractaria de l'aïllat més agressiu, l'aïllat Marcus o (PPV-M), però sempre és necessària la confirmació mitjançant tècniques moleculars o almenys immunològiques.

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

Protocol: Detecció del PPV-M per RT-PCR⁶

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 (propres 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 encebadors, cadascun a un bri 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 encebadors per completar la síntesi d'una nova cadena complementària.







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 literatura⁷ indica que una bona ubicació per a generar els diferents encebadors en els llocs d'unió són els següents:

⁶ Protocol adaptat del protocol DETECCIÓ-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> Encebador 1 mD5: 5'-TATGTCACATAAAGGCGTTCTC-3'</p> <p> Encebador 2 mD3: 5'-GACGTCCCTGTCTCTGTTG-3'</p>	<p>PPV-M: CAH-2</p> <p> Encebador 1 mM5: 5'-GCTACAAAGAACTGCTGAGAG-3'</p> <p> Encebador 2 mM3: 5'-CATTTCCATAAACTCCAAAAGAC-3'</p>
---	--

Materials necessaris

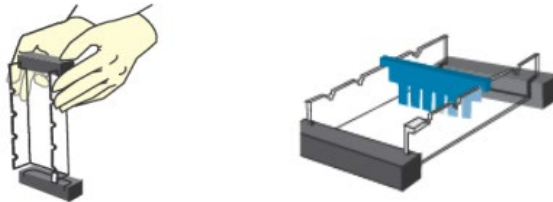
- Kit de detecció de [VIH per RT-PCR](#): el kit conté mostres, TAE 10X, agarosa, micropipeta i puntes.
- Microones o placa calefactora.
- Sistema d' electroforesi horitzontal.
- Balança

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 se surti l'agarosa. Després col·loqueu la cinta per formar els pouets.



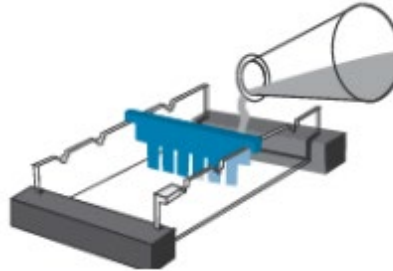
b. Preparació del gel d'agarosa

- 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.

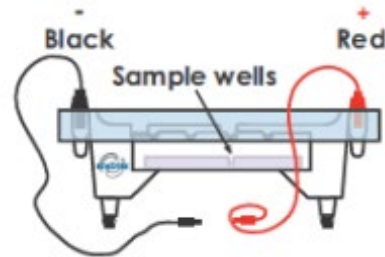
Comproveu que s'ha afegit els 450 ml d'aigua destil·lada al tampó de electroforesi 10 X.

- 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, per tal que l'agarosa es 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 col·locant l'envàs sota una aixeta d'aigua i agitar). Si es produeix molta evaporació del líquid, afegiu tampó d'electroforesi.
- Afegiu la solució d'agarosa al motlle.



- Feu que el gel solidifiqui. Per accelerar el procés es pot sembrar el gel en una nevera (si l'electroforesi es realitzés l'endemà, conservar el gel a 4°C).
- c. Preparació del gel per a l'electroforesi
- Després que el gel s'ha solidificat amb molta cura, traieu 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 feu l'electroforesi.

2. Sembrada de gel i electroforesi

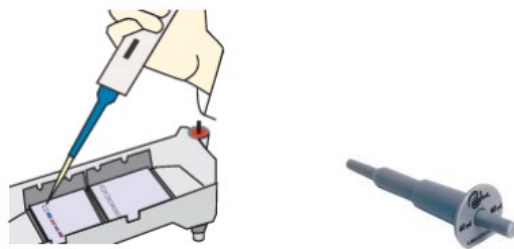
Nota: Si no esteu familiaritzats amb la sembra de gels d'agarosa, és recomanable que practiqueu la sembra abans de dur a terme l'experiment, o dur a terme l'experiment complet abans de realitzar-lo amb l'alumnat.

- 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:

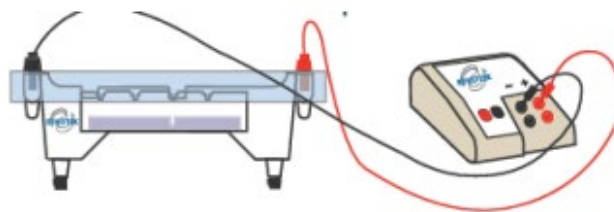
Pouet	Mostra	Descripció
1	VERDA	Marcador
2	VERMELL	Control positiu
3	LILA	Mostra 1 (presseguer infectat)
4	BLAU	Mostra 2 (presseguer sa)

- Sembrar 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. Feu 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).

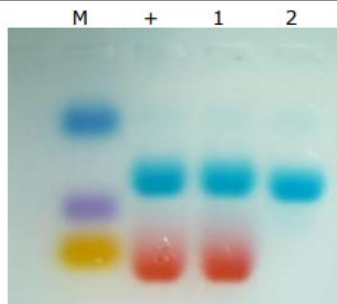


- Configureu la font de corrent a 75 volts (30 minuts o a 150 volts (20 minuts). Vigileu que els colorants no surtin del gel.
- Després de 10 minuts començarà a observar-se la separació dels colorants.

- 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, un full de paper blanc també es pot utilitzar).

6. Interpretació dels resultats

Dibuixa o enganxa una fotografia dels resultats que heu obtingut.



M: El marcador de pes molecular té 3 fragments (750 pb que correspon amb la banda blava fosca, 450 pb que es correspon amb la banda morada, 300 pb que es correspon amb la banda groga).

+: Control positiu, serveix per controlar que la reacció de PCR funciona.

Mostra 1: Bandes 297 i 499 pb.

Mostra 2: Banda de 499 pb.

El PPV-M, és un virus de ADN o ARN?

El PPV-M es un virus de ARN.

Per a què serveix el Control + de la PCR?

A totes les PCR cal incloure un Control +, això serveix per estar segurs del nostre resultat. Si el Control + no surt bé, significa que no podem fiar-nos dels resultats obtinguts ja que ni si vulgui la mostra que ha de sortir correcta és així.

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

Ens indica que en tots els casos la reacció de la PCR ha funcionat, això és molt important en aquells casos que no s'observa la banda de 297,5, d'aquesta manera es descarten falsos negatius, la banda del PPV-M no s'ha amplificat, però si la de control de la PCR.

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

Sí, la Mostra 1 indica un individu positiu en PPV-M.