



# LA DEFENSA DE LES PLANTES

Estudi fisiològic de la resistència sistèmica induïda i adquirida en tomàquet i panís, enfront els patògens PVX i MDMV

Vull agrair a la meva tutora E. L., per guiar-me i ajudar-me durant tota la realització del treball, per animar-me i mostrar sempre interès pel meu treball. Al catedràtic V. M. per deixar-me treballar en un dels seus experiments juntament amb el seu equip, a C. R., membre del grup interacció planta-microorganisme-vector, per acompanyar-me i guiar-me al llarg de tota la realització pràctica del treball i els resultats, a A. C., estudiant de l'ETSEA, per compartir amb mi el desenvolupament de tot l'experiment. I finalment al Projecte Itinera per l'oportunitat única que m'ha ofert en poder realitzar el meu treball a la universitat de Lleida.

## ÍNDEX

ABREVIATURES.....	VIII
1. Introducció .....	1
2. Marc teòric .....	3
2.1 Els virus.....	3
2.1.1 Descripció general .....	3
2.2 Els virus vegetals .....	4
2.2.1 El cicle vital dels virus.....	5
2.2.2 La transmissió.....	8
2.2.3 Símtomes.....	12
2.3 Els virus vegetals estudiats .....	13
2.3.1 <i>Potato Virus X (PVX)</i> .....	13
2.3.2 <i>Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV)</i> .....	15
2.4 La resistència de les plantes .....	18
2.4.1 Resistència sistèmica adquirida.....	19
2.4.2 Resistència sistèmica induïda.....	22
3. Objectius i hipòtesis.....	27
4. Material i mètodes.....	28
4.1 Maquinària.....	28
4.2 Material general.....	33
4.3 Medis de cultiu .....	35
4.4 Disseny experimental .....	37
4.5 Material biològic .....	38
4.5.1 Material vegetal .....	38
4.5.2 <i>Azospirillum brasilense</i> CECT 590 .....	39
4.6 Tractaments a les plàntules.....	52

## Índex

4.6.1	Tractament d' <i>A. brasilense</i> a les plantes de tomàquet i panís.....	52
4.6.2	Tractament d'àcid salicílic a les plantes de tomàquet i panís. ....	53
4.6.3	Inoculació dels Virus.....	53
4.7	Paràmetres observats .....	56
4.7.1	Altura i nombre de fulles .....	56
4.7.2	Paràmetres fisiològics.....	56
4.7.3	Test DAS-ELISA .....	57
4.8	Microscopi electrònic de transmissió.....	60
5.	Resultats.....	63
5.1	Assaig en tomaqueres.....	63
5.1.1	Altures i nombre de fulles .....	63
5.1.2	Paràmetres fisiològics.....	64
5.1.3	Test DAS-ELISA .....	67
5.2	Assaig en panís.....	68
5.2.1	Altura i nombre de fulles .....	68
5.2.2	Paràmetres fisiològics.....	69
5.2.3	Test DAS-ELISA .....	73
5.3	Microscopi electrònic de transmissió.....	74
6.	Conclusions .....	76
7.	Bibliografia.....	78
	Webgrafia.....	84
8.	Annexos.....	86
8.1	Annex 1. Instruccions per a manipular microorganismes i instruccions per a recuperar cultius liofilitzats.....	86
8.2	Annex 2. Tampons per a seguir el protocol ELISA.....	89

## ÍNDEX DE FIGURES

<b>Figura 1.</b> Il·lustració de les parts d'un virus .....	4
<b>Figura 2.</b> Classificació dels virus vegetals .....	5
<b>Figura 3.</b> Esquema amb la descripció dels processos del cicle víric .....	7
<b>Figura 4.</b> Canals plasmodesmàtics.....	8
<b>Figura 5.</b> Inoculació del virus mitjançant un insecte com a vector .....	9
<b>Figura 6.</b> Penetració i invasió per nematodes.....	10
<b>Figura 7.</b> Diferents eines i elements que poden actuar com a vector .....	11
<b>Figura 8.</b> Transmissió de virus mitjançant la propagació vegetativa.....	11
<b>Figura 9.</b> Llavor infectada amb virus.....	12
<b>Figura 10.</b> Viró filamentós recobert de subunitats de proteïna de coberta .....	13
<b>Figura 11.</b> Purificat de Potato Virus X.....	14
<b>Figura 12.</b> Síntomes de mosaic lleu induït per PVX.....	15
<b>Figura 13.</b> Purificat de Maize Dwarf Mosaic Virus .....	16
<b>Figura 14.</b> Síntomes produïts per MDMV en planta del panís .....	17
<b>Figura 15.</b> Mapes de la distribució geogràfica del virus MDMV en el panís.....	17
<b>Figura 16.</b> Resposta SAR de les plantes.....	20
<b>Figura 17.</b> Esquema de l'activitat del SA en la resposta SAR de la planta.....	22
<b>Figura 18.</b> Resposta sistèmica induïda a causa d'un bacteri.....	23
<b>Figura 19.</b> Comparació dels bacteris gramnegatiu i grampositiu .....	25
<b>Figura 20.</b> <i>Azospirillum brasilense</i> sp245 .....	26
<b>Figura 21.</b> Agitador horitzontal.....	28
<b>Figura 22.</b> Agitador magnètic amb els imants al davant. ....	29
<b>Figura 23.</b> Agitador vòrtex. ....	29
<b>Figura 24.</b> Autoclau 1 per a residus, autoclau 2 i 3 per a material i medis.....	30
<b>Figura 25.</b> Campana de flux laminar horitzontal. ....	31

<b>Figura 26.</b> Espectrofotòmetre .....	31
<b>Figura 27.</b> Microcentrífuga.....	32
<b>Figura 28.</b> pH-metre.....	32
<b>Figura 29.</b> Material de laboratori dins l'autoclau..	33
<b>Figura30.</b> Material de laboratori general-1 .....	33
<b>Figura 31.</b> Material de laboratori general-2.....	34
<b>Figura 32.</b> Disseny de l'assaig PVX/tomàquet.....	37
<b>Figura 33.</b> Disseny de l'assaig MDMV/panís .....	38
<b>Figura 34.</b> Esterilització de llavors. ....	39
<b>Figura 35.</b> Medi de cultiu Roig Congo.....	40
<b>Figura 36.</b> Contaminacions en sembrar <i>A. brasilense</i> .....	41
<b>Figura 37.</b> <i>A. brasilense</i> liofilitzat .....	42
<b>Figura 38.</b> <i>A. brasilense</i> CECT 590 .....	43
<b>Figura 39.</b> <i>A. brasilense</i> segona sembra .....	44
<b>Figura 40.</b> Cultius d' <i>Azospirillum brasilense</i> .....	44
<b>Figura 41.</b> Esquema que il·lustra com es fan les dilucions. ....	45
<b>Figura 42.</b> Creixement del bacteri <i>A. brasilense</i> en 7 dilucions .....	47
<b>Figura 43.</b> Corba de calibració d' <i>Azospirillum brasilense</i> .....	48
<b>Figura 44.</b> Imbibició de llavors .....	48
<b>Figura 45.</b> Gràfic amb la corba d'imbibició de les llavors de tomàquet. ....	49
<b>Figura 46.</b> Gràfic amb la corba d'imbibició de les llavors de panís. ....	50
<b>Figura 47.</b> Inoculació d' <i>A. brasilense</i> les llavors. ....	51
<b>Figura 48.</b> <i>Azospirillum brasilense</i> les llavors .....	51
<b>Figura 49.</b> Tractament amb <i>A. brasilense</i> les plàntules .....	52
<b>Figura 50.</b> Tractament d'àcid salicílic a les plàntules.....	53
<b>Figura 51.</b> Passos a seguir per a inocular els virus. ....	55

<b>Figura 52.</b> SPAD.....	56
<b>Figura 53.</b> IRGA.....	57
<b>Figura 54.</b> Presa de mostres per al test ELISA.....	58
<b>Figura 55.</b> Esquema del protocol test-ELISA.....	59
<b>Figura 56.</b> A) Ultramicròtrom. B) La navalla de diamant. ....	61
<b>Figura 57.</b> Material microscopi electrònic de transmissió. ....	61
<b>Figura 58.</b> Microscopi electrònic de transmissió.....	62
<b>Figura 59.</b> Altures mitjanes en cm de les tomaqueres.....	63
<b>Figura 60.</b> Mitjanes dels números de fulles de les tomaqueres. ....	63
<b>Figura 61.</b> Valors mitjans de l'SPAD en tomaqueres.....	64
<b>Figura 62.</b> Transpiració mitjana de l'assaig en tomàquet.....	65
<b>Figura 63.</b> Taxa fotosintètica de l'assaig en tomàquet.....	65
<b>Figura 64.</b> Eficiència de l'ús de l'aigua de l'assaig de tomàquet.....	66
<b>Figura 65.</b> Test- ELISA en les tomaqueres.....	67
<b>Figura 66.</b> Altures mitjanes en cm de les plantes de panís.....	68
<b>Figura 67.</b> Número mitjà de les fulles de 5 plantes de panís per tractament. ..	68
<b>Figura 68.</b> Valors mitjans del SPAD en panís.....	69
<b>Figura 69.</b> Transpiració mitjana de l'assaig de panís.....	70
<b>Figura 70.</b> Taxa fotosintètica de l'assaig de panís.....	71
<b>Figura 71.</b> Eficiència de l'ús de l'aigua de l'assaig en panís.....	72
<b>Figura 72.</b> Test- ELISA en les tomaqueres.....	73
<b>Figura 73.</b> El xilema i el floema.....	74
<b>Figura 74.</b> Gran agrupació de virions del PVX.....	74
<b>Figura 75.</b> Les cèl·lules infectades pel MDMV.....	75

## **ABREVIATURES**

µL: microlitres

Abr: *Azospirillum brasilense*

acc.: Número d'accés d'identificació de virus

ADN: Àcid desoxiribonucleic

ADNbc: ADN bicatenari

ADNmc: ADN monocatenari

ARN: Àcid ribonucleic

ARNbc: ARN bicatenari

ARNmc: ARN monocatenari

Az: Tractament d'inoculació de les llavors amb *A. brasilense*

Az+ SA+V: Tractament d'inoculació de la llavor amb *A. brasilense* i inoculació amb el virus.

Az+V: Tractament d'inoculació de la llavor amb *A. brasilense* i de la plàntula amb el virus.

C: Control, plantes amb cap tractament

CECT: Col·lecció espanyola de cultius tipus

cm: centímetres

CMV: *Cucumber Mosaic Virus*

cv: cultivar

DAS: Sandvitx de doble anticòs



## Abreviatures

DO: Densitat òptica

ELISA: Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay

ETSEA: Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agroforestal

g: grams

h: hores

HEPA: High Efficiency Particulate Air

HR: Resposta hiperactiva

IgG: Anticòs

IRGA: Analitzador de gasos per infraroig

IRS: Resposta sistèmica induïda

JA: Àcid jasmònic

Kb: kilobases

L: litre

LAR: Resistència Induïda Local

M: molar

MDMV: *Maize Dwarf Mosaic Virus*

ml: mililitres

nm: nanòmetres

OAB: Medi de cultiu de Okon, Albrecht i Burris (1977)

p/p: pes/pes

## Abreviatures

PBS: Tampó fosfat salí

PBS-T: Tampó fosfat salí-Tween

PGPR: Rizobacteria promotora del creixement

pH: Mesura d'acidesa i alcalinitat.

PRs: Proteïnes relacionades amb la patogènesi

PVX: *Potato Virus X*

RC: Medi de cultiu Roig Congo

ROS: Espècies reactives d'oxigen

Rpm: Revolucions per minut

SA: Àcid salicílic

SA: Tractament de la plàntula amb l'àcid salicílic

SA+V: Tractament de la plàntula amb l'àcid salicílic i inoculació amb el virus

SAR: Resposta sistèmica adquirida

SPAD: Mesurador de clorofil·la

Spp: Espècies

Sus: Suspensió

UdL: Universitat de Lleida

UFC: Unitat Formadora de Colònies

UV: Raigs ultraviolats

V+(PVX,MDMV): Tractament d'inoculació de la plàntula amb virus

## **1. Introducció**

Escollir el tema del meu treball de recerca va ser tot un procés llarg i difícil perquè em costava decidir i precisar què volia investigar, ja que s'hi ha de dedicar moltes hores i cal trobar-s'hi còmode. Al llarg del primer curs de batxillerat, em van passar pel cap moltes opcions, però no acabava de veure-ho clar. Tot d'una, se m'oferí la possibilitat de participar en el Projecte Itinera i va ser així com vaig poder concretar la meva decisió. Em va cridar l'atenció el tema sobre la biofortificació de les plantes perquè, tot i no saber exactament el que em trobaria, vaig creure que podria aprendre molt en l'àmbit de la biologia encarat a les plantes.

El projecte m'ha ofert l'oportunitat de formar part d'un dels grups d'investigació de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrònoma de la Universitat de Lleida. L'experiment del present treball forma part del projecte CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA A LA INFECCIÓ VIRAL DE PLANTES DE TOMÀQUET I PANÍS TRACTADES AMB ELICITORS DE RESISTÈNCIA SISTÈMICA ADQUIRIDA (SAR) I INDUÏDA (ISR) (referència AGL2010-15691) liderat pel Doctor en Ciències Biològiques i Catedràtic de Producció Vegetal V. M. Amb el suport del seu equip, he desenvolupat tota la part pràctica a les instal·lacions de virologia de l'ETSEA. M'hi he trobat molt ben acollida i m'han facilitat tot el que he necessitat. El fet de poder treballar en un laboratori universitari assessorada per professionals m'ha permès assolir una gran quantitat de nous coneixements, aprendre a manipular diversos materials i màquines, aprendre moltes tècniques i conèixer des de dins tot el seguiment de treball d'un experiment de recerca universitari.

El present treball consta d'una part teòrica en la qual s'expliquen les característiques dels virus vegetals, aprofundint en els patògens "Maize dwarf mosaic virus" (MDMV) pel panís i "Potato virus X" (PVX) pel tomàquet. A més, parlo també de la resistència sistèmica adquirida i induïda que estan relacionades amb l'àcid salicílic i el bacteri *Azospirillum brasilense*. Tota aquesta informació l'he trobada en articles científics, pàgines web i en algun llibre.

## Introducció

Cal esmentar que totes les imatges en què no consta ni la font ni l'autor les he fetes jo. També vull destacar que el fons de les lletres del títol LA DEFENSA DE LES PLANTES de la portada és una imatge dels virus estudiats.

L'experiment consisteix en estudiar la resistència sistèmica adquirida mitjançant l'àcid salicílic i la resistència sistèmica induïda pel bacteri *Azospirillum brasilense*, enfront dels patògens d'estudi. És un procés de llarga durada en el qual s'han d'inocular les llavors, sembrar-les i cuidar-les fins a obtenir les plantes i, en elles, fer les mesures adients per comparar resultats. Aquests resultats s'han obtingut utilitzant instruments específics que he hagut d'aprendre a utilitzar, com l'SPAD, l'IRGA, el test-ELISA...

Com tot experiment de laboratori, m'he hagut d'enfrontar a diversos impediments i dificultats, causats per l'estat del bacteri, la contaminació i la concentració de les mostres, entre altres problemes, que he pogut superar amb l'ajuda de l'equip i les ganes de tirar endavant aquest projecte. La part de l'experiment que més ens va costar i que vam haver de repetir molts cops va ser obtenir una corba que relacionés la densitat òptica amb la unitat formadora de plaques, perquè no disposàvem del bacteri en bones condicions.

Trobo interessant i necessària la investigació referent a tot tipus de virus, donat que la nostra societat sovint s'ha d'enfrontar a epidèmies devastadores, difícils de controlar per la facilitat de reproducció i de transmissió, contra les quals no podríem lluitar sense l'ajuda de la ciència. Un clar i recent exemple n'és el virus de l'Ebola; però no només en el camp de la salut humana és important aquesta investigació, sinó també en el camp de la producció vegetal, ja que és la principal font d'aliment de la humanitat.

M'ha encantat poder gaudir d'aquesta experiència inoblidable en la qual he tingut l'oportunitat de sentir-me integrada com una més dins de l'ambient universitari. També m'ha agradat participar activament en el cultiu i la cura de les plantes. Tot això m'ha permès veure quin podria ser el camí que seguiré en el meu futur acadèmic.

## **2. Marc teòric**

El marc teòric ens permet entendre el funcionament i les característiques de tots els components estudiats en l'experiment.

### **2.1 Els virus**

#### **2.1.1 Descripció general**

Els virus no són cèl·lules ni éssers vius, sinó que es consideren simplement matèria viva, perquè no són capaços de fer cap de les funcions vitals per si sols. Són patògens i paràsits, perquè per poder dur a terme les funcions vitals han d'infectar les cèl·lules d'un hoste, ja que els virus no tenen un citoplasma amb els sistemes enzimàtics que els permetin dur a terme el seu propi metabolisme.

Els virus són estructures formades generalment per dues parts: el genoma víric i la càpsida o coberta proteica, encara que alguns virus tenen, a més a més, una coberta membranosa.

El genoma víric està format per una o diverses molècules d'àcid desoxiribonucleic (DNA) o àcid ribonucleic (RNA), però mai les dues simultàniament. L'àcid nucleic dels virus pot ser de cadena oberta o circular, monocatenària o bicatenària.

La càpsida és una coberta proteica que envolta el genoma víric, té la funció de protegir el material genètic i en els virus que no tenen coberta membranosa reconeix els receptors de membrana de la cèl·lula hoste. Està formada per proteïnes globulars o capsòmers col·locades de forma regular i simètrica. Al genoma víric i la càpsida se'ls anomena nucleocàpsida.

Hi ha alguns virus que contenen una coberta membranosa (Figura 1) que envolta la nucleocàpsida, està formada per una bicapa lipídica procedent de les cèl·lules hoste parasitades i de glicoproteïnes, la síntesi de les quals està controlada pel genoma víric. Les glicoproteïnes sobresurten lleugerament de la

coberta membranosa i tenen la funció de reconèixer la cèl·lula hoste i permetre la introducció del genoma víric en la cèl·lula hoste per fagocitosi.

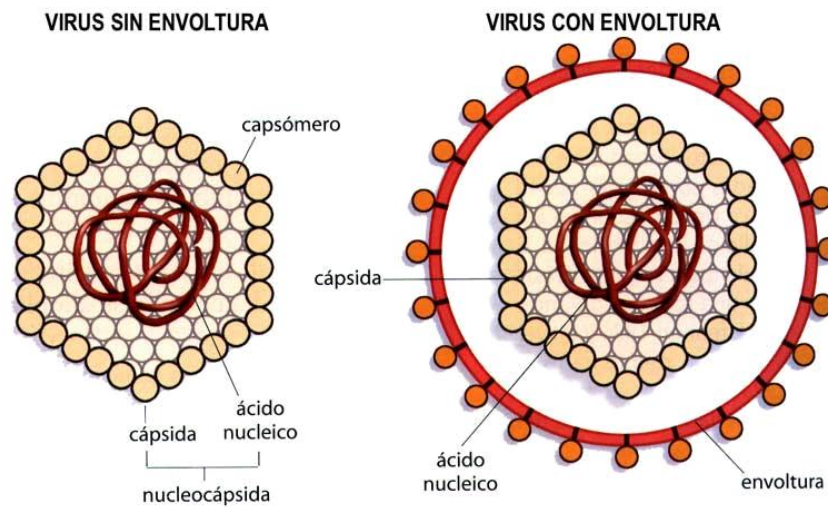


Figura 1. Il·lustració de les parts d'un virus i la comparació entre un virus sense i amb coberta membranosa. Font de: [www.inmunovirologia.blogspot.com](http://www.inmunovirologia.blogspot.com)

## 2.2 Els virus vegetals

Els virus es poden classificar seguint diferents criteris, però la classificació que ens interessa és segons l'hoste que parasiten i se'n diferencien tres grans grups: virus bacterians o bacteriòfags, virus vegetals i virus animals. Els virus utilitzats en aquest treball són virus vegetals.

Els virus vegetals són paràsits biotrófics obligats d'una cèl·lula hoste, això vol dir que els virus vegetals mantenen viu l'hoste que infecten i depenen completament d'ell. Pel que fa al material genètic, una minoria dels virus vegetals tenen ADN de cadena bicatenària (ADNbc) i n'hi ha altres amb ADN de cadena monocatenària (ADNmc), però la majoria dels virus vegetals no tenen ADN sinó ARN. Alguns virus vegetals tenen ARN de cadena bicatenària (ARNbc) però la gran majoria tenen ARN de cadena monocatenària (ARNmc) amb polaritat positiva igual que les molècules d'ARN missatger de la cèl·lula, encara que alguns la tenen amb polaritat negativa.

Segons l'estructura i el tipus de material genètic, els virus vegetals es classifiquen segons la (Figura 2).

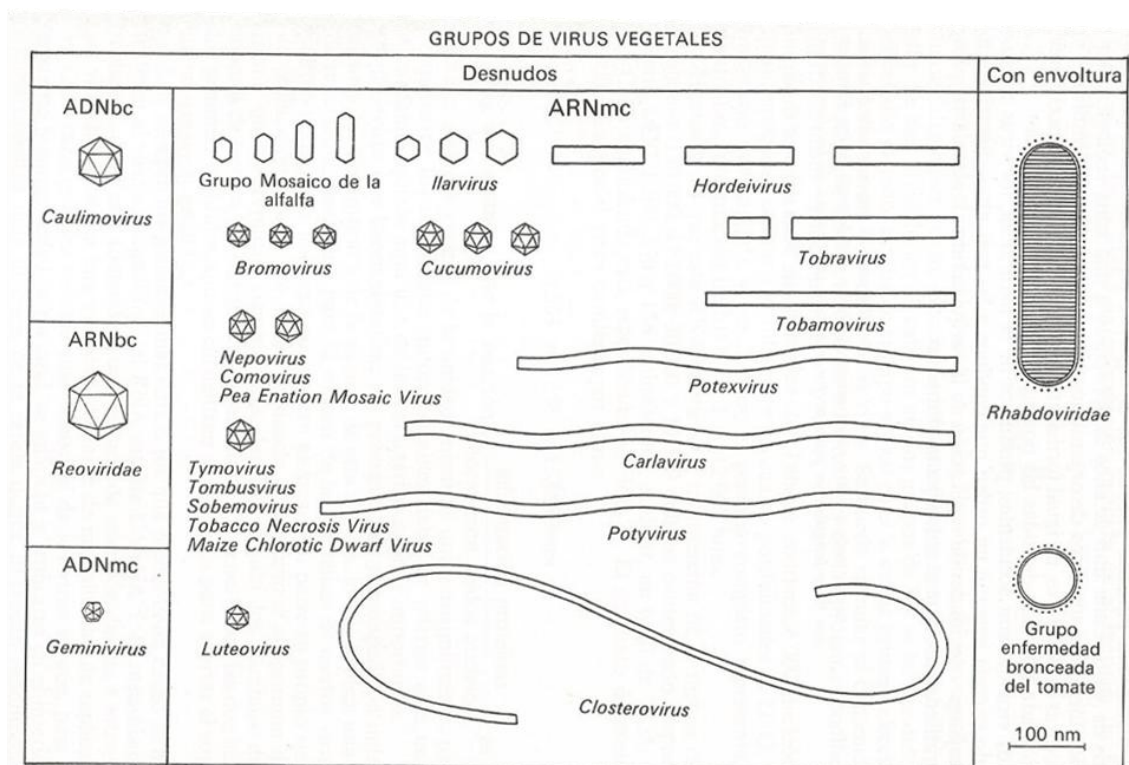


Figura 2. Classificació dels virus vegetals. Font: Cournet, P. 1992. Elementos de virología vegetal.

### 2.2.1 El cicle vital dels virus

El cicle vital dels virus es divideix en dues fases, la fase extracel·lular i la fase intracel·lular.

En la fase extracel·lular els virus no realitzen cap activitat fisiològica, així que no requereixen les síntesis de proteïnes ni utilitzen energia, són estructures inertes. En aquesta fase els virus s'anomenen partícules víriques o virions.

La fase intracel·lular comença quan el virus infecta una cèl·lula hoste. Primerament els virus vegetals no poden entrar per si sols a la cutícula i la paret cel·lular de les plantes, sinó que el virió entra dins del citoplasma de la cèl·lula de forma passiva, a través de ferides causades per un vector (àcars, nematodes, pugons o fongs) o per un dany mecànic en la cutícula i la paret cel·lular. Un cop dins la planta, els virus tan sols poden infectar les cèl·lules que tenen, en la seva superfície, proteïnes receptores per al virus corresponent. Quan el virus es fixa al seu receptor, pot ser que entri a la cèl·lula solament el

genoma víric i que quedi a fora la càpsida, o també pot entrar la càpsida total o parcialment juntament amb el genoma víric.

Un cop el genoma víric és a dins de la cèl·lula, pot reproduir-se perquè és capaç de destruir el DNA de la cèl·lula hoste, replicar el genoma víric i després dirigir la síntesi de cobertes dels nous virus. Per fer tot això, utilitza la matèria, l'energia i el sistema enzimàtic de la cèl·lula hoste.

Per tal que el genoma víric es pugui multiplicar, la cèl·lula aporta un aparell de transcripció (per als virus d'ADN) i un aparell de traducció (per a tots els virus). Els virus d'ADN han de ser transportats al nucli on es realitzarà la transcripció, d'aquesta manera tenen accés a les proteïnes cel·lulars necessàries per a la producció d'ARN missatger a partir de l'ADN viral. En la traducció d'ARN viral al citoplasma es produeixen, com a mínim, tres tipus de proteïnes virals necessàries per a completar el cicle de vida dels virus. Es formen proteïnes de replicació (essencials per a la producció d'àcids nucleics), proteïnes estructurals (formen la coberta proteica i altres components dels virions), i proteïnes de moviment (serveixen d'intermediàries en el transport dels virus entre les cèl·lules vegetals). Les proteïnes de replicació viral es combinen amb les proteïnes cel·lulars per formar un complex de proteïnes que fabriquen múltiples còpies del genoma víric. Aquests nous genomes interactuen amb les proteïnes estructurals per a formar nous virions. Un cop formats els nous virions surten de la cèl·lula per la ruptura de la membrana cel·lular o per gemmació (Figura 3).



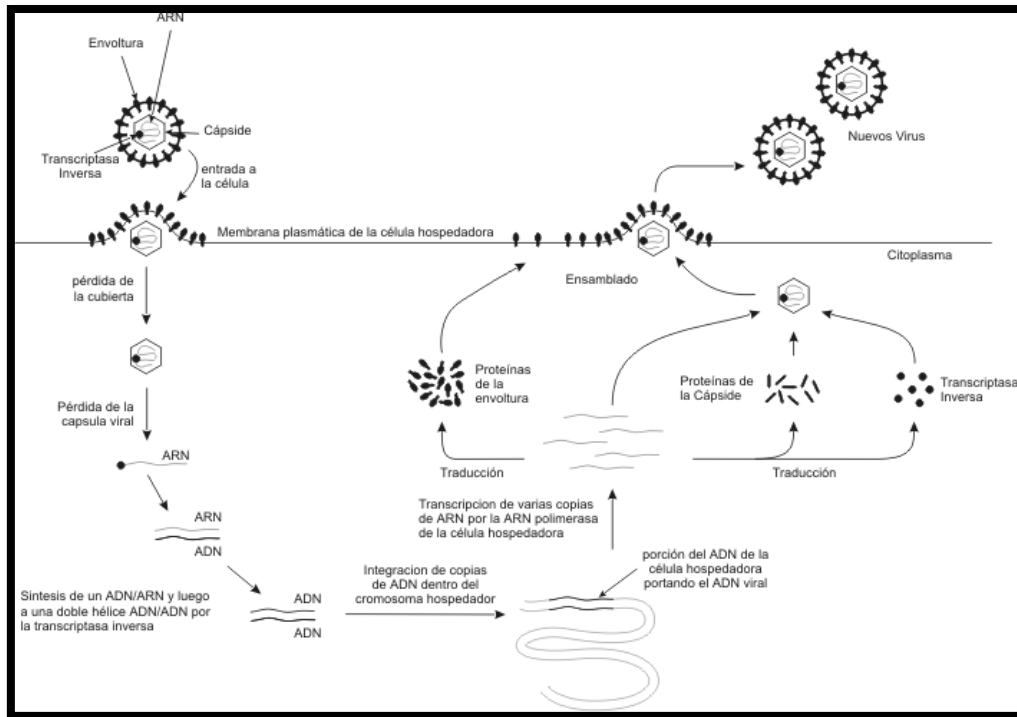


Figura 3. Esquema amb la descripció dels processos del cicle víric d'un virus ARN. Font: [www.genomasur.com](http://www.genomasur.com)

A continuació, els virions infectaran les cèl·lules veïnes repetint el cicle anterior. Els virus acostumen a transportar-se de cèl·lula a cèl·lula mitjançant petits canals anomenats plasmodesmàtics (Figura 4), que són estructures tubulars de 25 a 30nm de diàmetre i comuniquen les cèl·lules entre si, però alguns es mouen de cèl·lula a cèl·lula com a àcid nucleic o com a virió. Per tal que el virus infecti tota una planta, es realitza un desplaçament de llarga distància, per això cal que entri al sistema vascular, on és transportat mitjançant els tubs cribosos del floema i on es mou passivament amb el flux de fotosintats (carbohidrats i altres compostos que es produeixen durant la fotosíntesi). Finalment, el virus passa del floema a les cèl·lules on es reproduceix i passa de cèl·lula a cèl·lula.

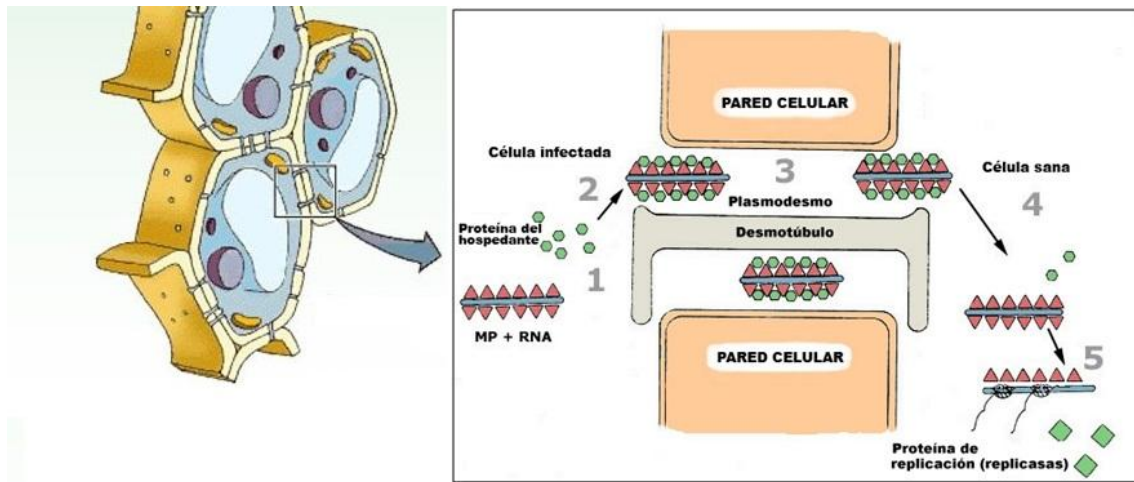


Figura 4. Canals plasmodesmàtics. Fonts: [www.slideplayer.es](http://www.slideplayer.es) i [www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)

### 2.2.2 La transmissió

Els virus vegetals no surten espontàniament del seu hoste per a infectar altres plantes, per això no s'escampen ni per l'acció del vent ni per l'acció de l'aigua. Generalment, tampoc es transmeten quan el virus es transporta per la saba, si no és que es posa en contacte amb les cèl·lules vives d'una ferida. Però els virus vegetals es transmeten de moltes maneres diferents.

La majoria dels virus vegetals es transmeten de forma mecànica activa mitjançant un organisme viu, anomenat vector. Els virus vegetals només poden ser transmesos per un vector específic, en canvi, cada vector és capaç de transmetre més d'un tipus de virus diferent. S'ha observat que en algunes classes de virus, aquest fet és degut a que la unió entre el vector i el virus és determinada per les diferents proteïnes virals (Gera *et al.*, 1978; Chen i Francki, 1990; Perry *et al.*, 1994). Els principals vectors de virus vegetals són els insectes, els àcars, la cuscuta, els fongs, els nematodes o els humans.

Els vectors més comuns són els insectes, però cal que s'alimentin d'una planta infectada amb el virus per actuar com a vectors. Hi ha diferents tipus d'interacció virus-vector, segons això es distingeixen dues categories diferents, els virus circulants o persistents i els virus no circulants.

La categoria dels virus circulants o persistents, en la qual els virus són transportats activament a través de les membranes cel·lulars de l'aparell digestiu del vector, arriben a l'hemolimfa i es transmeten passant per les glàndules salivals, a través del canal salival (Gray i Barnejee, 1999). En aquesta categoria es distingeixen els virus circulants propagatius i els virus circulants no propagatius, segons la capacitat que té el virus de replicar-se dins el vector. Aquests virus, en general, no es poden transmetre mecànicament, sinó que han de ser inoculats en el floema, on es multipliquen. El vector és capaç d'inocular el virus durant algunes hores o dies, però prèviament hi ha un llarg període de latència, durant el qual l'insecte no pot transmetre el virus.

L'altra categoria és la dels virus no circulants, aquests es queden adherits en la superfície externa de les parets bucal de l'insecte vector, no hi ha un període de latència previ a la transmissió. En aquesta categoria es distingeixen els virus no persistents (Watson i Roberts, 1939) i els virus semipersistents (Sylvester, 1956), segons els períodes d'adquisició, retenció i inoculació, que són més elevats en els virus semi persistents. Altres virus es reproduïxen a les cèl·lules del seu vector i un cop el vector adquireix el virus és capaç de transmetre'l fins que es mor, a aquests vectors se'ls considera tant virus vegetals com insectes (Figura 5).

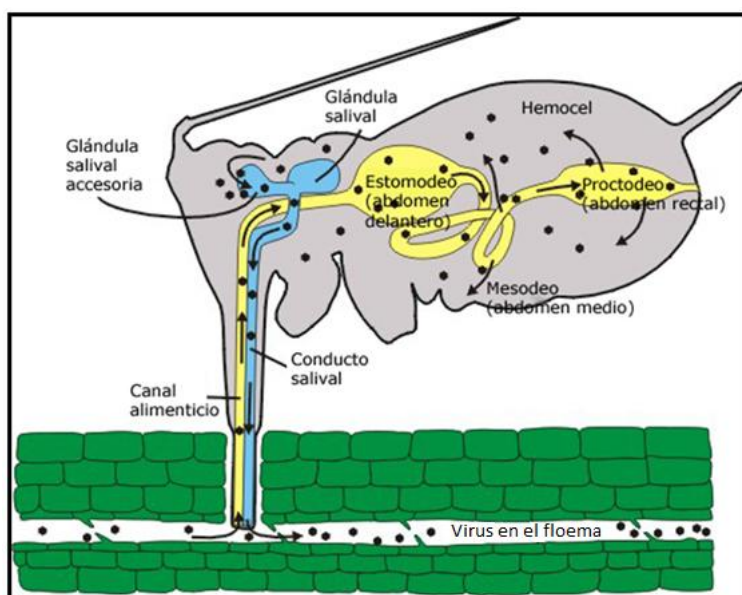


Figura 5. Inoculació del virus mitjançant un insecte com a vector. Font: [www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)

Un altre mecanisme de transmissió de virus és mitjançant fongs radiculars. Els fongs que infesten les arrels de les plantes alliberen espores (zoòspores), si la planta està infectada amb un virus, les espores també porten aquest virus en el seu interior, i en infestar les arrels d'altres plantes, també les contaminen amb el virus.

Hi ha virus que es poden transmetre a través d'un pont format per l'enrotllament de la tija de la cuscuta (*Cuscuta campestris*) entre dues plantes properes. La cuscuta és una planta paràsit sense clorofil-la ni fulles, que té fines tiges que emeten haustoris. Els haustoris penetren en l'escorça i la fusta d'una planta infectada, a continuació absorbeixen a través del seu floema les partícules virals juntament amb els nutrients, després introdueixen els virus en altres plantes mitjançant nous haustoris que aconseguen fer contacte amb els feixos vasculars de l'altra planta.

Els nematodes, per poder transmetre un virus vegetal, primer l'adquireixen quan s'alimenten de les arrels de plantes infectades i després el transmeten quan es mouen cap a les arrels de les plantes sanes (Figura 6).

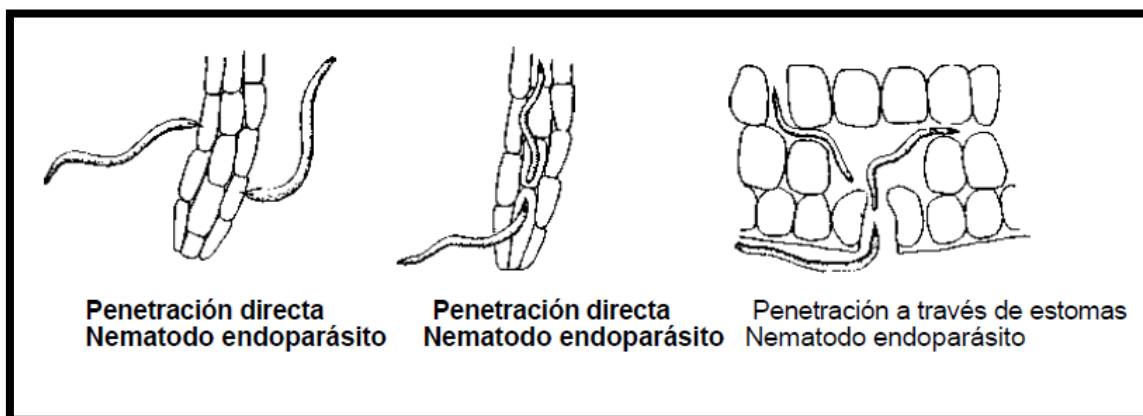


Figura 6. Penetració i invasió per nematodes. Font: Agrios, G. 1988.

Els virus vegetals no només es transmeten mitjançant vectors, sinó que hi ha altres formes de transmissió, com ara la manipulació humana, la propagació vegetativa, la transferència de saba entre dues plantes i la transmissió vertical a partir de llavors o pol·len.

Els humans podem intervenir en la transmissió dels virus vegetals quan, com en el nostre cas, al laboratori s'inocula el virus en unes plantes determinades per tal de poder realitzar experiments, o també es poden transmetre sense intenció quan s'utilitzen les mateixes eines de camp per a plantes infectades que per a plantes sanes (Figura 7).

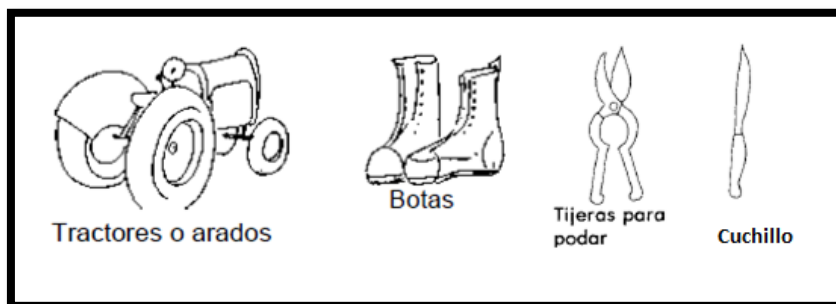


Figura 7. Diferents eines i elements que poden actuar com a vector. Font: Agrios, G. 1988.

La transmissió per propagació vegetativa es produeix quan una planta infectada es propaga o multiplica utilitzant parts d'aquesta planta, com ara: esqueixos, bulbs, tubercles, estolons, estaques, rizomes o empelt. Això és degut a que si la planta mare està infectada per un virus, els òrgans emprats per a la multiplicació també estaran infectats i, per tant, les plantes que creixin a partir d'aquests també estaran infectades (Figura 8).

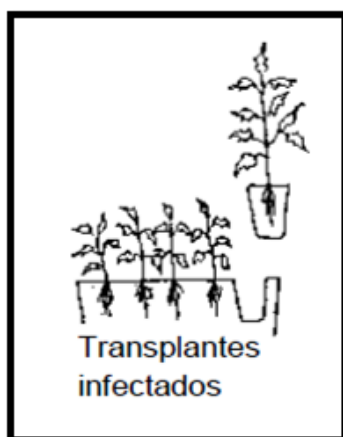


Figura 8. Transmissió de virus mitjançant la propagació vegetativa. Font: Agrios, G. 1988.

En la natura, la transmissió mecànica de virus vegetals mitjançant la transferència directa de la saba a través del contacte entre dues plantes, no és comú. Tot i així, podria tenir lloc entre dues plantes molt properes i amb l'ajuda d'un fort vent que provoqués una mútua i forta fricció que, com a conseqüència, causés una lesió en les dues plantes i així donés lloc a l'intercanvi de les seves sabses.

Són escassos els virus vegetals que es poden transmetre mitjançant les llavors de plantes infectades (Figura 9), generalment en aquests casos el virus es mou a través de l'òvul de la planta infectada i no acostuma a sortir a través del pol·len que fabrica la flor. Els virus vegetals que es transmeten mitjançant el pol·len infecten la llavor i les plàntules que creixen a partir de les llavors. A més, aquests virus poden desplaçar-se a través de la flor fertilitzada i infectar la resta de les estructures de la planta mare.



Figura 9. Llavor infectada amb virus. Font: Agrios, G. 1988.

### **2.2.3 Síntomes**

Els virus causen una sèrie de símptomes molt diversos que depenen completament de l'hoste i del virus. Els símptomes es produeixen per la interacció entre l'efecte depressiu, degut a la multiplicació del paràsit, i a la reacció de defensa de la planta.

## 2.3 Els virus vegetals estudiats

Els virus vegetals utilitzats per a l'experimentació en aquest treball són: en el tomàquet, *Potato Virus X* i en el panís, *Maize dwarf mosaic virus*. Tots dos patosistemes es descriuen a continuació (Melgarejo, P. *et al.*, 2004-2008).

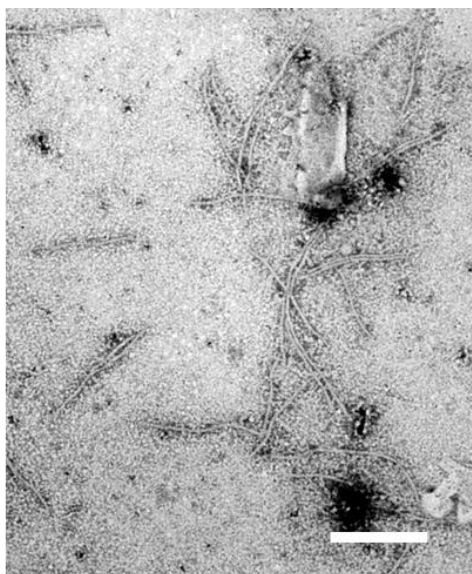
### 2.3.1 *Potato Virus X* (PVX)

El PVX és el virus més estès de la patata, que infecta diversos cultius de solanàcies (*Solanaceae*) com ara la patata, el tomàquet, el tabac, el pebrot i l'albergínia, així com les espècies experimentals de *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae* i *Fabaceae*. El PVX pertany a la família *Alphaflexiviridae* i és membre típic del gènere *Potexvirus*.

Les seves partícules virals flexuoses i filamentoses són d'uns 470-580nm de longitud (Fauquet *et al.*, 2005) i 13nm de diàmetre. Està recobert de subunitats de proteïna de coberta (Figures 10 i 11). El virus té una estructura helicoidal amb una sola molècula de RNA monocatenària amb sentit positiu de 6,4 kb. L'àcid nucleic suposa el 6% del virió.



Figura 10. Esquema d'un viró filamentós recobert de subunitats de proteïna de coberta (CP). Font: Viral Zone, 2008.



**Figura 11. Purificat de Potato Virus X observats en el microscopi electrònic amb tinció negativa. (Barra=500nm) Autor: Dr. Vicente Medina.**

El PVX normalment es transmet mecànicament i per contacte entre plantes infectades i sanes, a causa de la seva alta concentració en els teixits vegetals.

Els símptomes produïts pel PVX són variables i depenen de la varietat de tomàquet. En general, produeix símptomes no visibles o lleus i se'l coneix com virus latent de la patata (*Potato Latent Virus*) o virus del mosaic lleu de la patata (*Potato Mild Mosaic Virus*). En la patata els símptomes poden ser un mosaic internervial molt suau o poden ser asimptomàtics, és a dir que no presenta cap símptoma. En alguns casos causa deformacions, taques cloròtiques i nanisme. En el tabac i el tomàquet produeix mosaic lleu (Figura 12), clapejat necròtic i, en infeccions greus, pot causar taques i anells necròtics.





**Figura 12.** Síntomes de mosaic lleu induït en una fulla de tomaquera per PVX. Autora: Laura Arcal.

Les pèrdues de rendiment que causa el PVX són generalment d'un 15%, però també pot produir danys d'un 30% quan es troba en infeccions mixtes amb altres virus (Khurana *et al.*, 1988), per exemple quan la infecció és conjunta amb el *Potato Virus A* produeix un símptoma més greu de mosaic rugós.

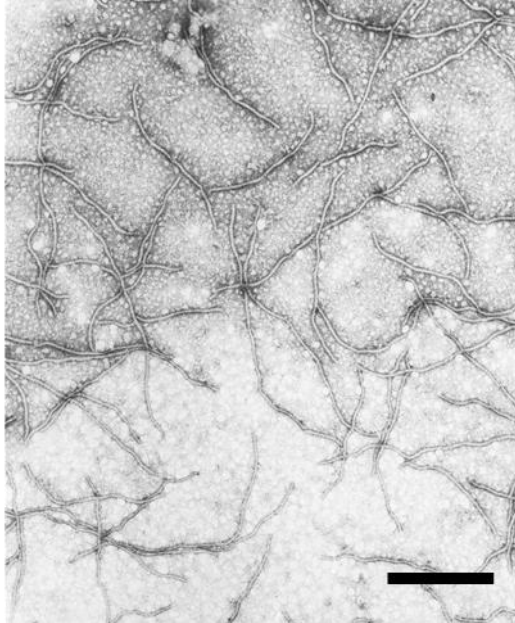
El PVX es troba àmpliament distribuït per tot el món.

### **2.3.2 Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV)**

El MDMV és un virus patògen vegetal de la família *Potyviriidae* i del gènere *Potyvirus*, aparentment infecta només la família *Gramineae* mitjançant la transmissió mecànica. Els seus hostes naturals són: la canyota (*Sorghum halepense* L.), les setaries (*Setaria itàlica* i *S. verticillata* L.), el sorgo (*Sorghum* spp.), *Phalaris arundinacea* (L.) i altres espècies d'herbes. També infecta espècies cultivades, com el panís (*Zeamays*, L. 1753).

Les seves partícules virals flexuoses i filamentoses tenen 750nm de longitud i 13nm de diàmetre (Figura 13). El genoma és una única molècula lineal de RNA

monocatenari i amb sentit positiu de 9,5 kb. Els virions es troben principalment dispersos en el citoplasma de les cèl·lules del mesòfil a les parts infectades de la planta. A les cèl·lules infectades s'observen inclusions del tipus "pinwheel" que, en seccions transversals, es poden observar en forma de cabdells, rotllos i tubs.



**Figura 13. Purificat de Maize Dwarf Mosaic Virus en microscopi electrònic amb tinció negativa. (Barra=500nm) Autor: Dr. Vicente Medina**

El MDMV es pot transmetre per inoculació mecànica, pot propagar-se amb les llavors o per la fricció entre fulles infectades i fulles no infectades, però la transmissió més comuna és mitjançant dotzenes d'espècies d'àfids (pugons) de manera no persistent, és a dir que el virus no forma part del vector, sinó que només hi està adherit (Williams i Pataky, 2012).

Quan el MDMV infecta fulles joves, poden experimentar taques cloròtiques que poden arribar a convertir-se en un patró de mosaic o clapejat (Figura 14). Aquesta malaltia dificulta el creixement de la planta i causa fins a un 70% de pèrdua en el rendiment (Gregory i Ayers, 1982). A més, en el panís causa el nanisme, i en el sorgo, el mosaic pot anar acompanyat de lesions porpres i necròtiques.



Figura 14. Síntomes produïts per MDMV en planta del panís. Autora: Dra. M. A. Achón.

El MDMV és la malaltia viral més important en el sorgo, causant fins al 100% de pèrdua de rendiment en alguns conreus de sorgo susceptibles. En el panís, el MDMV causa una reducció de la mida de les plantes, de les panotxes i consegüentment de la producció de gra. Pot arribar a causar reduccions de la collita superiors al 50%, es troba distribuït en moltes zones (Figura 15).

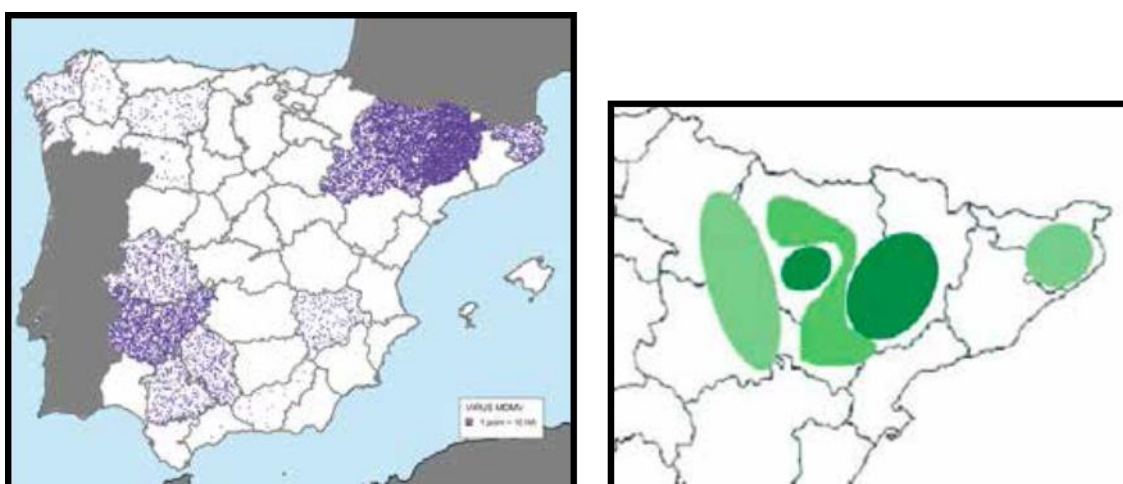


Figura 15. Mapes de la distribució geogràfica del virus MDMV en el panís. La imatge de l'esquerra és d'Espanya i la imatge de la dreta és de la Vall de l'Ebre. Font: M. A. Achón. ( Querol, A., et al. 2014.)

## **2.4 La resistència de les plantes**

Les plantes interactuen constantment amb una gran diversitat de patògens (virus, bacteris, fongs, oomicets, nematodes...) i plagues (insectes herbívors, àcars...). Per això, les plantes han hagut de desenvolupar mecanismes que els permeten defensar-se mitjançant un sistema complex que inclou múltiples nivells de protecció. La interacció que hi ha entre un patògen determinat i una espècie de planta és específica i invariable (Luz-Nelly Diaz-Puentes, 2012).

L'activació de les defenses de les plantes comença quan es reconeixen en els patògens molècules efectores, generals o específiques (Flor H., 1971).

Pocs segons després de detectar els efectors, s'inicia la resposta de la planta amb l'augment en l'expressió dels gens relacionats amb les defenses que provoquen l'enfortiment físic de les parets cel·lulars degut a la producció de lignines i la formació de calls (zones endurides), es dispara la producció de fitoalexines i s'indueix la producció de proteïnes antimicrobianes a causa de l'expressió dels gens PR (proteïnes relacionades amb la patogènesi). Aquesta resposta genera una alta producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS: espècies reactives d'oxigen) que induïx la lisi de les cèl·lules que estan a prop del patògen. Es coneix aquesta lisi induïda com a resposta hipersensible (HR: resposta hiperactiva) i en interaccions incompatibles la HR bloqueja l'avanç del patògen (Wiermer, M., *et al.*, 2005) (Mayer, A.M., *et al.*, 2001) (Ballaré, 2011).

El procés d'augment en l'expressió dels gens relacionats amb la defensa està regulat per molècules de senyalització com l'etilè, l'àcid salicílic (SA) i l'àcid jasmònic (JA) (Glazebrook, 2005) (Pieterse, *et al.*, 2006).

L'any 1909 es va demostrar per primer cop la resistència sistèmica adquirida (SAR) de les plantes enfront de les infeccions, quan Bernard va demostrar que embrions d'orquídies amb presència de fongs que no van ser infectats per aquests, van ser posteriorment més resistents a fongs altament virulents. Anys després, al 1933, Chester va anomenar aquest fenomen com a "Protecció Creuada" (Grant i Lamb, 2006). Actualment s'ha canviat el terme "Protecció

Creuada” pels termes resistència sistèmica adquirida i resistència sistèmica induïda (ISR) (Durrant i Dong, 2004).

La SAR està associada a les respostes davant de patògens, mentre que la ISR està associada a la capacitat de les rizobacteries per a promoure el creixement de la planta i protegir-la contra patògens (Liu *et al.*, 2008) (Korolev *et al.*, 2008).

#### **2.4.1 Resistència sistèmica adquirida**

Si les plantes sobreviuen a un atac inicial de patògens com virus, fongs o bacteris, també podran protegir-se contra atacs posteriors. S’ha observat que això és degut a que el primer patògen infectant “immunitza” la planta, és a dir, indueix l’expressió de reaccions de resistència contra infeccions posteriors per patògens homòlegs, encara quan la planta no porta gens determinants de la resistència específica del cultiu. La capacitat de les cèl·lules per repel·lir els atacs subsegüents es dispersa a través de tota la planta i s’anomena aquesta resposta com a SAR (G. Camarena i De la Torre R., 2007).

La SAR forma part del sistema immunològic de la planta i és estimulada pels patògens durant la infecció, o també es pot estimular mitjançant productes que actuen a través d’una ruta indirecta. És una resposta de defensa activa de les cèl·lules de la planta per repel·lir sistèmicament els atacs subsegüents. Aquesta resposta s’associa a una alta expressió de gens PR (Hammerschmidt, 1999). En la majoria dels casos, la SAR és igualment efectiva contra fongs, bacteris, virus o nematodes, independentment de l’organisme inductor (Ryals *et al.*, 1996).

En general, la SAR s’esdevé en dues etapes. La primera s’anomena resposta local i consisteix en la inducció de les defenses a les cèl·lules properes a l’atac del patògen, i la segona etapa realitza la inducció de les defenses en els teixits allunyats del focus de la infecció i aporta protecció sistèmica a la planta davant d’una gran varietat de patògens (Vlot *et al.*, 2009) (Hayat *et al.*, 2010). El temps i el grau de protecció de la SAR depenen de l’espècie vegetal i de l’inductor (Sticher *et al.*, 1997; Vlot *et al.*, 2008; Moffat, 1992).

La SAR es caracteritza per l'acumulació de proteïnes PR i de SA o de JA a nivell local i sistèmic. És per això que l'anàlisi d'expressió dels gens PR s'utilitza freqüentment com a indicador de SAR (Vlot *et al.*, 2009) (Ong *et al.*, 2009).

La manifestació de la SAR de forma sistèmica en la planta implica l'existència d'algun sistema de senyals capaces de transmetre's a través dels teixits (Figura 16). Les investigacions realitzades demostren que la SA és la molècula que ha demostrat majors evidències d'estar involucrada en les vies de SAR (Mauch-Mani i Métraux 1998). Per aquesta raó, la inducció de la SAR acostuma a relacionar-se amb increments en l'acumulació de SA, tant localment com sistèmicament (Lawton *et al.*, 1995).

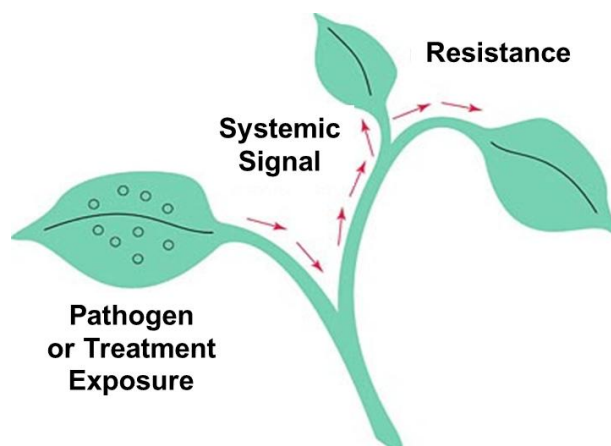


Figura 16. Resposta SAR de les plantes. Font: [www.plantasrobustas.org](http://www.plantasrobustas.org)

#### 2.4.1.1 Àcid salicílic (SA) / Relació SA Planta

La relació de SA amb la inducció de SAR en el sistema immunològic de la planta ha estat estudiada en els últims anys per Jones i Dangl (2006), amb especial interès sobre el seu possible paper en el control de diferents malalties de les plantes i la seva participació en la inducció de les proteïnes relacionades amb la patogènesi en diversos cultius.

L'àcid salicílic se sintetitza per la via del metabolisme fenilpropanoide des de l'àcid cinàmic i l'àcid benzoic. S'acumula intercel·lularment en un receptor

específic o s'uneix a l'enzim catalasa. Normalment la catalasa protegeix la planta contra l'estrès oxidatiu exercit per les espècies reactives d'oxigen. Tot i així, aquesta activitat de la catalasa és bloquejada per la unió de l'àcid salicílic (Chen *et al.*, 1993). Així que, alterant la quantitat d'àcid salicílic dins de la cèl·lula, es pot regular el nivell de les espècies reactives d'oxigen com el peròxid d'hidrogen. Si en una cèl·lula hi ha poca quantitat d'àcid salicílic i, d'aquest, està una mica unit a la catalasa, no impedeix que la catalasa pugui mantenir el nivell d'espècies reactives de l'oxigen baix. En canvi, si els nivells de l'àcid salicílic són alts i, per tant, l'activitat de la catalasa és baixa, fa que hi hagi un nivell alt d'espècies reactives de l'oxigen realitzant la síntesi de nombroses proteïnes PRs.

Les proteïnes PRs s'acumulen en l'espai intercel·lular i en els vacúols, i moltes d'elles presenten una activitat antimicrobiana *in vitro*, a més, alliberen molècules que podrien addicionalment induir les defenses i potenciar la resposta de la planta. La resistència a una malaltia està donada per nombroses proteïnes PRs que actuen en conjunt. (Niderman *et al.*, 1995) (Jaulneau *et al.*, 2010).

S'ha establert que el SA pot interferir en tres etapes principals del cicle de la patogenicitat del virus incloent la replicació, el moviment de cèl·lula a cèl·lula i el moviment de llarga distància (Aminalah *et al.*, 2011).

L'àcid salicílic té un paper molt important en la SAR perquè d'ell depenen les senyalitzacions que es produeixen en cascada com a resposta de la planta davant d'una infecció (Figura 17).

L'aplicació exògena de SA pot influir en els processos fisiològics com la taxa de transpiració, el tancament dels estomes, el creixement i la fotosíntesi (Larqué-Saavedra, 1979, 2010; Rai *et al.*, 1986; Gunes *et al.*, 2006; Arfan *et al.*, 2007).





metabòliques alterades per l'àcid jasmònic i l'etilè, i és independent de l'expressió dels gens relacionats amb la patogènesi i l'àcid salicílic (Pieterse i Van Loon, 1999).

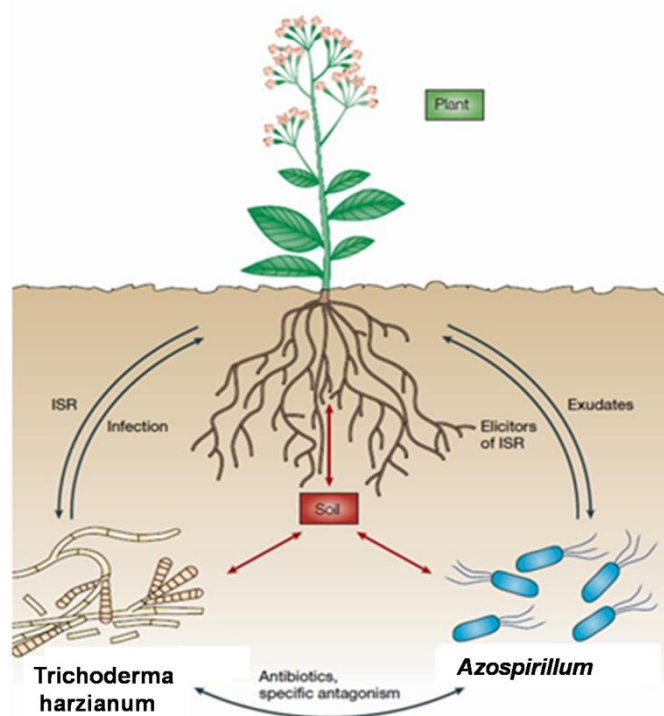


Figura 18. Resposta sistèmica induïda a causa d'un bacteri. Font: <http://platf.biocomputing.ci>

Les PGPR són un grup de diferents espècies de bacteris que incrementen el creixement i la productivitat vegetal. Habiten la rizosfera de les plantes i interaccionen amb la seva fisiologia produint respostes de biofertilització (fixació de nutrients) i biocontrol de malalties (immunitat induïda).

Ja al 1987 Ordentlich *et al.* van demostrar que les PGPR controlen els patògens. Els mecanismes de control coneguts són la competència i el desplaçament de patògens (Elad i Chet, 1987), la inhibició de la germinació de llavors de males herbes parasitàries, la millora general de les plantes a resistir la infecció per patògens i la possible inhibició del creixement de la paret cel·lular fúngica (que ofereix protecció a la cèl·lula) a través de la producció de substàncies tòxiques microbianes, aquestes toxines són produïdes per microorganismes (incloent-hi bacteris i fongs) i provoquen infeccions, malalties i causen danys mitjançant la desactivació del sistema immune. (Kloepper i Schroth, 1978; Thomashow i Weller, 1988; Weller, 1988).

Segons Maheshwari (2011) les PGPR més conegudes pertanyen als gèneres: *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* i *Serratia*.

Factors ecològics com la temperatura i les condicions nutricionals del sòl afecten el comportament de les PGPR. Per exemple, la inoculació bacteriana té un millor efecte estimulador del creixement vegetal en condicions de sòls deficientes en nutrients que en sòls fèrtils o rics (Egamberdieva, 2012).

*L'Azospirillum brasilense* pot ser un inductor de ISR i és la PGPR del present estudi.

#### **2.4.2.1 Gènere *Azospirillum* / Relació *Azospirillum* Planta**

Al 1925, Beijerinck va descobrir el gènere actual d'*Azospirillum*, i el va anomenar "*Spirillum lipoferum*". Actualment el gènere *Azospirillum* spp. s'ha convertit en un model per als estudis genètics de bacteris associats a plantes en general. Els principals estudis que s'han realitzat amb *Azospirillum* spp. tracten sobre estudis genètics de gairebé tots els aspectes del bacteri i la seva associació amb les plantes. Per això, *Azospirillum* spp. és una peça fonamental de les investigacions relacionades amb la rizosfera. La rizosfera és la zona que envolta les arrels de les plantes i on es produeixen les interaccions de les arrels amb els microorganismes del sòl. (Bashan y Holguin, 2002; Bashan *et al.* 2004; Dobbelaere *et al.* 2003; Johri *et al.* 2003; Puente *et al.* 2004).

*Azospirillum* és un gènere de bacteris que inclou sis espècies entre les quals es troba *A. brasilense*. Pertany a l'ordre *Rhodospirillales* i a la classe Proteobacteris, concretament *AlphaProteobacteris*. Tots els Proteobacteris són gramnegatius (es tenyeixen d'un color rosat en la tinció Gram). Els bacteris grampositiu i gramnegatiu es diferencien principalment per la paret bacteriana. La paret bacteriana gramnegativa està composta per dues membranes lipídiques i entre elles té una fina paret cel·lular de peptidoglicans, mentre que la paret bacteriana grampositiva està formada per una membrana lipídica i una paret de peptidoglicans més gruixuda (Figura 19).

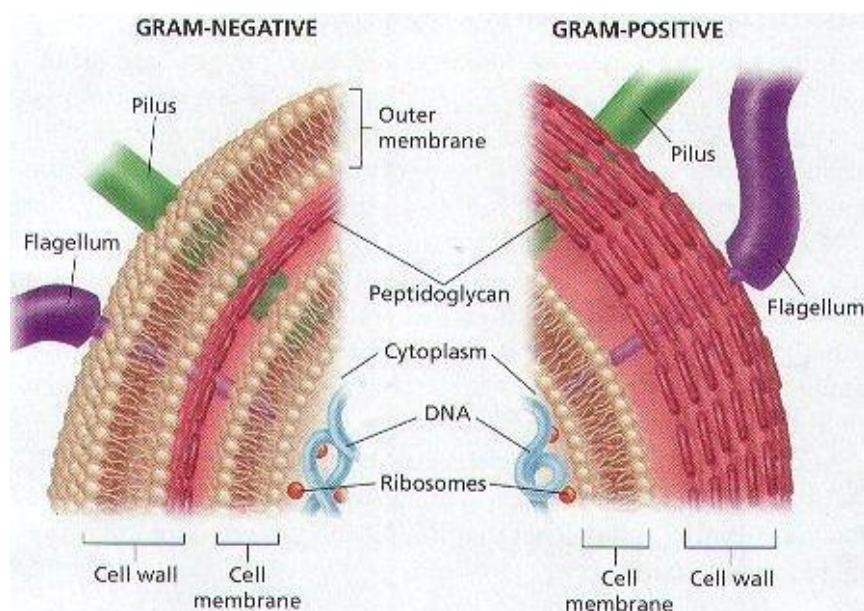


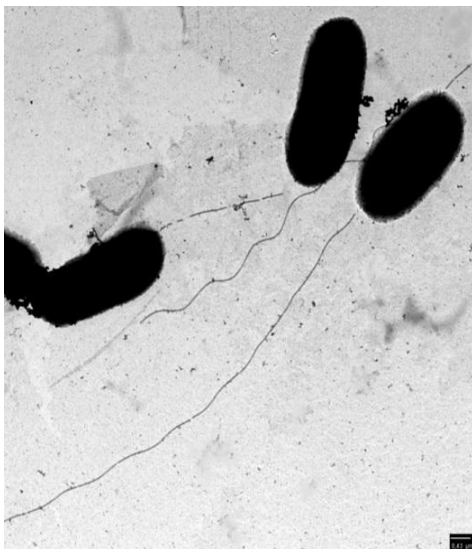
Figura 19. Comparació de les parets bacterianes dels bacteris gramnegatiu i grampositiu. Font: <http://desdeelestealoeste.blogspot.com>

*Azospirillum* s'ha aïllat de sòls rizosfèrics diversos, com de terrenys desèrtics i sòls salins, associats amb nombroses espècies vegetals tant gramínies com lleguminoses. Aquesta característica ha permès senyalar-lo com a colonitzador inespecífic o universal, i mostra a més, que s'adapta en condicions d'estrès abiòtic (produït per factors del medi ambient com sequeres, calor, fred o salinitat), favorables per al seu ús com a inductor de resistència en vegetals exposats a condicions diverses (Barassi *et al.*, 2007). *Azospirillum* s'adhereix a les arrels mitjançant una xarxa de proteïnes i un material fibril·lar (Steenhout i Vanderleyden, 2000). Posteriorment entra a la planta, on es pot trobar tant en espais intercel·lulars, dins dels teixits radiculars, com intercel·lularment en cèl·lules mortes (Krieg i Döbereiner, 1984) a més pot habitar diferents zones de l'arrel.

Dins el gènere d'*Azospirillum* hi ha sis espècies. L'espècie estudiada és *A. brasilense* (Figura 20). Té la capacitat de produir i alliberar substàncies reguladores del creixement vegetal, com fitohormones (hormones vegetals) utilitzar el complex enzimàtic de la nitrogenasa per induir la producció d'òxid nítric, molècula reguladora del creixement d'arrels laterals i pèls radicals, fet que augmenta la superfície d'absorció de la planta i que causa una major absorció de nutrients, augmenta la clorofil·la, per tant també la fotosíntesi i

participa en la senyalització d'IRS (Bashan i Levanony, 1990; Okon i Labandera-González, 1994; 2002; Creus *et al.*, 2005).

L'efecte beneficiós que exerceix en el control de malalties bacterianes i fúngiques, tant foliars com vasculars, es coneixen per Bashan i De Bashan, 2002; Tortora *et al.* (2011 i 2012), però la seva acció antiviral ha estat escassament estudiada per Rakib *et al.* 2011.



**Figura 20.** *Azospirillum brasilense* sp245 en microscopi de transmissió i tinció senzilla. (Barra=0,43µm) Autora: Paula Meler.

### 3. Objectius i hipòtesis

L'experiment del present treball consisteix en aplicar diversos tractaments al cultiu de tomàquet i panís, per estudiar com responen enfront als patògens PVX i MDMV, respectivament, i com influeixen l'àcid salicílic i l' *A. brasilense* en la defensa de les plantes.

Com acabem de veure en el marc teòric, **la hipòtesi** del treball és que el fet de tractar les plantes amb l'àcid salicílic o inocular-les amb el bacteri *A. brasilense* fa que desenvolupin resistència i protecció enfront les posteriors infeccions que, en aquest cas, seran dels virus descrits.

Per tant, a partir d'aquesta hipòtesi, en el treball em proposo els següents objectius:

1. Reviure el bacteri *A. brasilense* i aprendre a mantenir-lo.
2. Inoculació del bacteri en llavors i plàntules.
3. Inoculació mecànica de virus.
4. Veure l'efecte de la infecció de PVX i MDMV a les cèl·lules infectades de tomaquera i panís, respectivament, utilitzant un microscopi electrònic de transmissió.
5. Comparar l'efecte d'*A. brasilense* i l'àcid salicílic sobre les plantes tractades, tant en els paràmetres de desenvolupament com en els fisiològics, quan la planta està o no infectada amb PVX i MDMV.

## 4. Material i mètodes

### 4.1 Maquinària

**Agitador:** És un aparell que quan es posa en funcionament fa oscil·lar horitzontalment la placa de la superfície per l'acció d'un motor elèctric. S'utilitza per barrejar líquids o preparar dissolucions i suspensions. S'hi poden col·locar molts tipus de recipients, però en el cas dels tubs Falcon® i els Eppendorf®, per exemple, cal que se subjectin a la placa amb una cinta adhesiva perquè no caiguin (Figura 21).



Figura 21. Agitador horitzontal

**Agitador magnètic:** És un aparell que s'utilitza per preparar dissolucions i, en aquest cas també medis de cultiu. Per poder realitzar la seva funció necessita un imant recobert de tefló, aquest s'introdueix en el recipient que es col·loca sobre la superfície de l'agitador, sota la qual hi ha un altre imant o conjunt d'electroimants que formen un moviment de rotació i, com a conseqüència, l'imant del recipient fa un moviment circular. Finalment, per retirar-lo del recipient, cal una barra llarga imantada a l'extrem (Figura 22).



Figura 22. Agitador magnètic amb els imants al davant.

**Agitador vòrtex:** És un aparell que s'utilitza per agitar tubs o altres recipients amb líquids. La superfície de l'agitador vibra, degut a un motor elèctric, quan els recipients s'hi subjecten fent una mica de pressió. La peça de la superfície està feta de goma o cautxú i té una forma de copa, lleugerament excèntrica (Figura 23).



Figura 23. Agitador vòrtex.

**Autoclau:** És un aparell amb un sistema de tancament hermètic on es forma vapor d'aigua sotmès a una pressió elevada. S'arriba a una temperatura de 121°C i provoca la mort dels microorganismes i la destrucció d'espores. S'utilitza per esterilitzar el material de laboratori, medis de cultiu i residus, normalment es programa a una temperatura de 121°C durant 21 minuts. Està format per un recipient amb una resistència al fons, diverses vàlvules, un manòmetre i un termòmetre per poder controlar la pressió i la temperatura a l'interior (Figura 24).



**Figura 24.** Autoclau 1 per a residus, autoclau 2 i 3 per a material i medis.

**Bàscula:** És un aparell que s'utilitza per a determinar la massa dels productes. Rang 0,01g fins a 2200g. Error $\pm$  0,02g.

### **Cambrà Frigorífica (4 °C).**

**Campana de Flux Laminar:** És un recinte amb superfícies fàcils de netejar i desinfectar, amb un flux d'aire filtrat a través de prefiltres que retiren les partícules més grans i filtres HEPA (High Efficiency Particulate Air), que són d'alta eficiència, capaços de retenir partícules  $\geq 0.3\mu\text{m}$  amb una eficiència mínima del 99,97%. Tot l'aire de la zona de treball passa pels filtres HEPA i produeix un flux unidireccional, perquè l'aire es mou a través dels filtres amb una velocitat uniforme al llarg de les línies paral·leles, de manera que s'aconsegueix l'eliminació de les partícules presents. Segons la ubicació del filtre HEPA es distingeixen les campanes de flux laminar horitzontal i les campanes de flux laminar vertical. La campana de flux laminar que he utilitzat és horitzontal, té el filtre HEPA situat en la part posterior de la campana, per la qual cosa el flux d'aire unidireccional es mou a través de línies paral·leles horitzontals, és a dir, des de la part posterior de la campana cap a l'operador. Abans d'utilitzar-la, cal que la llum UV (raigs ultraviolats) estigui encesa durant 15 minuts perquè el recinte s'esterilitzi juntament amb el material que s'haurà d'utilitzar. Passats els 15 minuts, es tanca la llum UV, s'obre el sistema de ventiladors i la llum normal, llavors ja es pot treballar. La llum UV és perillosa i



## Material i mètodes

per això s'ha d'anar amb cura i no tocar-la ni mirar-la directament. Per a mantenir l'esterilitat és necessari netejar la superfície de la campana amb alcohol del 70% i netejar-se les mans, també amb alcohol, cada cop que posem les mans dins la campana (Figura 25).

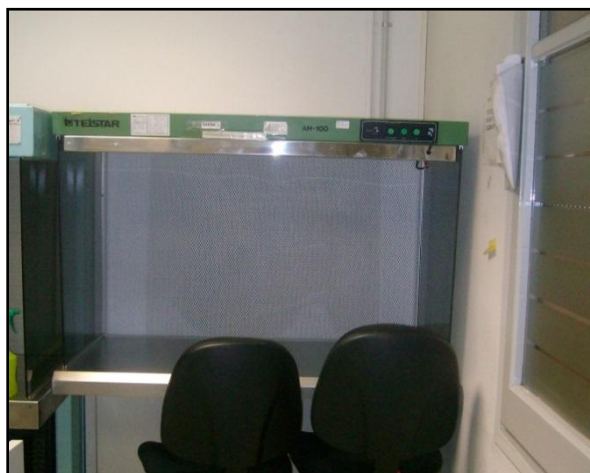


Figura 25. Campana de flux laminar horitzontal.

**Espectrofotòmetre:** És un aparell que s'utilitza per a mesurar la densitat òptica d'una mostra. Il·lumina la mostra amb llum blanca i calcula la quantitat de llum que es reflexa en una determinada longitud d'ona. A la primera mostra li dóna valor 0 i la compara amb les següents per saber la quantitat de solut d'una mostra respecte a una altra. L'espectrofotòmetre en el qual vaig treballar és l'Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Biosciences), espectrofotòmetre de microplaca Model 680 (Bio-Rad) (Figura 26).



Figura 26. Espectrofotòmetre amb algunes cubetes d'espectrofotometria a l'interior.

**Estufa (32 °C).**

**Microcentrífuga:** És un aparell que utilitza la força centrífuga formada en els moviments de rotació per separar sòlids suspesos en un medi líquid o per separar líquids amb diferents densitats (Figura 27).



**Figura 27. Microcentrífuga.**

**pH-metre:** És un aparell amb un sensor que s'utilitza per mesurar el pH d'una dissolució (Figura 28).



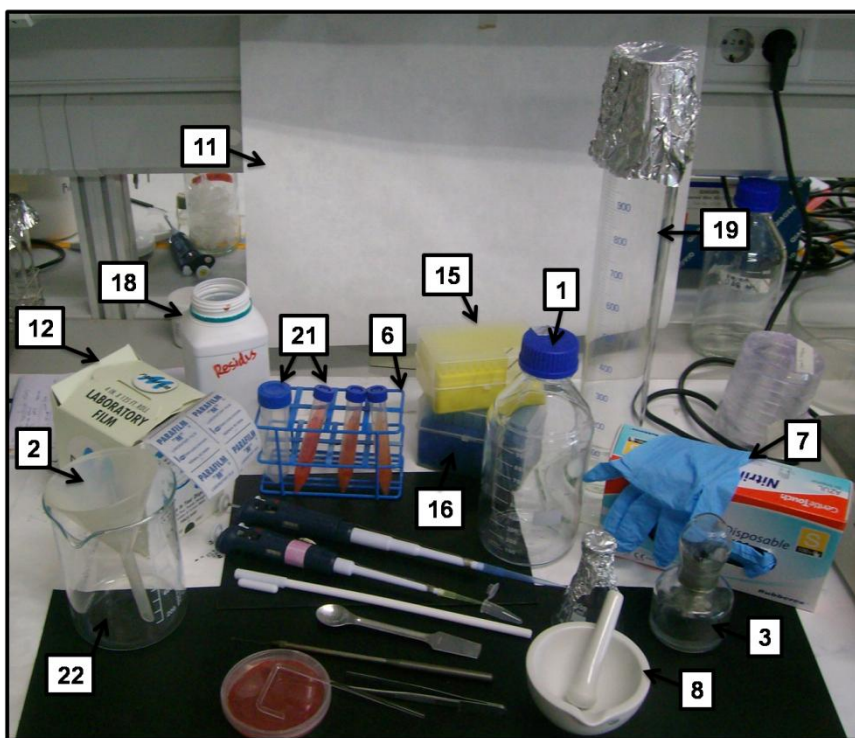
**Figura 28. pH-metre.**

## 4.2 Material general

Tot el material de laboratori, abans de ser utilitzat, cal netejar-lo en el rentavaixelles, després posar-lo a l'autoclaui cobert amb alumini i amb la cinta d'autoclaui (Figura 29), per esterilitzar-lo. Finalment, cal posar-lo a l'estufa perquè s'eixugui. Quan el material ha passat per tots aquests passos ja està estèril i preparat per a ser utilitzat.



Figura 29. Material de laboratori dins l'autoclaui.



1. Botelles de 50mL, 100mL, 1L ...
2. Embut.
3. Encenedor o fogó Bunsen
6. Gradeta.
7. Guants de làtex.
8. Morter de porcellana i mà de morter.
11. Paper de filtre.
12. Parafilm®.
15. Pipeta de 200  $\mu$ l (0,2mL) i puntes de pipeta 200  $\mu$ l (grogues).
16. Pipeta de 1000  $\mu$ l ( 1mL) i puntes de pipeta 1000 $\mu$ l (blaves).
18. Pot de residus.
19. Provetes de 100mL, 1L, ...
21. Tubs Falcon®.
22. Vasos de precipitats de 50mL, 500mL, 1L, ...

Figura 30. Material de laboratori general-1.

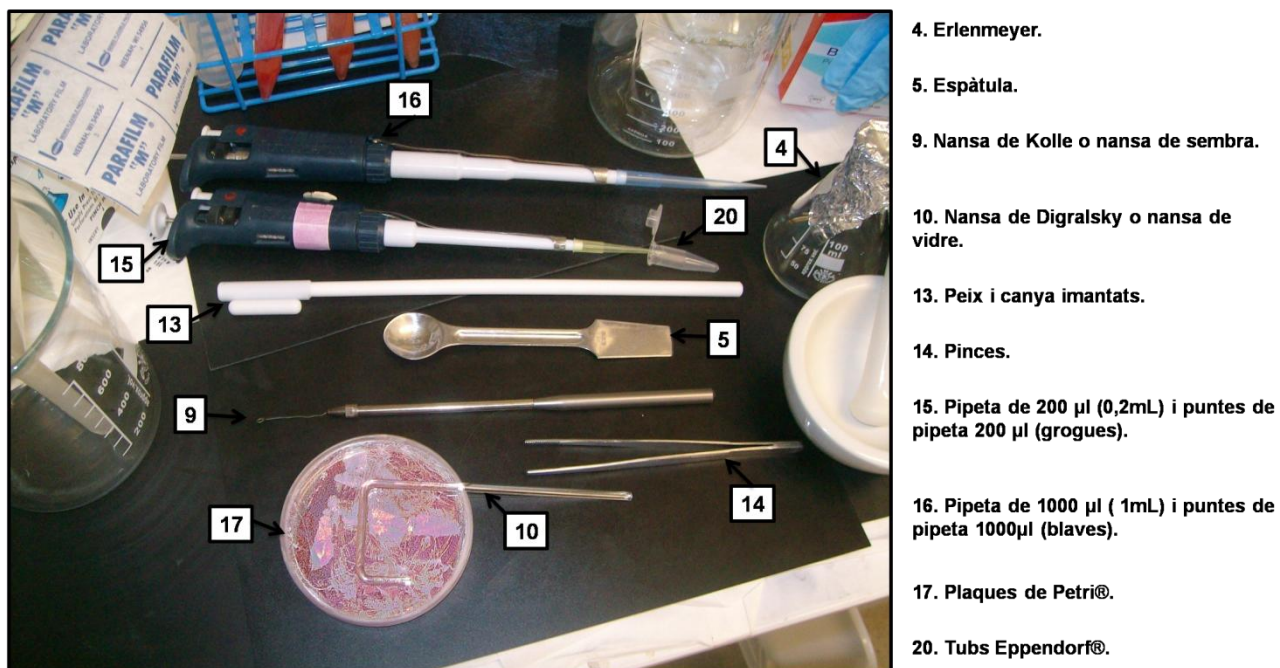


Figura 31. Material de laboratori general-2.

A continuació, faré una petita explicació sobre alguns dels materials utilitzats:

**Cubeta d'espectrofotometria:** És un tub petit, tancat per un dels extrems i obert per l'altre pel qual s'introdueix la mostra. És de plàstic, vidre o quars perquè són materials transparents a la llum ultraviolada. Serveix per contenir les mostres quan es mesura la densitat òptica amb l'espectrofotòmetre.

**Etanol 70%:** S'utilitza per desinfectar les mans. El preparam a partir d'Etanol absolut (99%).

**Nansa de Kolle o nansa de sembra (9):** És un instrument que s'utilitza per agafar una colònia de bacteris d'un medi i per sembrar-la en un altre.

**Nansa de Digrafsky o Nansa de vidre (10):** És un instrument que s'utilitza per escampar un líquid damunt d'una superfície sòlida o semisòlida. Abans d'utilitzar-la, cal que s'esterilitzi submergint-la en alcohol i passant-la pel foc.

**Paper d'alumini:** En el laboratori s'utilitza per a pesar els productes i per a cobrir el material de laboratori quan es posa a l'autoclau.

**Paper de filtre (11):** Per esterilitzar paper de filtre, s'ha d'embolicar completament amb paper d'alumini, col·locar la cinta d'autoclau i autoclavar.

**Parafilm® (12):** És una cinta formada per una pel·lícula de plàstic de parafina i amb un suport de paper. Per utilitzar-lo es retira el suport de paper i queda el plàstic, que és elàstic, mal·leable, resistent a l'aigua i translúcid. S'utilitza en el laboratori per segellar tot tipus de recipients com tubs Falcon®, plaques de Petri®, erlenmeyers..., perquè ofereix un tancament hermètic i evita que es contaminin i evaporin els productes.

**Pot de residus (18):** Recipient en el qual es dipositen les puntes de les pipetes, per tal de rentar-les i esterilitzar-les amb la finalitat de poder-les tornar a utilitzar.

Altres materials: encenedor, malla, retolador permanent i tisoires.

### **4.3 Medis de cultiu**

Un medi de cultiu és una solució, una suspensió aquosa o un gel, que conté diversos compostos químics i nutrients necessaris perquè creixin uns microorganismes determinats. També es poden utilitzar per demostrar alguna característica bioquímica dels microorganismes.

**Aigua destil·lada:** És l'aigua a la qual se li treu la majoria de les impureses mitjançant la destil·lació. La destil·lació consisteix en fer bullir l'aigua i condensar el vapor en un altre recipient, eliminant així els sòlids. Per tant, l'aigua destil·lada només està composta per molècules d'H<sub>2</sub>O.

**Aigua destil·lada estèril:** És aigua destil·lada que s'ha esterilitzat posant-la a l'autoclau amb el programa 0, durant 21 minuts i amb una temperatura de 121°C. Amb aquest procés s'aconsegueix que l'aigua no tingui cap microorganisme viu.

**Tampó Fosfat (solució mare):** Es dissolen 4,54g de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K (Fosfat monopotàssic) en 0,5L d'aigua destil·lada i 9,372g de PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> anhidre (Fosfat d'àcid disòdic) en 1L d'aigua destil·lada. Tot seguit es barregen 392mL de la

## Material i mètodes

solució de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  i 608mL de la solució de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , i s'aconsegueix 1L de la solució mare. Autoclavar amb el programa 0, durant 21 minuts i a una temperatura de  $12^\circ\text{C}$ .

**Medi OKON-ALBRECHT-BURRIS (OAB):** Aquest medi s'utilitza per a reproduir el bacteri, *A. brasilense*. Per preparar-lo es dissolen 6g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Fosfat dipotàsic) i 4g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fosfat monopotàsic) cadascun en un vas de precipitats amb 50mL d'aigua destil·lada. Quan els dos productes estan ben dissolts, s'ajunten en una botella i es prepara per autoclavar. En un vas de precipitats amb 800mL d'aigua destil·lada es dissolen 5g d'àcid màlic ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ ), 2mL (10%) de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sulfat de magnesi heptahidratat), 1mL (10%) de NaCl (clorur de sodi), 0,2mL (10%) de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Clorur càlcic hidratat), 0,2mL (1%) de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Molibdat de sodi dihidratat), 1mL (1%) de  $\text{FeCl}_3$  (Clorur de ferro), 1g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Clorur d'amoni), 0,1g d'extracte de llevat, 1mL de solució de micronutrients i 3g de NaOH (Hidròxid de sodi). Quan tot està dissolt s'ha d'ajustar el pH utilitzant una dissolució de NaOH (1M) fins augmentar el pH a 6,8-7. Després s'enrasa amb aigua destil·lada fins a 900mL i es col·loca en una botella per autoclavar. Autoclavar les dues botelles amb el programa 0, durant 21 minuts i a  $121^\circ\text{C}$ . Finalment, quan les dues botelles estan fredes, s'ajunten en la campana de flux laminar.

**Medi ROIG CONGO (RC):** És un medi sòlid que aporta els nutrients necessaris perquè creixi el bacteri *A. brasilense*. Per preparar-lo es dissolen en 500mL d'aigua destil·lada 5g d'àcid màlic, 5mL (10%) de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (fosfat dipotàsic), 2mL (10%) de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sulfat de magnesi heptahidratat), 1mL (10%) de NaCl (Clorur de sodi), 0,5g d'extracte de llevat, 1,5mL (1%) de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Clorur de ferro hexahidratat) i 4,7g de KOH (Hidròxid de potassi). Quan tot està dissolt, ajustar el pH utilitzant una dissolució de NaOH (0,1M) fins augmentar el pH a 6,8-7. Afegir 20g d'Agar i enrasar amb aigua destil·lada fins a 1L. Autoclavar amb el programa 0, durant 21 minuts i a  $121^\circ\text{C}$ . Tot seguit, sense deixar que el medi es refredi, dins la campana de flux laminar, es posen 15mL del colorant Roig Congo. Ara ja està a punt per ser col·locat en les plaques de Petri®.

#### 4.4 Disseny experimental

Aquest treball consta de dos assajos paral·lels, tots dos amb un disseny completament igual, però canviant un factor: l'espècie del tomàquet i del panís.

Per cada factor es van realitzar set tractaments: control sense inocular (C), inoculació de les llavors amb *A. brasilense* (Az), inoculació amb el virus PVX en el tomàquet i MDMV en el panís (V), inoculació de la llavor amb *A. brasilense* i de la plàntula amb el virus (Az+V), tractament de la plàntula amb l'àcid salicílic (SA), tractament de la plàntula primer amb l'àcid salicílic i després inoculació amb el virus (SA+V) i inoculació de la llavor amb *A. brasilense*, tractament de la plàntula amb l'àcid salicílic i inoculació amb el virus (Az+SA+V).

Cada tractament es va fer sobre 5 plantes. En total se sembraren 50 plantes de cada cultiu i se n'utilitzaren 35.

Les Figures 32 i 33 mostren la cronologia de l'experiment i els paràmetres observats. Les mostres es van prendre després de la inoculació del virus als 19 dies en el cas del tomàquet i als 21 dies en el panís. La diferència d'aquests dos dies és perquè la detecció del virus amb ELISA tarda més en MDMV que en PVX.

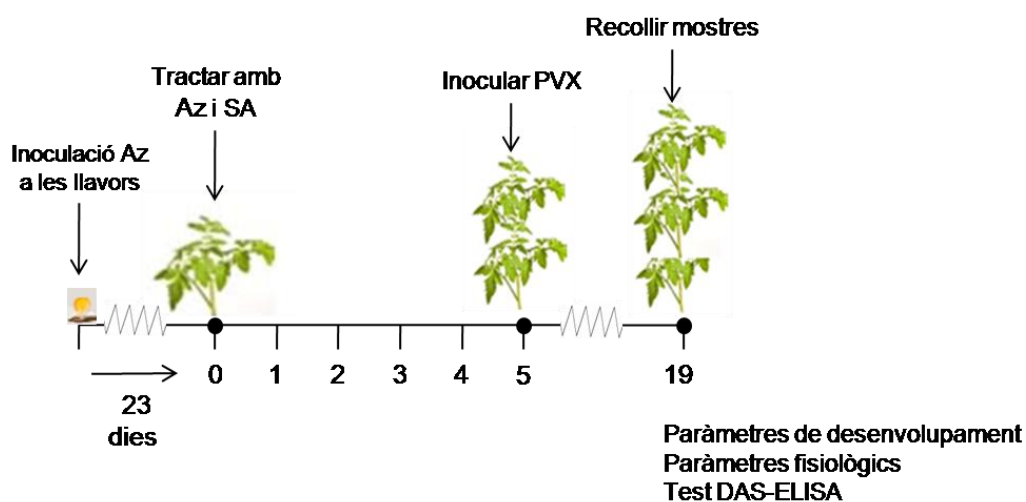


Figura 32. Cronologia dels tractaments i recollida de mostres en tomàquet cv. Boludo, després de 19 dies de la inoculació amb PVX.

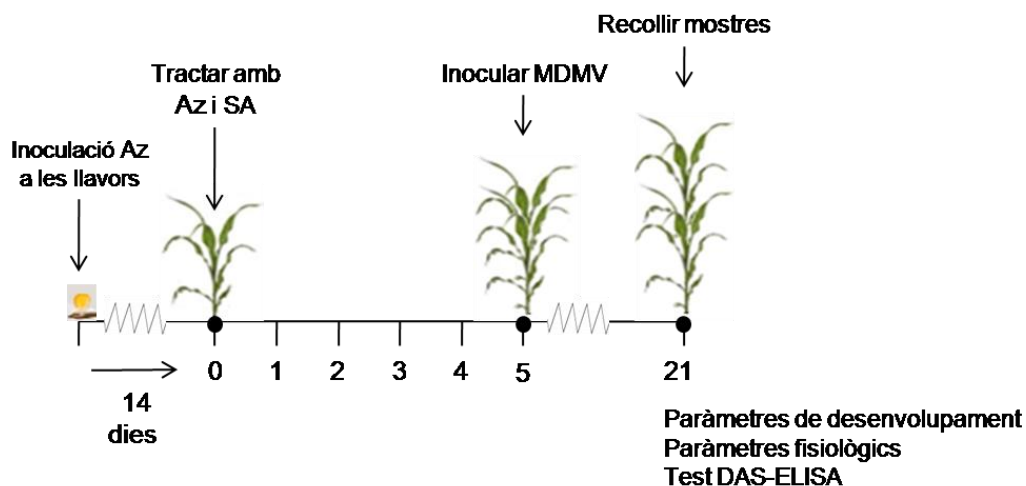


Figura 33. Cronologia dels tractaments i recollida de mostres en panís cv. B73, després de 21 dies de la inoculació amb MDMV.

## 4.5 Material biològic

### 4.5.1 Material vegetal

Es van utilitzar llavors de tomàquet cultivar Boludo i de panís cv. B73.

Es van esterilitzar totes les llavors, cobrint-les amb hipoclorit al 4% (lleixiu) durant 30 minuts en tubs Eppendorf® per al tomàquet, i en tubs Falcon® per al panís. Passats els 30 minuts, en la campana de flux laminar, es netejaren les llavors amb aigua destil·lada estèril utilitzant l'agitador vòrtex. Es realitzaren les neteges fins que les llavors van deixar de fer olor i s'abocaren al paper de filtre estèril per eixugar-les. Vam preparar dos tubs per a cada espècie, en un d'ells les llavors s'inocularen amb *A. brasilense* i en l'altre, les llavors s'utilitzaran per a aquells tractaments en què no s'utilitzi *A. brasilense* (Figura 34).





Figura 34. A) Algun del material utilitzat. B) Llavors cv. Boludo després d'estar 30 minuts amb lleixiu, s'observen els embrions perquè la coberta de la llavor es torna transparent. C) Llavors de panís B73 eixugant-se amb paper de filtre estèril.

Les plantes es van cultivar en l'hivernacle de quarantena (malla interior contra insectes) del grup de Virologia de l'ETSEA (UdL). Es van sembrar les dues espècies de tomàquet i panís, en testos de plàstic amb capacitat per a 3L de substrat. El substrat que es va utilitzar va ser Traysubstrat®, que va ser esterilitzat prèviament autoclavant-lo durant 30 minuts a 121°C.

En altres estudis anteriors del grup s'ha observat que mitjançant la inoculació mecànica dels dos virus del present estudi, el 100% de les plantes s'infectaven.

#### **4.5.2 *Azospirillum brasilense* CECT 590**

Per tal de conèixer el bacteri i poder treballar amb ell, en primer lloc es va aprendre a preparar els medis de cultius (descrits a l'apartat medis), a distribuir-los en plaques de Petri® i a manipular el bacteri, tots aquests passos es varen realitzar dins la campana de flux laminar.

Les plaques amb medi Roig Congo es van preparar de la següent manera: es va seguir el protocol del medi (explicat en l'apartat de medis) i en acabar de posar els 15mL del colorant Roig Congo, es va seguir treballant en la campana de flux laminar perquè el medi no es contaminés i tot quedés estèril. Per a mantenir l'esterilitat és important netejar-se les mans amb alcohol del 70% cada cop que s'introdueixen les mans dins de la campana del flux laminar i passar la boca de la botella per la flama, tant en el moment d'obrir-la com en el de tancar-la. S'ha de tenir cura de no cremar-nos, ja que el medi està molt calent,

## Material i mètodes

però no es pot deixar refredar perquè sinó el medi es torna sòlid a causa de l'agar i llavors no es pot manipular.

A continuació es varen treure de la bossa de plàstic les plaques de Petri® estèrils, es varen destapar i es varen omplir amb 25mL del medi Roig Congo de la botella. Aquesta botella, un cop buida, s'ha de netejar ràpidament per evitar que les restes d'agar s'hi quedin enganxades. Un cop plenes les plaques de Petri®, es varen apilar al fons de la campana de flux laminar fins que el medi es va refredar (Figura 35). Al cap d'uns 15-20 minuts el medi Roig Congo va estar fred i en conseqüència sòlid, aleshores es van tancar cada placa de Petri® amb la tapa corresponent i es van apilar. Per acabar, es varen cobrir i segellar amb la seva bossa de plàstic i utilitzant cinta adhesiva. Finalment, les plaques de Petri® es van guardar al frigorífic fins que les vam utilitzar.



**Figura 35.** A) Colorant Roig Congo estèril a l'esquerra i medi amb agar autoclavat a la dreta. B) Barreja del medi amb el colorant Roig Congo. C) Refredament del medi Roig Congo en plaques Petri®.

Al principi es va intentar aprofitar l'*A. brasilense* d'anys anteriors que estava guardat en plaques de Petri® amb medi Roig Congo dins el frigorífic. En fer les dilucions, observàvem que els valors de l'absorbància eren molt baixos i que el bacteri no creixia correctament sobre el medi Roig Congo, és més, moltes de les plaques es contaminaven i hi creixien altres bacteris, fongs i llevats (Figura 36). Totes aquestes observacions ens indicaven que no teníem el bacteri en bones condicions per poder treballar amb ell.

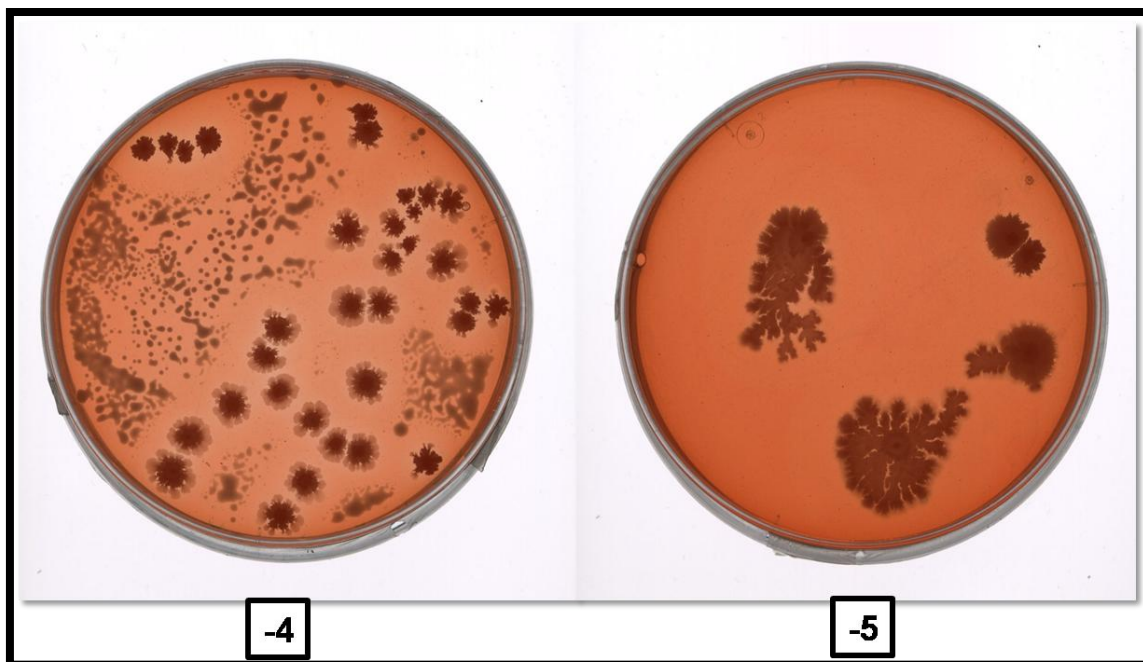
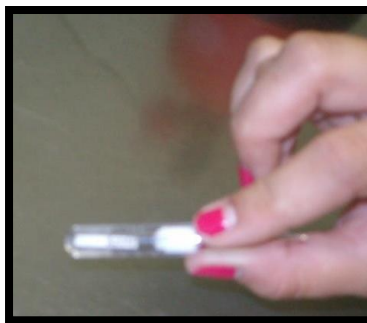


Figura 36. Plaques de Petri® amb medi Roig Congo, sembrades intentant aprofitar l'*A. brasilense* d'altres anys. Són plaques de la dilució -4 i -5, i van sortir contaminades per un fong.

També vam intentar aprofitar el bacteri d'anys anteriors que estava guardat en tubs Falcon® amb medi Roig Congo i altres tubs amb medi lliure de nitrogen. Vam obtenir els mateixos resultats que amb les plaques anteriors.

Per desfer-nos de les plaques de Petri® utilitzades, cal autoclavar-les en l'autoclau de residus, amb el programa 0, durant 30 minuts i a 121°C, així s'esterilitzaran.

Veient que el bacteri no estava en bones condicions per poder treballar amb ell, vam decidir demanar a la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus de la Universitat de València, una nova soca del bacteri *Azospirillum*. Els bacteris van arribar liofilitzats dins d'un tub de vidre (Figura 37). El nom del bacteri és *A. brasilense* spp. 7 (CECT 590). El procés de liofilització consisteix en congelar el producte i posteriorment introduir-lo en una càmera de buit, on es realitza la separació de l'aigua per sublimació. A més s'utilitzen cicles de congelació-sublimació per aconseguir eliminar pràcticament tota l'aigua i conservar l'estructura molecular de la substància liofilitzada.



**Figura 37. Material liofilitzat procedent de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT590), de la Universitat de València.**

Per reviure el bacteri liofilitzat, ens vam protegir els ulls amb unes ulleres de plàstic i vam fer els passos següents, seguint les instruccions de l'annex 1.

Vam començar escalfant l'extrem de l'envàs amb la flama de l'encenedor Bunsen entre 5 i 15 segons. Si el tap del cotó es torna fosc, vol dir que ho hem escalfat massa. Tot seguit, utilitzant la pipeta d'1mL vam tirar, gota a gota, unes 4 gotes d'aigua destil·lada estèril sobre l'extrem de l'envàs. Si el vidre no s'esquerda, s'ha de tornar a escalfar l'envàs i seguir tirant aigua. Després d'esquerdar-se, vàrem fer un cop sec a l'envàs, utilitzant unes pinces esterilitzades amb el foc per a desprendre l'extrem de l'envàs. Seguidament, es retirà el cotó que fa de tap, amb les pinces estèrils. Per acabar, utilitzant la pipeta afegírem 1mL del medi líquid OAB en l'envàs i ho vam deixar reposar durant 20-30 minuts.

Després se sembraren 4 plaques de Petri® amb medi Roig Congo, i posàrem 200µL de la solució de l'envàs a cada placa. Per fer la sembra, vam utilitzar la nansa de vidre, prèviament submergida en alcohol del 70% i la vam passar pel foc per tal d'esterilitzar-la. La nansa s'ha d'esterilitzar cada cop que es canvia de placa. En una altra placa vam posar la resta de solució i el paper de l'envàs que contenia la soca. Finalment vam tancar amb Parafilm® totes les plaques i s'hi anotaren les dades (nom del bacteri i de la soca, data i número de suspensió, per exemple: Azo. br. CECT 590 28/07/14 Sus 1) amb un retolador permanent. Totes les plaques es van deixar a l'estufa durant 24-48 hores perquè el bacteri creixés (Figura 38).



**Figura 38.** Placa sembrada amb la solució de la soca d'*A. brasilense* procedent de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus.

Quan el bacteri creix en les plaques amb medi Roig Congo, absorbeix el color roig i forma colònies.

Després de reviuir el material liofilitzat en plaques de Petri® es va sembrar en diferents plaques. Per això s'utilitza la nansa de sembra, que s'esterilitza prèviament passant-la pel foc fins que es posa al roig viu. Un cop esterilitzada, es va introduir en el medi de la placa per tal que es refredés una mica. A continuació, vam agafar amb la nansa unes quantes colònies de la placa i les vam sembrar en una altra placa amb el medi Roig Congo, passant la nansa per sobre la superfície del medi fent ziga-zaga. Per acabar, es varen anotar les dades (nom del bacteri i de la soca, data, número de suspensió i repetició, per exemple: Azo. br. CECT 590 30/07/14 Sus 1.1), amb un retolador permanent i les segellàrem amb parafilm®.

Finalment, es va guardar la placa sembrada amb la solució de la soca en el frigorífic i la placa sembrada amb la nansa de sembra a l'estufa, en aquesta al cap de 24-48 hores el bacteri ja havia crescut (Figura 39) i es va utilitzar per fer la solució del bacteri en medi sòlid OAB.



Figura 39. Placa de Petri® amb medi sòlid Roig Congo sembrada amb *A. brasilense* d'una placa de la soca, utilitzant la nansa de sembra.

Per fer la solució del bacteri *A. brasilense* en el medi líquid OAB, es van agafar amb la nansa de sembra diverses colònies del bacteri d'una placa Petri® amb medi Roig Congo (com la de la imatge anterior o de les plaques sembrades amb la solució de la soca) i es posaren en un erlenmeyer amb 50-75mL de medi OAB. Aquest erlenmeyer es va posar a l'estufa. Al cap d'unes 24 o 48 hores, la solució estava força tèrbola, això volia dir que disposàvem del bacteri reproduït en un medi líquid i preparat perquè el poguéssim manipular (Figura 40).

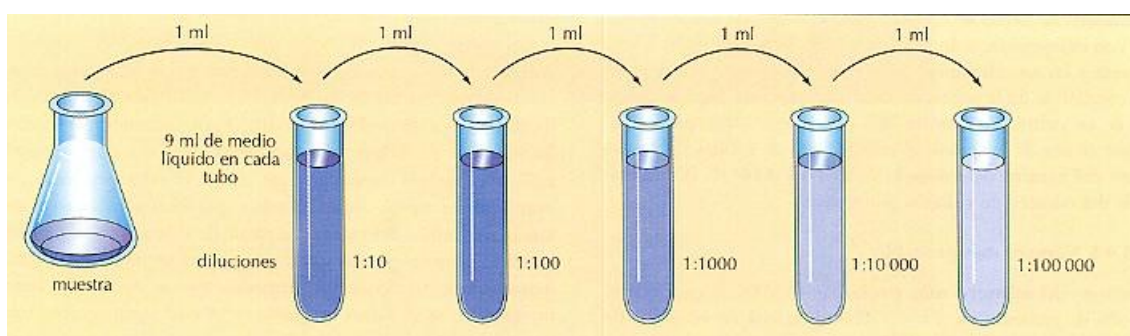


Figura 40. Cultius d'*Azospirillum brasilense*. A) Placa de Petri® amb medi Roig Congo sembrada amb la solució de la soca d'*A. brasilense*, utilitzant una nansa de vidre. B) Erlenmeyer amb 50-75mL de medi OAB amb diverses colònies del bacteri *A. brasilense*, de color roig, agafades amb la nansa de sembra de la Placa de Petri® anterior. C) Erlenmeyer amb la solució del bacteri *A. brasilense* i el medi OAB al cap d'unes 24-48 hores, s'observa que la solució s'ha tornat tèrbola.

## Material i mètodes

Quan el bacteri se sembra en medi líquid, aquest té una concentració de bacteris per mL. Per tal de conèixer aquesta concentració, se sembren dilucions de la solució mare en medi Roig Congo i es comptabilitza el nombre de colònies. A més, es mesura l'absorbància de les dilucions per tal d'establir una relació entre la concentració i la densitat òptica.

Per dur a terme les dilucions d'una solució de bacteris, es van posar 9mL d'aigua destil·lada en 7 tubs Falcon® i es numeraren del -1 al -7. A continuació, utilitzant la pipeta d'1mL, s'afegiren 1mL de l'erenmeyer amb la solució de bacteris al tub -1, es va sacsejar i agafar 1mL per passar-lo al tub -2 (Figura 41). Vàrem seguir aquest procediment amb la resta de tubs, canviant la punta de la pipeta cada cop que realitzàvem un dilució. Amb les dilucions aconseguim disminuir la concentració del bacteri 10 vegades en cada tub.



**Figura 41. Esquema que il·lustra com es fan les dilucions. Font: [www.datateca.unad.edu.com](http://www.datateca.unad.edu.com)**

Per saber la densitat òptica de les dilucions es van ficar dins les cubetes d'espectrofotometria. Per cada tub Falcon® s'ompliren amb 1mL dos cubetes d'espectrofotometria amb el mateix número. També es van fer dues cubetes més: una amb 1mL de l'erenmeyer amb la solució del bacteri, aquesta cubeta s'anomena PUR perquè és la concentració de la qual es va partir per fer les nostres dilucions; i l'altra amb 1mL del medi OAB, aquesta cubeta s'anomena BLANC, perquè no hi ha bacteris i és la referència de l'espectrofotòmetre per determinar la concentració de la resta de cubetes. Finalment vam observar l'absorbància de les cubetes en l'espectrofotòmetre.

## Material i mètodes

Tot seguit es sembraren 200µL de cada dilució en plaques de Petri®, per cada dilució es van sembrar tres plaques de Petri®. Aquestes plaques es van sembrar utilitzant la pipeta de 200µL, de la qual es canviava la punta per cada dilució, i la nansa de vidre, que s'esterilitzava abans de sembrar cada placa. Per sembrar amb la nansa de vidre, primer s'ha de subjectar sobre el medi Roig Congo per tal que es refredi una mica i després s'escampa la dilució per tota la superfície. Per acabar, es van tancar totes les plaques de Petri® amb la tapa corresponent, es van envoltar amb Parafilm® per aconseguir un tancament hermètic i s'annotaren les dades (data, nom del bacteri, número de la dissolució i de la repetició, per exemple: 12/08/14 Azo.br -1 R1) amb un retolador permanent. Per acabar, es van posar totes les plaques de Petri® a l'estufa perquè el bacteri creixés.

Passades 24 hores, vam observar i comptar les colònies de bacteri (UFC, unitat formadora de colònies) que havien crescut en les plaques Petri® (Figura 42).



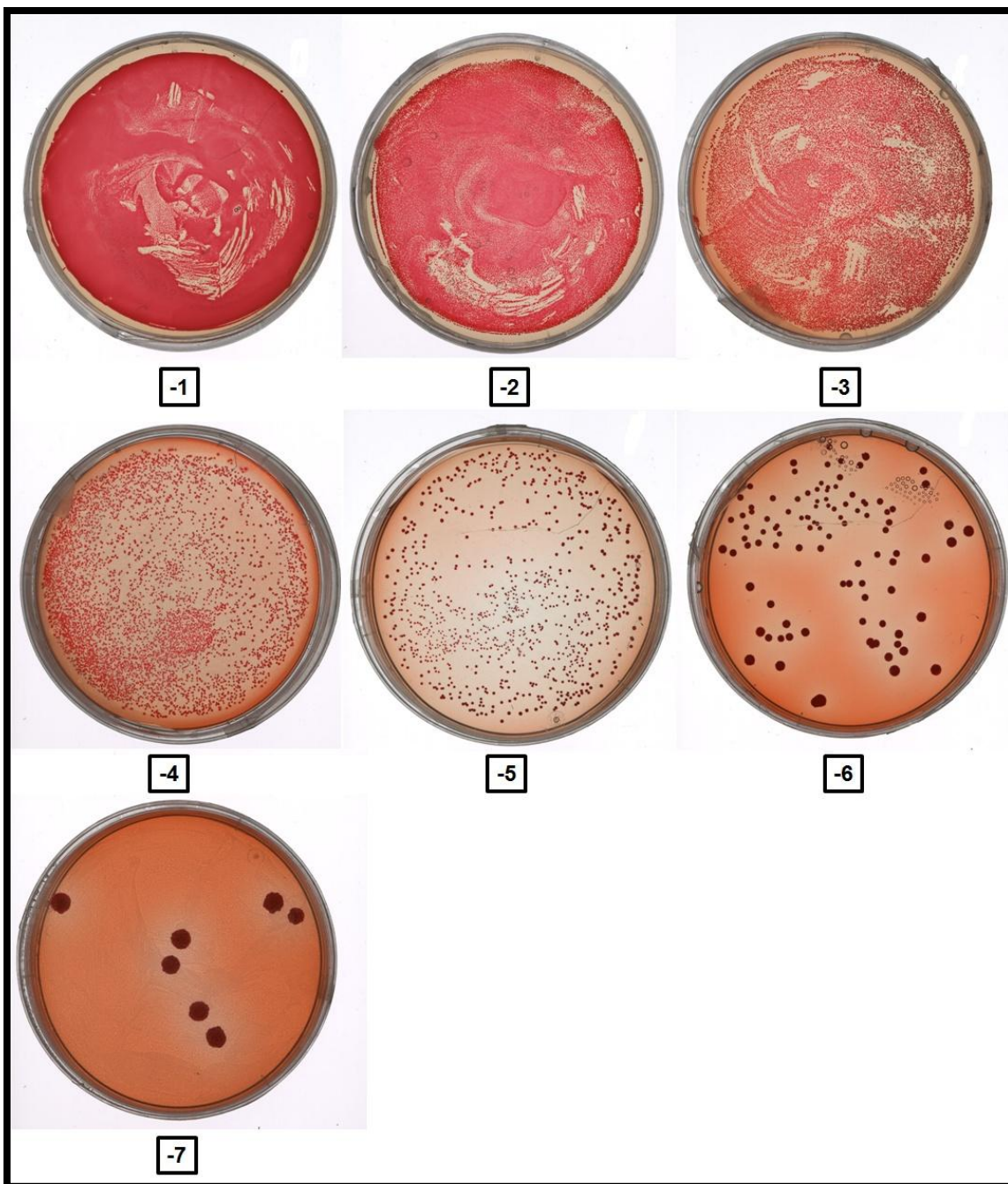


Figura 42. Imatge del creixement del bacteri *A. brasilense* en 7 dilucions sobre el medi Roig Congo.

Es va realitzar una corba de calibració del creixement d'*A. brasilense*, la qual estableix la relació entre la densitat òptica i les unitats formadores de colònies (cèl·lules viables) per mL en plaques de Petri® amb medi Roig Congo. L'absorbància es va mesurar en l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595nm.

El resultat es mostra a la Figura 43.

## Material i mètodes

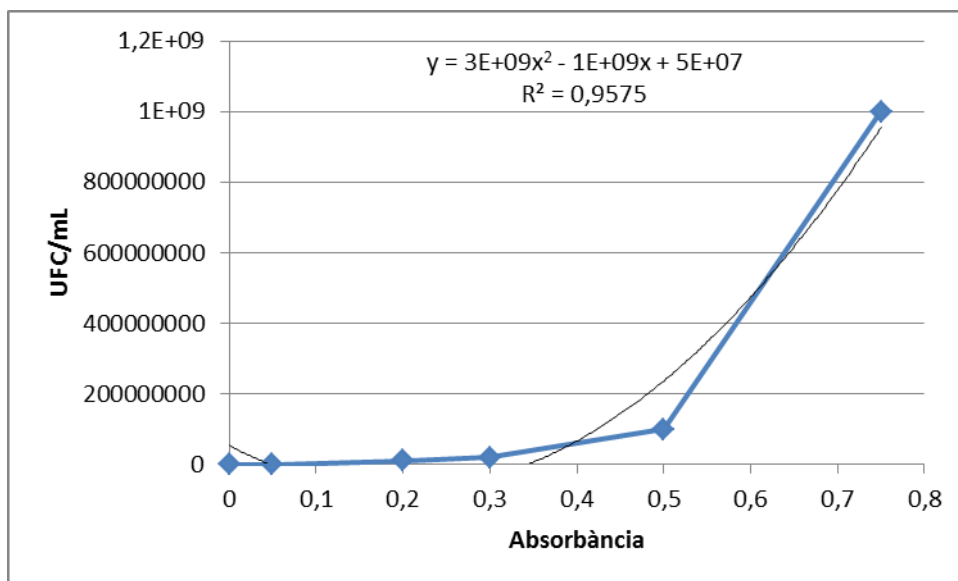


Figura 43. Corba de calibració d'*Azospirillum brasilense*.

Per una altra banda, es va calcular l'absorció mitjana de PBS (en l'apartat de tampons per a ELISA) per a cada llavor dels cultius Boludo i B73.

Amb tots dos cultius es va seguir el mateix procediment. Primer vam fer diferents grups amb el mateix nombre de llavors i es van col·locar en un erlenmeyer o tub Falcon® cobertes amb tampó fosfat salí PBS. Els recipients es varen col·locar sobre l'agitador durant 30 minuts (Figura 44).



Figura 44. Imatge de les 50 llavors cobertes amb aigua destil·lada en cada erlenmeyer, agitant-se sobre l'agitador.

## Material i mètodes

Passats els 30 minuts i utilitzant una malla, vam retirar el PBS de l'erlenmeyer i les llavors ens van quedar a la malla. Tot seguit, es varen pesar les llavors anotant el valor obtingut. A continuació, es van posar les llavors en l'erlenmeyer corresponent i es tornaren a cobrir amb PBS. Després es van col·locar els erlenmeyers sobre l'agitador durant 30 minuts més. Es va seguir pesant i agitant durant 30 minuts cada cop les llavors, fins que la massa d'aigua absorbida va ser constant. Arribat a aquest valor, tenim la quantitat màxima de PBS que poden absorbir les llavors.

A partir dels valors obtinguts, es va realitzar una corba d'imbibició (Figures 45 i 46) per a cada cultiu (Boludo i B73) per tal de saber quant temps tarden les llavors en absorbir el 70% del màxim PBS. Per aquesta corba es va eliminar el valor inicial i els dos últims (quan l'absorció es va estabilitzar) per a obtenir una regressió lineal. D'aquesta manera es va calcular que una llavor de tomàquet necessita 82 minuts per a absorbir 0,0056g de PBS i una de panís 156 minuts per a 0,0504g. Un cop vam tenir aquests resultats, es va passar el pes de PBS a volum utilitzant la relació de que 1005g de PBS són 1000ml.

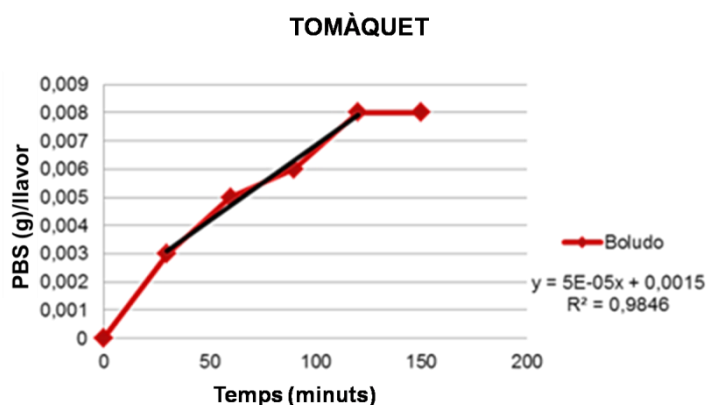


Figura 45. Gràfic amb la corba d'imbibició de les llavors de tomàquet.

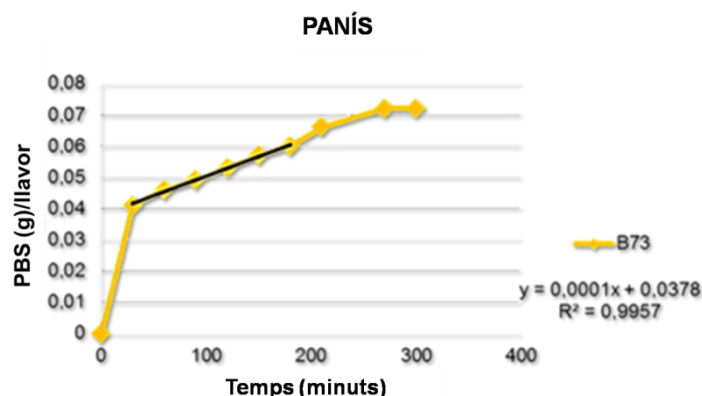


Figura 46. Gràfic amb la corba d'imbibició de les llavors de panís.

Un cop es va aconseguir estandarditzar la corba de l'absorbància i la densitat òptica, s'havien d'inocular les llavors de tomàquet i panís.

Per inocular les llavors amb el bacteri *A. brasilense*, es van fer els mateixos passos, tant en el tomàquet com en el panís, però canviant el valor d'algunes quantitats.

Al cap de 48h, el bacteri ja havia crescut en les plaques i es va poder establir que en la concentració -4 ( $DO_{595nm}=0,684$ ) hi havia una concentració de  $10^9$  bacteris, necessaris per inocular 40 llavors ( $10^8$  bacteris/llavor). Per tant es van realitzar dilucions de la solució del bacteri fins a la dilució -4, ja que era la que contenia el nombre de bacteris que ens interessava inocular en les llavors.

Després es va posar en dos tubs Eppendorf® 1mL de la dilució -4 i es van posar a centrifugar tots dos, un davant de l'altre per equilibrar la centrifugadora, durant 15 minuts a 5000rpm. Passats els 15 minuts, només es va utilitzar un dels dos tubs Eppendorf® que havien estat centrifugats. A continuació es va extreure amb una pipeta el sobrenedant del tub Eppendorf®, quedant-se en el tub el pellet del cultiu d'*A. brasilense*. Tot seguit es va resuspendre el pellet afegint 0,22mL de la solució mare tampó fosfat (descriu en l'apartat de medis) i agitant-lo amb l'agitador vòrtex. Per acabar, es va afegir el pellet amb la solució mare, l'inòcul, al tub Eppendorf® que contenia les llavors i es va deixar en agitació durant 82 minuts. Finalment al cap de 82 minuts, es van sembrar tant les llavors inoculades amb *A. brasilense* com les no inoculades. Aquests valors

## Material i mètodes

són els que es van utilitzar per les llavors de tomàquet, en el cas del panís canvia que la quantitat de solució mare utilitzada per resuspendre el pellet va ser de 1,98mL i que l'inòcul va estar en agitació amb les llavors durant 156 minuts (Figures 47 i 48).



Figura 47. Tub de Falcon® amb les llavors de panís i l'inòcul d'*A. brasilense*, sobre l'agitador.

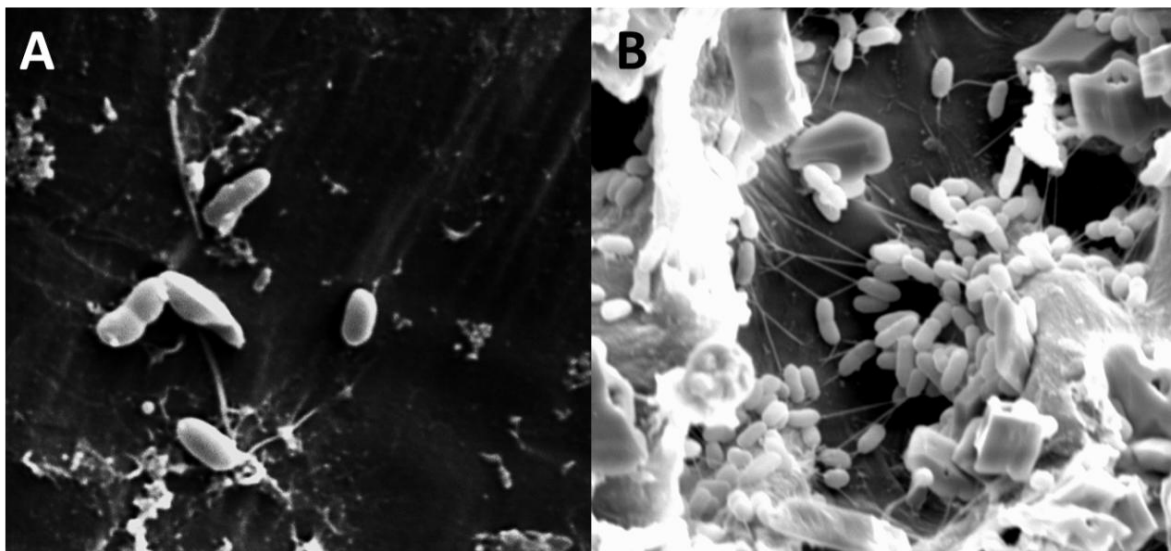


Figura 48. Fotografies obtingudes amb un microscopi electrònic de rastreig d'*A. brasilense* a la superfície de les arrels inoculades. A) Llavors de panís cv. B73. B) Llavors de tomàquet cv. Boludo. Autora: Paula Meler

## 4.6 Tractaments a les plàntules

Dos dies abans de la inoculació amb virus es va aplicar SA y *A. brasilense* als tractaments que corresponia.

### 4.6.1 Tractament d'*A. brasilense* a les plantes de tomàquet i panís

El tractament d'*A. brasilense* es va realitzar per tal de suplementar la concentració de bacteri en aquelles llavors que prèviament ja havien estat inoculades amb el bacteri. Per això es va utilitzar una solució del bacteri en medi OAB després d'estar 48h a l'estufa. Aquesta solució de bacteris es va obtenir amb 50-75mL d'OAB més 1mL de l'erenmeyer del dia 27/08/14, aquest erlenmeyer es va fer amb les colònies de la placa de Petri® 5/08/14 Azo.br. 1 R2. La densitat òptica del cultiu va ser 0,512 que correspon a una concentració de  $10^8$  bacteris/ml. Per aplicar aquest tractament vam posar 1mL de la solució a les arrels de les plantes, utilitzant una pipeta. Es va aplicar el tractament als 3 grups corresponents, tant del panís com del tomàquet amb 5 plantes a cada grup (Figura 49).



Figura 49. A) Tractament d'1mL d'*A. brasilense* en tomàquet. B) Tractament d'1mL d'*A. brasilense* en panís.

#### **4.6.2 Tractament d'àcid salicílic a les plantes de tomàquet i panís.**

Per al tractament amb SA es van fer les següents dissolucions: per al panís es va dissoldre 1L d'aigua destil·lada amb 3,5g d'àcid salicílic, i per al tomàquet 1L d'aigua destil·lada amb 0,2g d'àcid salicílic. Es va col·locar cada dissolució en un polvoritzador dispensador d'esprai. Tot seguit, vam polvoritzar la dissolució preparada per al tomàquet sobre els grups corresponents de tomàquet i la dissolució preparada per al panís sobre els grups corresponents de panís. Es va aplicar aquest tractament en els 3 grups corresponents del tomàquet i del panís amb 5 plantes cada un (Figura 50).



**Figura 50. A) Tractament d'àcid salicílic en tomàquet. B) Tractament d'àcid salicílic en panís.**

#### **4.6.3 Inoculació dels Virus**

Tots dos cultius van adaptar-se correctament a les condicions de l'hivernacle i davant la infecció de PVX i MDMV van mostrar símptomes visibles.

Les plantes de tomàquet s'inocularen amb *Potato Virus X* (PVX, acc. KJ631111) procedent de fulles de tomàquet liofilitzades infectades amb el virus i testades per ELISA. I el panís amb *Maize Dwarf Mosaic Virus* (MDMV, acc. AM110558), de les plantes infectades que es conserven a l'hivernacle (material

## Material i mètodes

en fresc). Per a la inoculació s'utilitzaren fulles amb símptomes que van donar positiu en el test ELISA.

Per mantenir el MDMV com a material fresc en l'hivernacle, s'anaven sembrant i inoculant plàntules de panís de la següent manera:

Es varen sembrar 5 testos amb 4 llavors de panís a cadascun. Al cap d'una setmana, el panís havia crescut suficient per a poder ser inoculat, així que es va inocular utilitzant les fulles d'altres plantes de panís infectades pel virus MDMV. També es plantaren 5 testos més, per tal d'inocular-les amb el virus de les últimes plantes infectades al cap d'una setmana. D'aquesta manera aconseguíem mantenir el virus MDMV per tal que quan ens fes falta, estés en bones condicions.

El tampó d'inoculació dels virus MDMV i PVX es va preparar seguint el protocol següent:

Aquest preparat consta d'una solució base (A) i una solució àcida (B). Per preparar la solució A dissolem 75mL d'aigua destil·lada amb 25mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Hidrogen fosfat de sodi) de pH 9 i 200mM, obtenim 100mL de la solució A. Ara preparem la solució B dissolent 95mL d'aigua destil·lada amb 5mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Dihidrogen fosfat de potassi) de pH menor que 7.

Quan ja tenim la solució A i la solució B preparades, dissolem 70mL de la solució A i 25mL de la solució B. Tot seguit, mesurem el pH, l'hem d'ajustar fins a pH 7-7,5 utilitzant la solució B per baixar el pH i la solució A per augmentar el pH. (En el nostre cas, vam baixar el pH amb la solució B, així que finalment en la nostra solució vam dissoldre 92mL de la solució B i 70mL de la solució A). Després d'ajustar el pH, autoclavem el tampó d'inoculació i el guardem a la nevera.

La inoculació dels virus MDMV i PVX es va fer com es detalla a continuació i utilitzant el material següent: nevera amb gel, morter i mà de morter estèrils, carborundum® i tampó d'inoculació (tampó sòdic-potàsic).

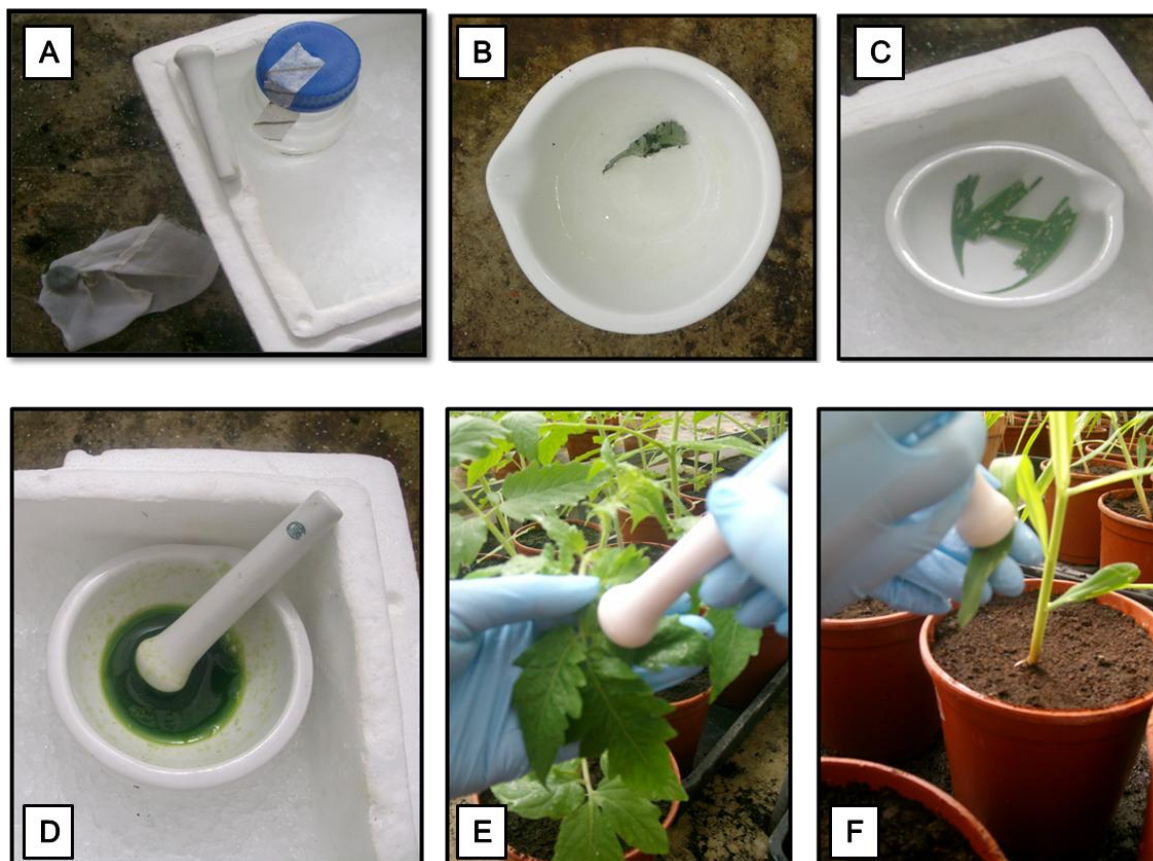


## Material i mètodes

Per preparar la inoculació es va posar tot el material en gel, s'afegiren en el morter 50ml del tampó d'inoculació, 0,1g de carborundum® i el material vegetal (2g de virus PVX liofilitzat i 1g de virus MDMV fresc). Tot seguit, es van triturar els components amb la mà de morter fins que el líquid es va tornar verd fosc.

Un cop vam tenir l'inòcul preparat, es va inocular el virus corresponent per a cada cultiu en els 4 grups per a cada un. En cada planta es van inocular 3 folíols. Per això es va tirar una petita quantitat de carborundum® per sobre les fulles i a continuació, vam pressionar amb la mà de morter sucada amb l'inòcul (Figura 51).

Es va repetir aquest procediment per a cada tractament de plantes a inocular, així s'aconsegueix que la quantitat d'inòcul sigui semblant en cada un (Achón, comunicació personal).



**Figura 51. Passos a seguir per a inocular els virus: A) El material utilitzat va ser el carborundum®, la mà de morter, la nevera amb el gel i el tampó d'inoculació en la botella. B) El morter amb el virus PVX. C) El morter amb el MDMV. D) La preparació del inòcul amb tots els components triturats i d'un color verd fosc. E) Inoculació del virus PVX en una tomaquera. F) Inoculació del virus MDMV en el panís.**

## 4.7 Paràmetres observats

### 4.7.1 Altura i nombre de fulles

Es van mesurar les altures de cinc plantes per tractament, a les quals també se'ls va contar les fulles.

### 4.7.2 Paràmetres fisiològics

#### 4.7.2.1 Contingut de clorofil·la

Per mesurar el contingut de clorofil·la es va utilitzar un SPAD (Minolta SPAD-502, Konica Minolta Ltd). Es va prendre la mitjana de 3 mesures per fulla, 1 fulla per planta i 5 plantes per tractament. El resultat es va observar i anotar *in situ*; els valors s'expressen en unitats SPAD (Figura 52).



Figura 52. SPAD (MinoltaSPAD-502, Konica Minolta Ltd), mesurant la quantitat de clorofil·la d'una fulla de panís.

#### 4.7.2.2 Taxa fotosintètica

La fotosíntesi es pot mesurar quantificant la quantitat de CO<sub>2</sub> que absorbeix la planta mitjançant la incorporació de <sup>14</sup>C o registrant l'intercanvi de CO<sub>2</sub> amb analitzadors de gasos per infraroig (IRGAs). En aquest treball es van registrar la conductància estomal, l'assimilació total i la transpiració utilitzant un IRGA

## Material i mètodes

ADC Lci (ADC Bioscientific, England) sota llum ambiental (radicació activa fotosintètica del hivernacle:  $150\text{-}300\text{mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ). Es van avaluar les 5 plantes per tractament, i en cada planta es van prendre 3 mesures (Figura 53).



Figura 53. Imatge de les parts que formen l'IRGA. A) Analitzador infraroig de gasos i Data Logger. B) Càmera de mesura.

### **4.7.3 Test DAS-ELISA**

El test ELISA s'utilitza per a identificar la presència d'antígens o anticossos d'una mostra. Segons l'antigen que vulguem identificar en les mostres, s'utilitzen dos tipus d'anticossos específics, un per als antígens i l'altre per a un enzim. L'anticòs amb l'enzim és el que fa canviar de color, quan es troba amb un substrat cromogènic en una mostra.

En el present treball, es va realitzar l'Assaig per Immunoabsorció Lligat a Enzims (ELISA), tant per comprovar si la inoculació va ser efectiva com si ho va ser el moment en què les plantes es van infectades. L'ELISA que es va utilitzar és del tipus directe en la seva modalitat DAS (sandvitx de doble anticòs) segons el protocol descrit per Clark i Bar-Joseph al 1984 (en Achón M.A., 1994).

## Material i mètodes

En el test DAS-ELISA s'utilitzaren antisèrums comercials policlonals contra PVX i MDMV (Loewe Biochemical Gmb H). El suport sòlid van ser plaques de poliestirè (Nunc TM). Els pouets de les vores de les plaques es van descartar i cada mostra es va col·locar en 2 pouets; els controls negatiu (plantes sanes) i positiu (plantes infectades) en 4 cada un.

Per a seguir el següent protocol ELISA, es van preparar els tampons detallats en l'annex 2 i 0,1g del material congelat de les mostres.

### **4.7.3.1 Recollida de mostres per al test DAS ELISA**

Es van recollir 4 fulles d'una planta per a cada tractament. Totes les fulles es van embolicar amb paper d'alumini i es van col·locar dins la nevera amb gel. Finalment, van ser guardades dins el congelador fins que es van analitzar (Figura 54).



**Figura 54. Presa de mostres per al test ELISA. A) i B) Embolicar quatre fulles de cada tractament amb paper d'alumini. C) Guardar els paquetets dins la nevera amb gel.**

### 4.7.3.2 Protocol ELISA

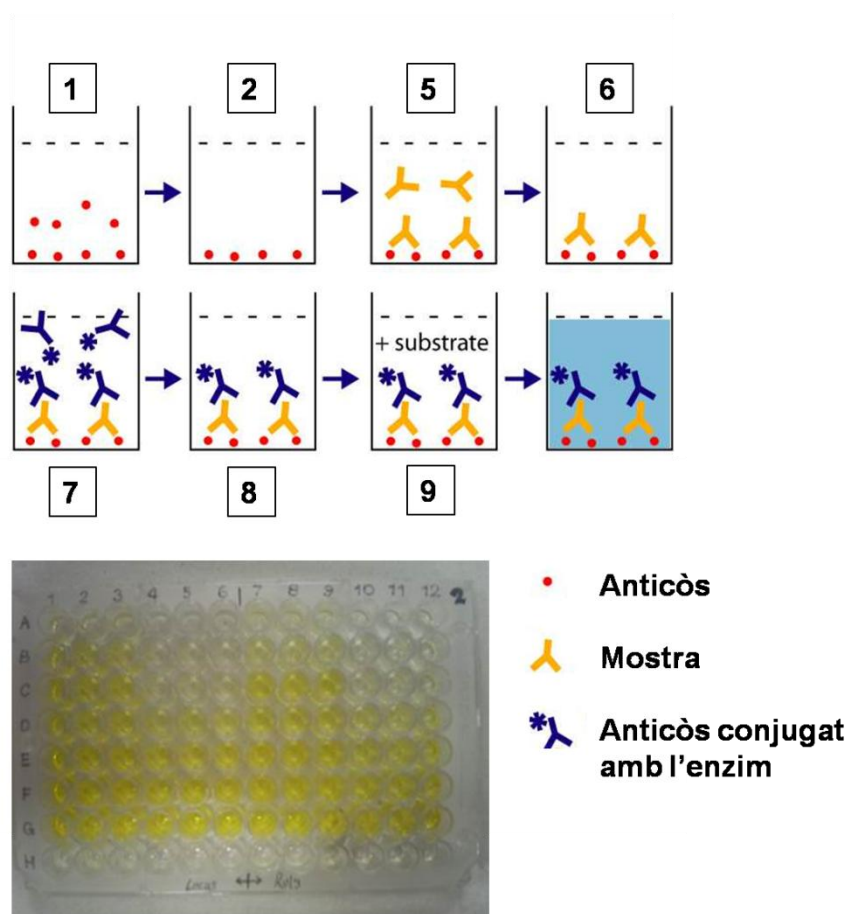


Figura 55. Esquema del protocol test-ELISA. Font: <http://nfs.unipv.it>

1. Entapissar els pouets amb 100µl/pouet de IgG (anticòs) diluïdes al tampó de recobriment i incubar a 30°C durant 4 hores.
2. Rentar 3 cops amb PBS-T (3 minuts/rentat) i assecat.
3. Triturar les mostres amb la mà i el morter al tampó mostra (PBS-T + 2% PVP). (0,1g mostra/ 2ml tampó mostra).
4. Centrifugar la mostra 5 minuts a 4800 rpm.
5. Afegir 100µl/pouet de sobrenadant i incubar tota la nit a 4°C.
6. Rentar amb PBS-T 4 cops, la primera omplir i buidar, les següents com al punt 2.

7. Afegir les Ig conjugades amb l'enzima diluïdes al tampó conjugat i incubar 5 hores a 30°C.

8. Rentar com al punt 2.

9. Afegir 100µl/pouet de substrat i incubar a temperatura ambient i a les fosques.

10. Llegir en l'espectrofotòmetre de microplaca (Biorad, model 680) a 405nm als 10, 20, 60 i 120 minuts.

#### **4.7.3.3 Anàlisis**

Es van considerar mostres infectades, aquelles en què el valor mitjà de les absorbàncies fos com a mínim 3 cops més alt que la mitja dels controls negatius (plantes sanes).

Es va comparar el nombre de positius (plantes infectades) de 5 repeticions per tractament.

#### **4.8 Microscopi electrònic de transmissió**

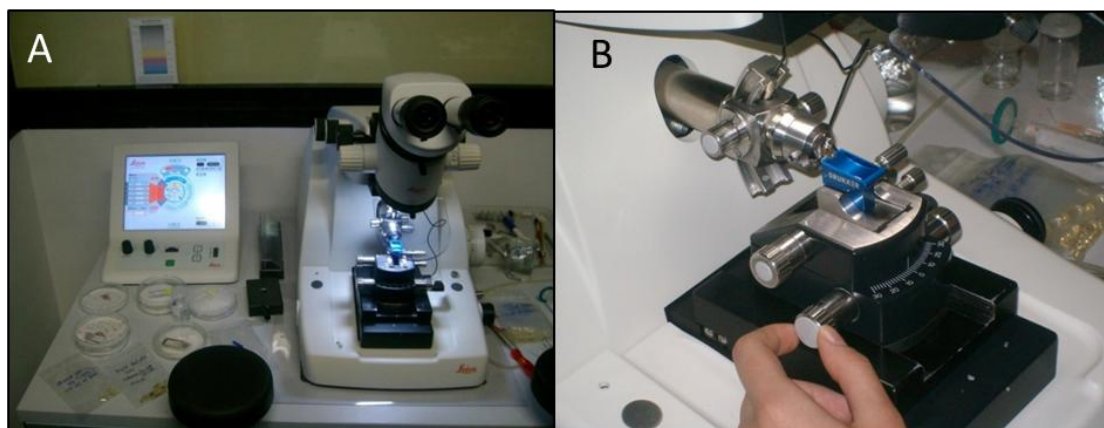
La microscopia electrònica és una eina molt útil que permet observar amb un alt grau de resolució les mostres i per tant en molt més augments.

De manera informativa, amb la finalitat de poder observar els virus vegetals i el funcionament tant de l'ultramicroscopi com del microscopi electrònic de transmissió, em van explicar i mostrar tots els següents passos i procediments que s'han de realitzar.

Per observar els virus vegetals a l'interior de les cèl·lules de les fulles de les plantes, cal una preparació prèvia i llarga. Primer de tot s'agafa la mostra i se sotmet a un procés de fixació per tal de poder observar la mostra sense cap alteració, mantenint les seves estructures. Tot seguit es deshidrata completament la mostra i s'afegeix resina. Es col·loca tot en un motlle i es posa a altes temperatures perquè la resina polimeritzi i se solidifiqui.

## Material i mètodes

Ara la mostra està preparada per ser tallada utilitzant un ultramicròtom (Figura 56). Amb aquesta màquina vam realitzar talls molt fins entre 50-100nm a la nostra mostra. La navalla que es va utilitzar era de diamant i tenia un petit recipient ple d'aigua en el qual s'hi quedaven flotant els talls a mesura que es tallaven. Els talls es van recollir amb una reixeta de coure.



**Figura 56. A) Ultramicròtom. B) La navalla de diamant.**

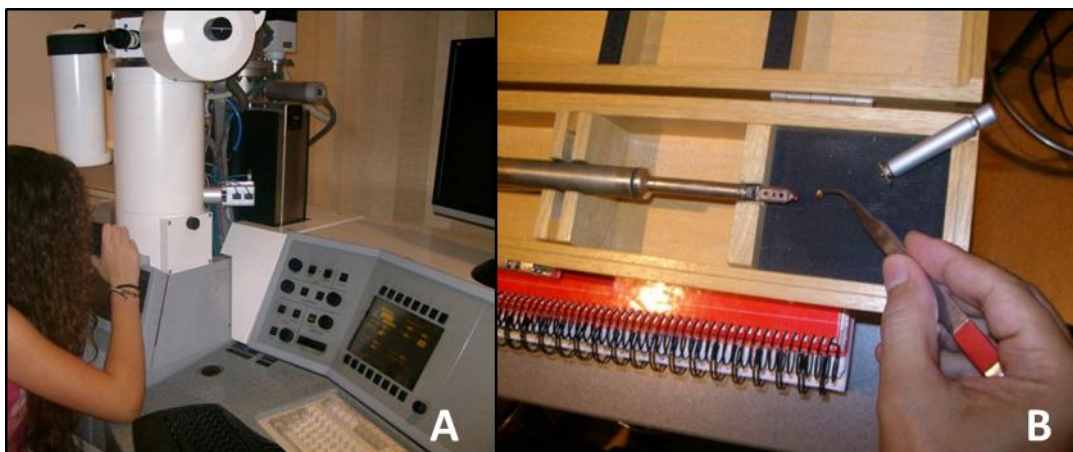
Finalment, es realitza un procés (tinció de contrast) en el qual s'afegeixen solucions de metalls pesants a la reixeta que conté la mostra (Figura 57), i així les estructures es poden observar en el microscopi electrònic (es va fer una doble tinció estàndard amb acetat d'uranil i citrat de plom).



**Figura 57. Material que s'utilitza per a tenyir la mostra i afegir-hi metalls pesants.**

## Material i mètodes

El microscopi electrònic de transmissió (Figura 58) consisteix en fer travessar, juntament amb les lents electromagnètiques que els orienten, un feix d'electrons per la mostra i els que passen impressionen sobre la pantalla inferior.



**Figura 58. A) Microscopi electrònic de transmissió. B) Porta objectes, pinces i reixeta amb les mostres**



## 5. Resultats

### 5.1 Assaig en tomaqueres

#### 5.1.1 Altures i nombre de fulles

Les mitjanes de les altures i número de fulles, preses en les 5 plantes de tomàquet de cada tractament, es mostren en les Figures 59 i 60, respectivament. El tractament A.br+SA+PVX és el que més ha crescut i per tant té més nombre de fulles, és significativament més alt que els tractaments A.br+PVX i PVX, amb també una diferència entre el nombre de fulles.

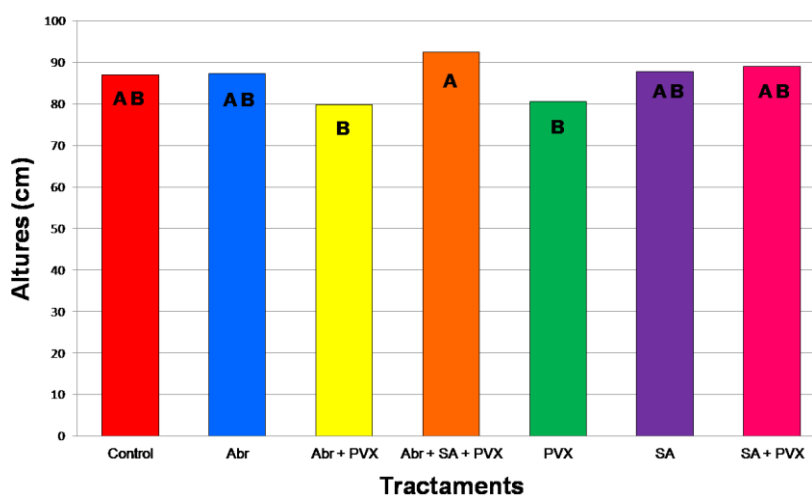


Figura 59. Altures mitjanes en cm de les tomaqueres.

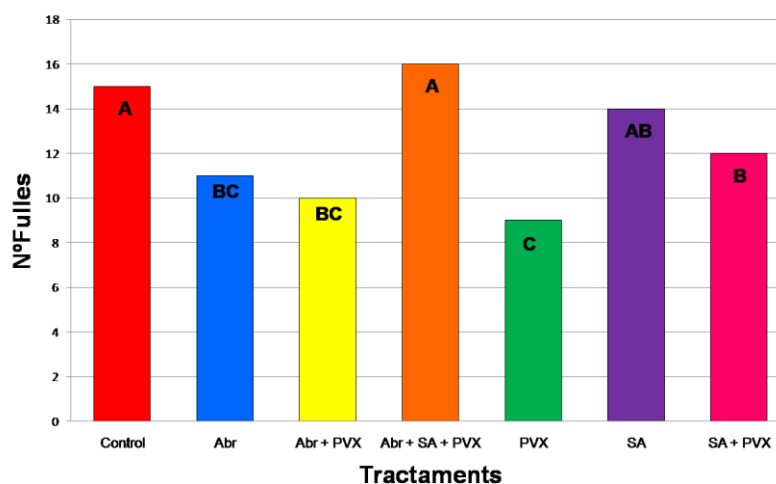


Figura 60. Mitjanes dels números de fulles de les tomaqueres.

### 5.1.2 Paràmetres fisiològics

Amb els valors obtinguts de la mitjana de 3 mesures per fulla, 1 fulla per planta i 5 plantes per tractament amb l'SPAD, es va realitzar la gràfica de la Figura 61. Aquesta mostra que les plantes amb més contingut de clorofil·la són amb poca diferència, les del tractament A.br+SA+PVX i el tractament amb menys contingut de clorofil·la és SA+PVX.

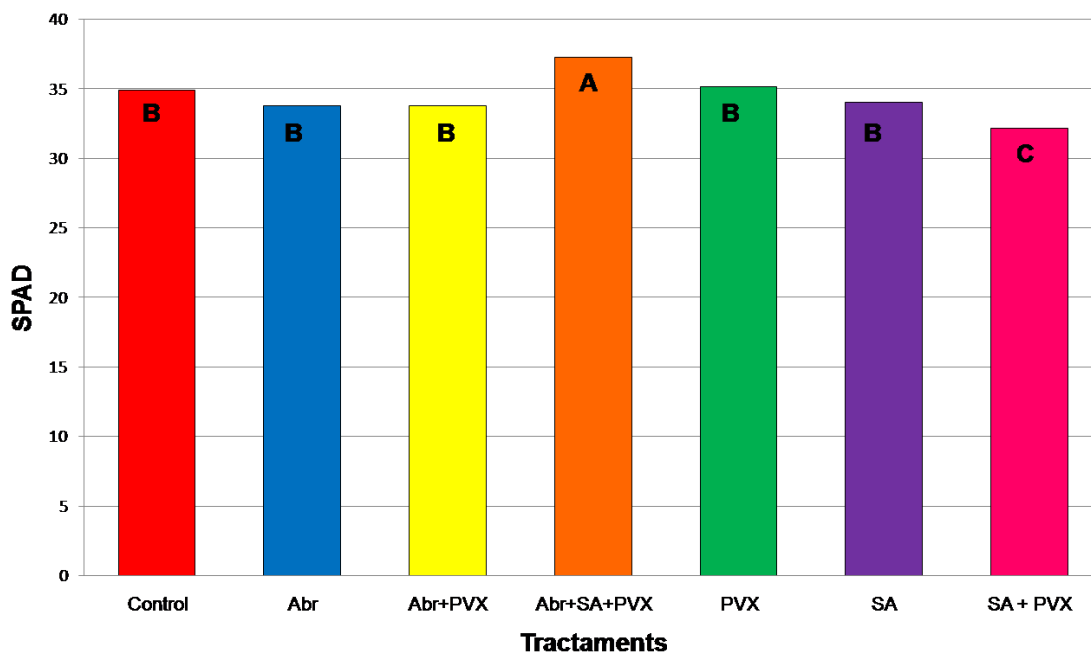


Figura 61. Valors mitjans de l'SPAD en tomaqueres.

Utilitzant el IRGA, vam obtenir els valors de la transpiració, de la taxa fotosintètica i l'eficiència de l'ús de l'aigua. Amb les mitjanes d'aquets valors s'han realitzat els gràfics 62, 63 i 64.

En la Figura 62 hi estan representats els valors mitjans de la transpiració de les plantes de cada tractament. Els tractaments amb més transpiració per planta són A.br+PVX+SA i SA. El tractament amb menys transpiració expressada és PVX.

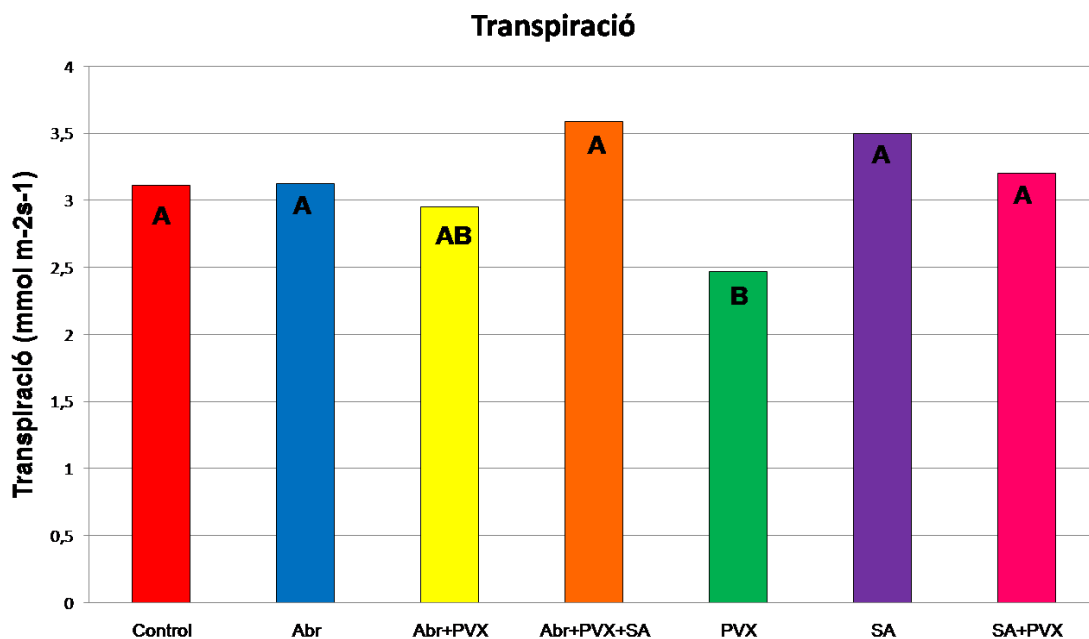


Figura 62. Transpiració mitjana de cada tractament de l'assaig en tomàquet (mmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>)

La Figura 63 mostra els valors mitjans de la taxa fotosintètica de cada tractament, en la qual s'observa que el tractament A.br+SA+PVX és el que té la major taxa fotosintètica i la menor és el tractament PVX.

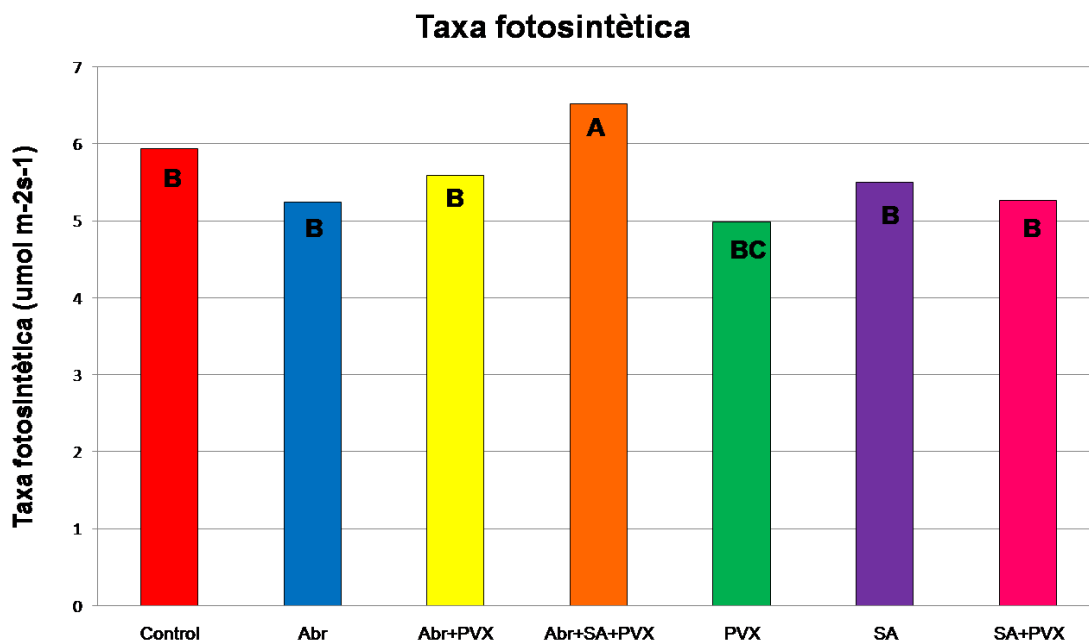
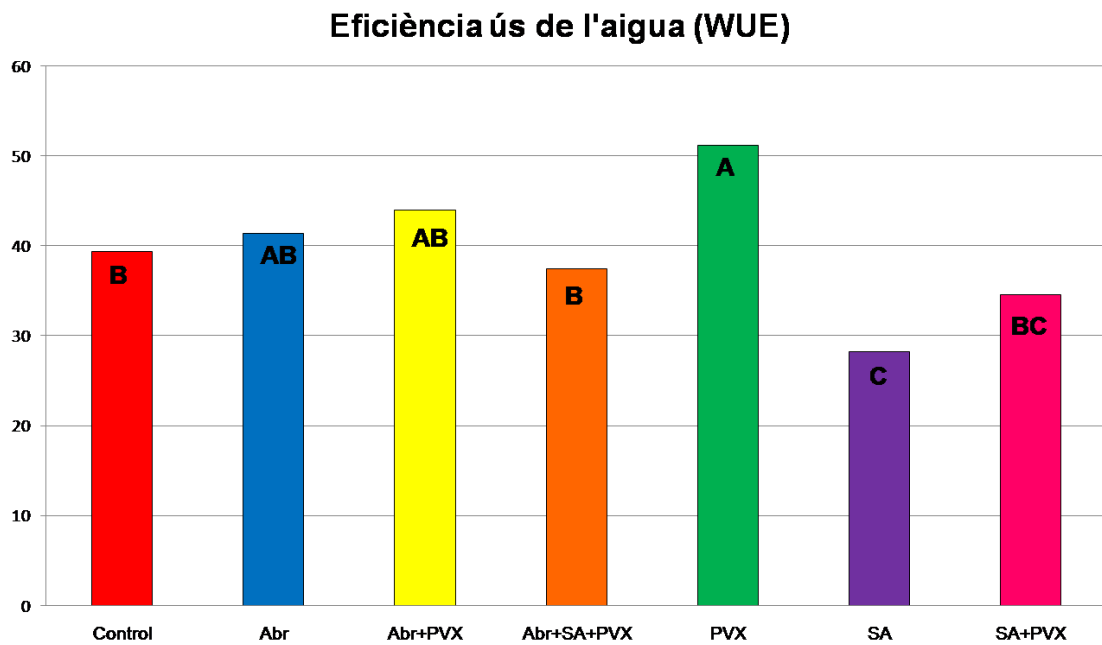


Figura 63. Taxa fotosintètica mitjana de cada tractament de l'assaig en tomàquet (umol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>)

En la Figura 64 estan representats els valors mitjans de l'eficiència de l'aigua de cada tractament. L'eficiència de l'aigua es calcula dividint la taxa fotosintètica amb la conductància estomàtica. S'observa que el tractament de PVX és el més eficient amb una diferència significativa. El tractament SA és el menys eficient en l'ús de l'aigua significativament.



**Figura 64.** Eficiència de l'ús de l'aigua als diferents tractaments de l'assaig de tomàquet.

### 5.1.3 Test DAS-ELISA

El test DAS-ELISA ens va permetre comprovar si realment els tractaments inoculats amb els virus ho estaven. I el resultat ha sigut que totes les plantes dels tractaments inoculats amb virus han donat positives en el test ELISA.

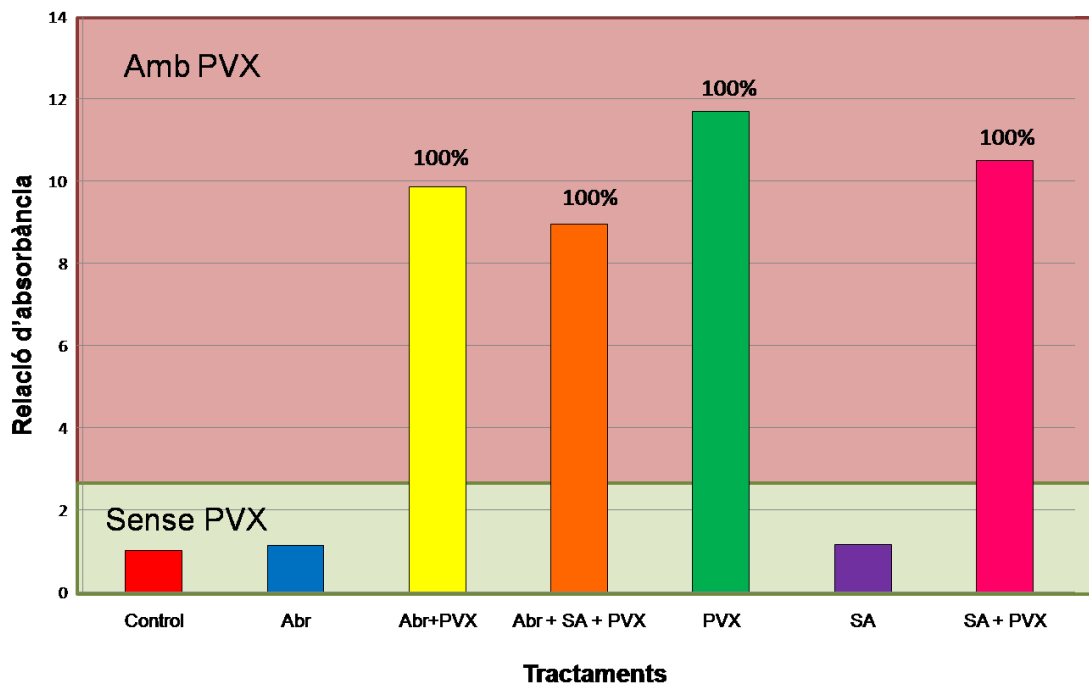


Figura 65. Test- ELISA en les tomaqueres.

## 5.2 Assaig en panís

### 5.2.1 Altura i nombre de fulles

Els valors representats en les Figures 66 i 67 són els valors obtinguts amb la mitjana de les altures i número de fulles, preses en les 5 plantes de tomàquet de cada tractament. El tractament A.br és el que més ha crescut amb poca diferència, i així dels que té més nombre de fulles. Els dos tractaments que han crescut menys han estat A.br+MDMV i SA+MDMV, i per tant també tenen menys nombre de fulles.

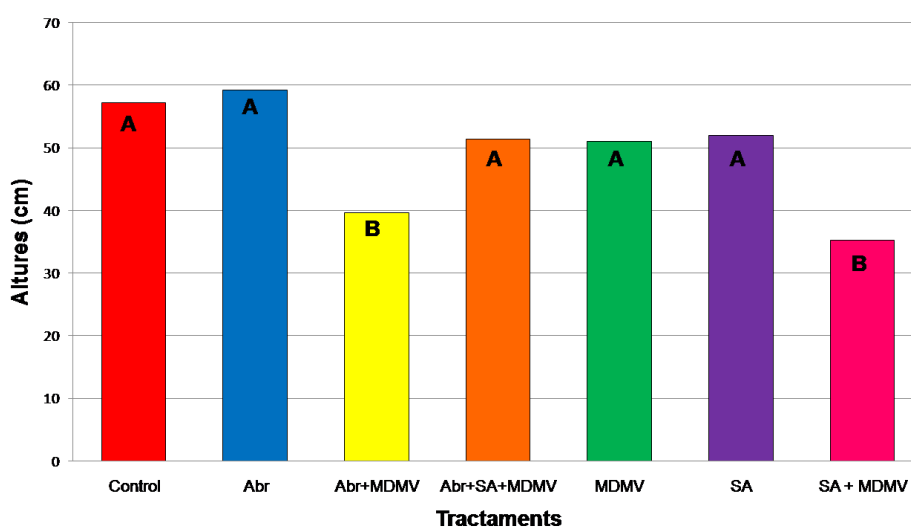


Figura 66. Altures mitjanes en cm de les plantes de panís.

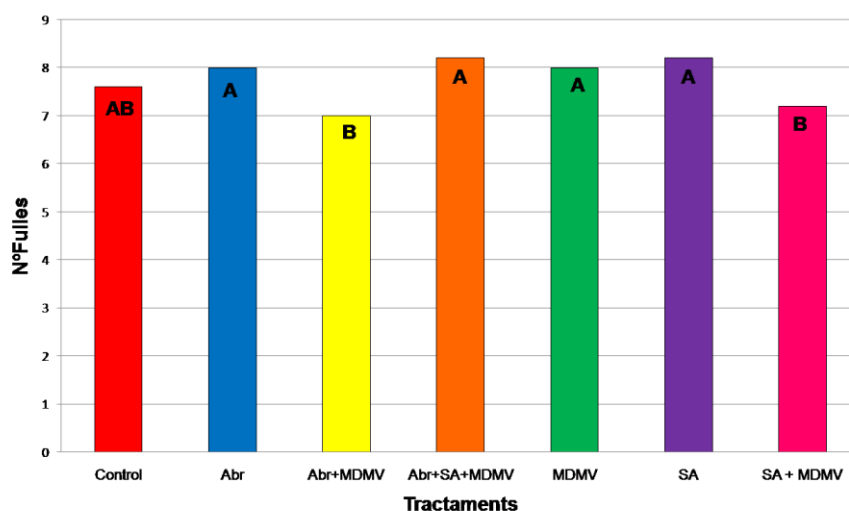


Figura 67. Número mitjà de les fulles de 5 plantes de panís per tractament.

### 5.2.2 Paràmetres fisiològics

La Figura 68 mostra els valors obtinguts de la mitjana de 3 mesures per fulla, 1 fulla per planta i 5 plantes per tractament amb l'SPAD. La gràfica ens mostra que les plantes amb més contingut en clorofil·la són amb poca diferència, les del tractament A.br+SA+MDMV seguit amb poca diferència de l'A.br+MDMV. El tractament amb menys contingut en clorofil·la és SA+MDMV.

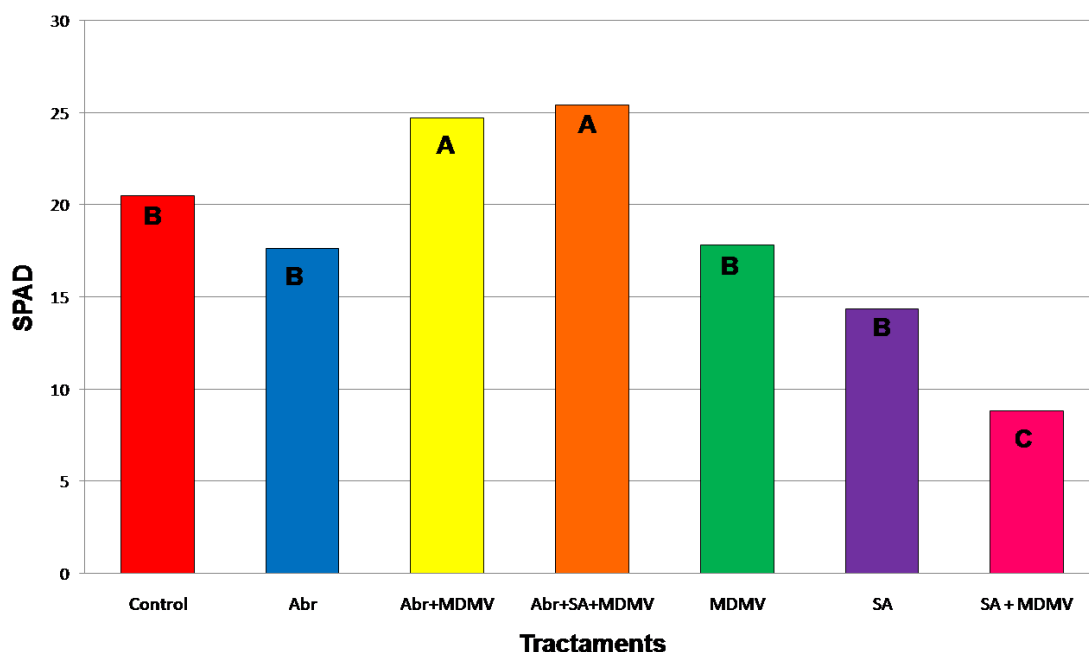


Figura 68. Valors mitjans de l'SPAD en panís.

Utilitzant el IRGA, vam obtenir els valors de la transpiració, de la taxa fotosintètica i l'eficiència de l'ús de l'aigua. Amb les mitjanes d'aquets valors s'han realitzat els gràfics 69, 70 i 71.

En la Figura 69 hi estan representats els valors mitjans de la transpiració de cada tractament. El tractament amb més transpiració per planta és A.br+MDMV+SA, seguit amb poca diferència d'A.br+MDMV. Clarament, el tractament amb les plantes que menys transpiren és MDMV.

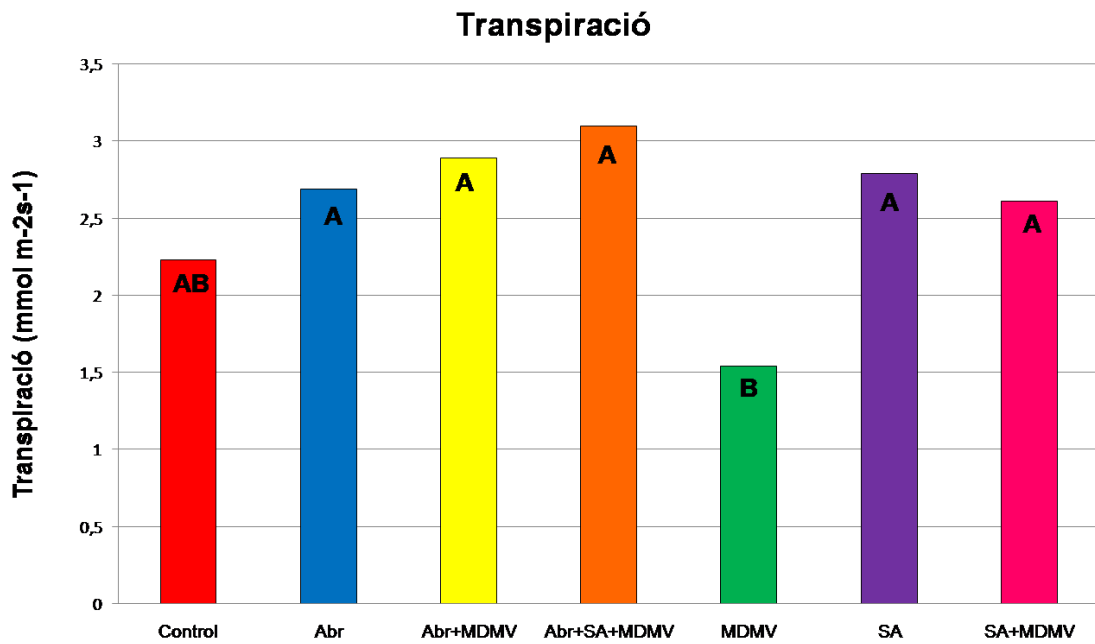


Figura 69. Transpiració mitjana de cada tractament de l'assaig en panís (mmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>)



La Figura 70 mostra els valors mitjans de la taxa fotosintètica de cada tractament, en la qual s'observa que el tractament Control és el que té més taxa fotosintètica, seguit del tractament SA i la resta de tractaments tenen una taxa fotosintètica similar.

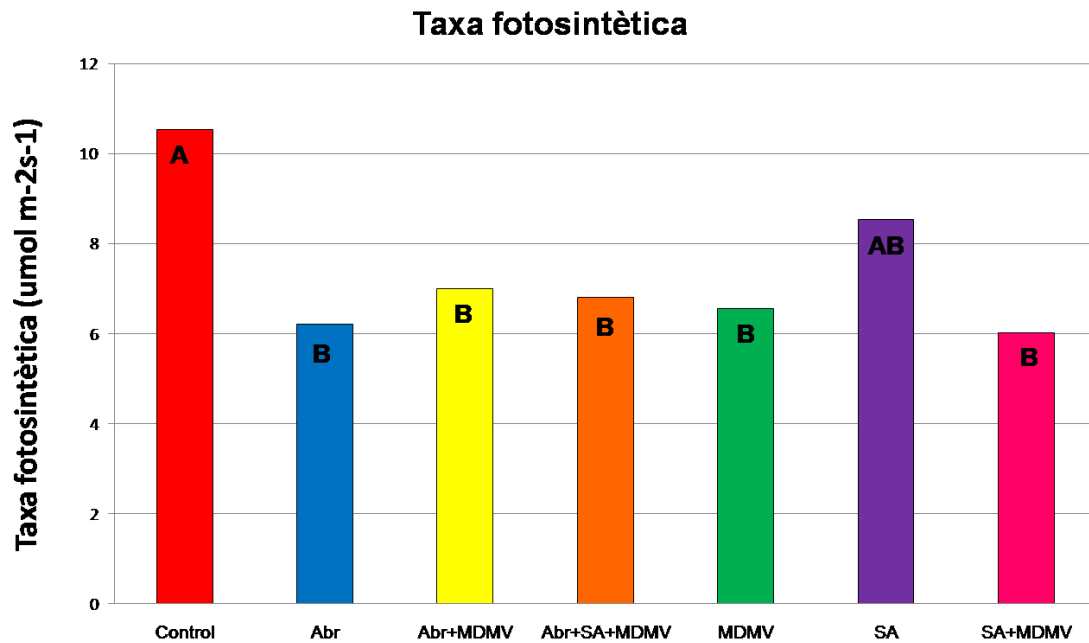


Figura 70. Taxa fotosintètica mitjana de cada tractament de l'assaig en panís ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

En la Figura 71 estan representats els valors mitjans de l'eficiència de l'ús de l'aigua de cada tractament. L'eficiència de l'aigua es calcula dividint la taxa fotosintètica amb la conductància estomàtica. S'observa que el tractament de MDMV és el que té més eficiència en l'ús de l'aigua, amb una diferència significativa. I el tractament amb SA és el menys eficient en l'ús de l'aigua.

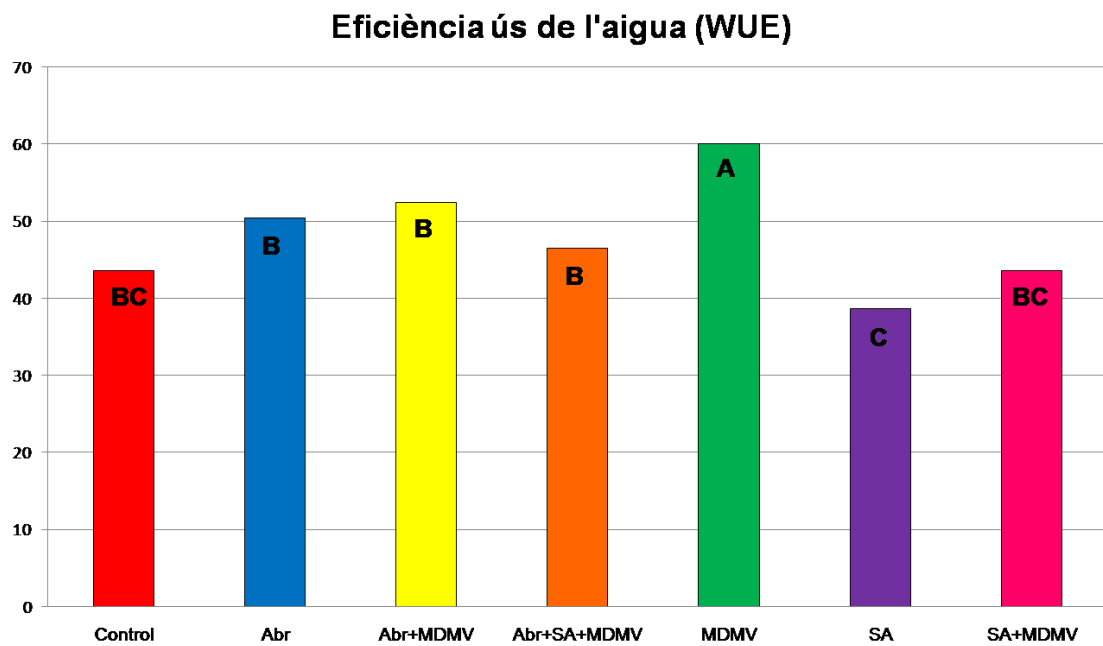


Figura 71. Eficiència de l'ús de l'aigua als diferents tractaments de l'assaig en panís.

### 5.2.3 Test DAS-ELISA

El test DAS-ELISA ens va permetre comprovar si realment els tractaments inoculats amb els virus ho estaven. I el resultat ha sigut que totes les plantes dels tractaments inoculats amb virus han donat positives en el test ELISA.

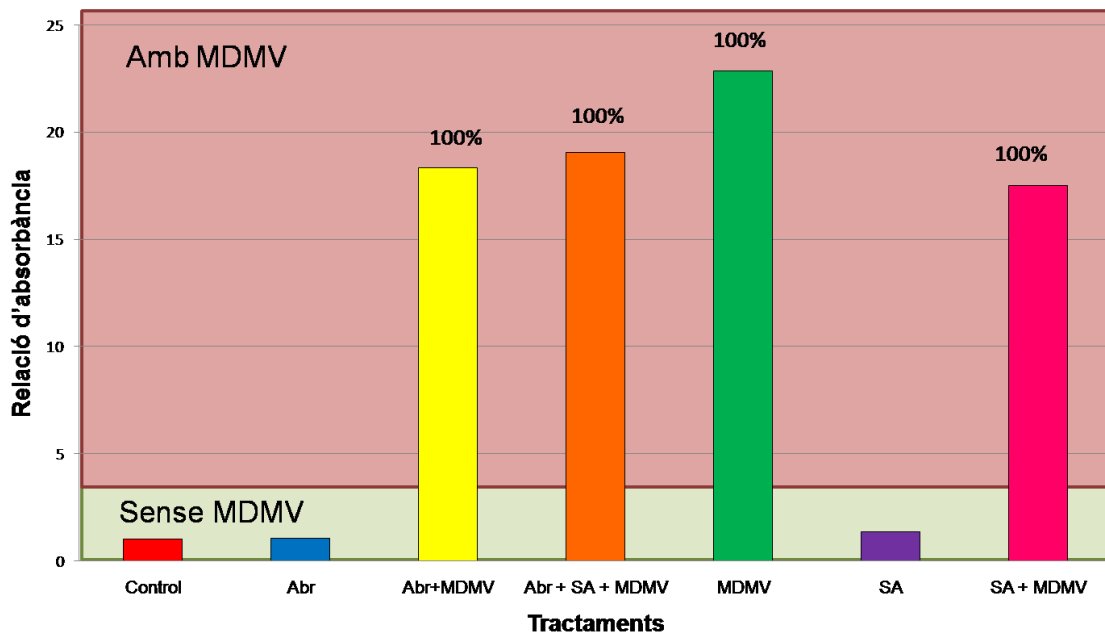
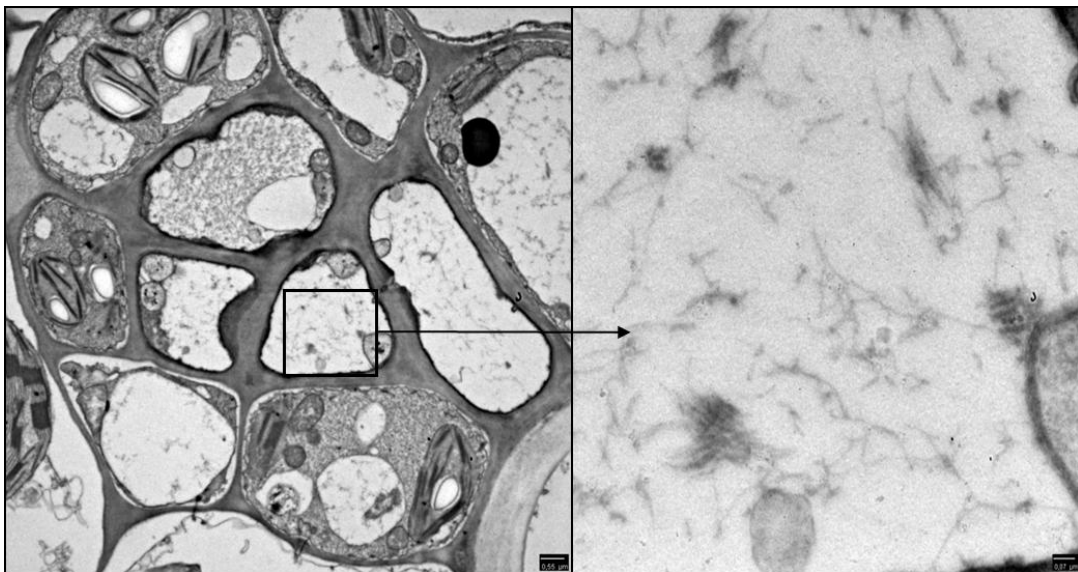


Figura 72. Test- ELISA en les tomaqueres.

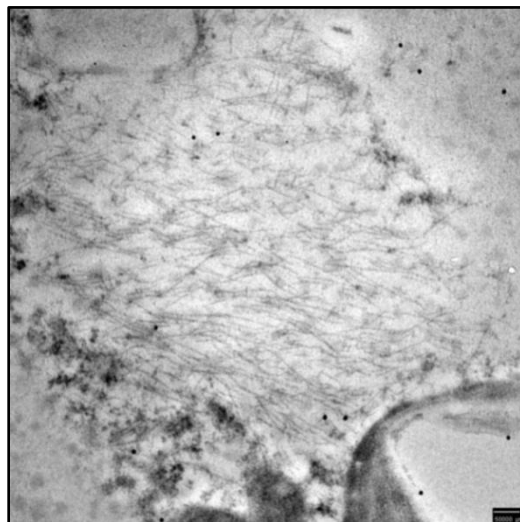
### 5.3 Microscopi electrònic de transmissió

Amb les mostres que es varen preparar de tomàquet inoculat amb PVX i panís inoculat amb MDMV es varen obtenir les imatges que es descriuen a continuació.

Pel que fa a les mostres de tomàquet amb el virus PVX, es varen observar els virions en les cèl·lules infectades distribuïts també pel xilema i el floema (Figura 73). Es va comprovar que estan agrupats en grans masses (Figura 74) i que les seves partícules virals són flexuoses i filamentoses.



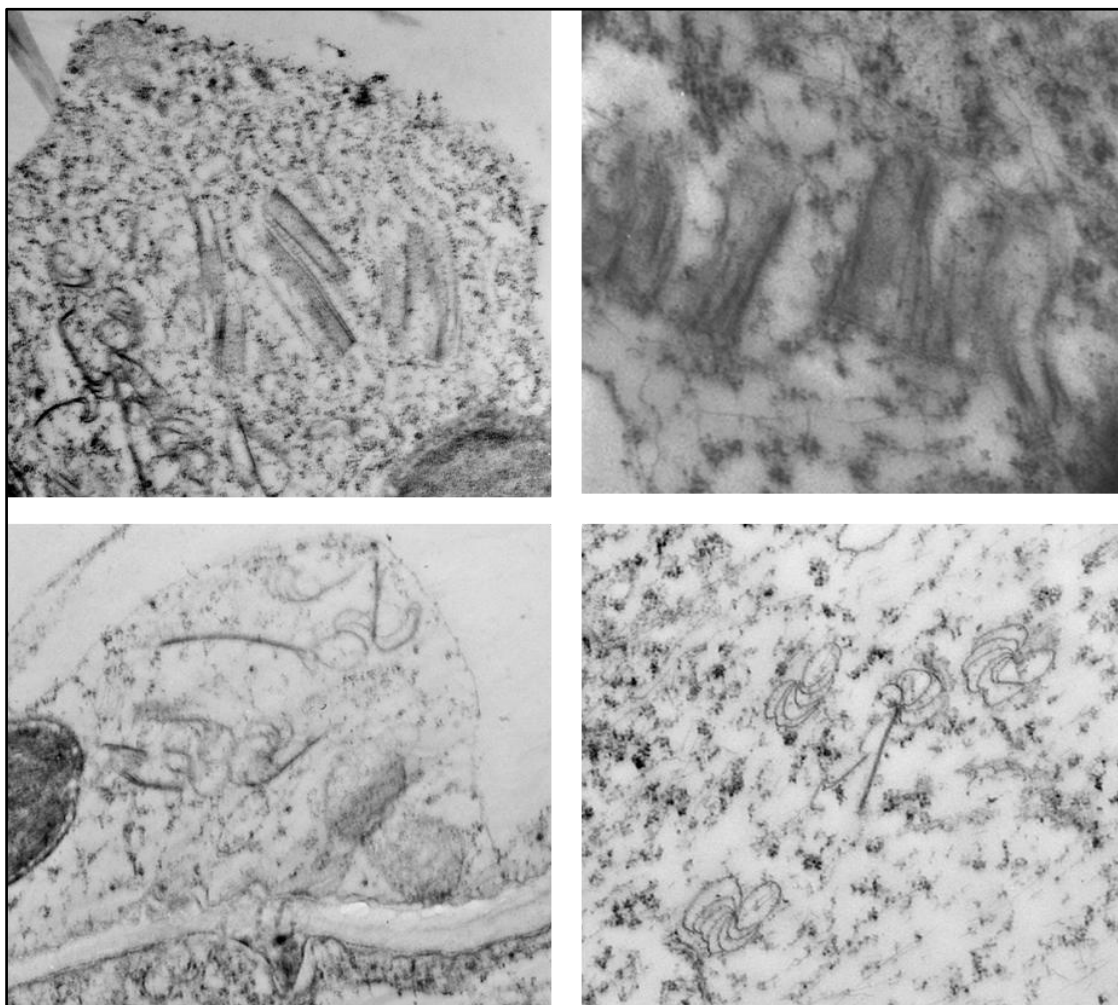
**Figura 73.** El xilema i el floema. Cloroplasts amb reserves de midó. En la imatge ampliada s'hi observen grups de virions filamentosos del PVX.



**Figura 74.** Gran agrupació de virions del PVX.

## Resultats

De les mostres de panís amb el virus MDMV es van poder observar les inclusions que realitza el viró del virus en infectar les cèl·lules. Aquestes inclusions són típiques d'aquest virus i s'anomenen "pinwheel" que, en seccions transversals, es poden observar en forma de cabdells, rotllos i tubs (Figura 75).



**Figura 75.** En les cèl·lules infectades pel MDMV s'observen les inclusions típiques d'aquest virus, anomenades "pinwheel" que, en seccions transversals, es poden observar en forma de cabdells, rotllos i tubs. Autora: Gemma Rodrigo.

## **6. Conclusions**

Al llarg de tota la meua experiència desenvolupant l'experiment en el qual es basa el present treball de recerca, dut a terme en les instal·lacions del laboratori de virologia de l'ETSEA, he après a utilitzar molts materials i aparells, així com a seguir procediments i protocols diversos. Això m'ha permès assolir els objectius que em vaig proposar inicialment.

Pel que fa als objectius 1 i 2, vaig aprendre a manipular el bacteri *A. brasilense*, per revivre'l i mantenir-lo en unes condicions òptimes per poder utilitzar-lo. Aquest procés va ser llarg perquè en un inici el bacteri d'altres anys no estava en bones condicions, després de molts intents i adonar-nos que no ens en sortíem, vam demanar una nova soca del bacteri i va ser llavors quan ho vam aconseguir. El treball amb el bacteri em va permetre prendre consciència de la necessitat de treballar en condicions d'esterilitat i posar en pràctica les tècniques necessàries per mantenir aquestes condicions. Així mateix he pogut practicar diferents mètodes de cultiu, sembra i comptatge de bacteris, uns procediments totalment nous per a mi.

El treball amb els virus ha estat també molt enriquidor per a mi, ja que em costava imaginar-me com es podia experimentar amb aquestes estructures tan i tan petites que tot just es troben al límit de la vida. Així doncs, respecte de l'objectiu 3, la inoculació dels virus MDMV i PVX en el panís i el tomàquet, es va realitzar de forma mecànica. El PVX es va aconseguir de material liofilitzat i el MDMV de material que es mantenia fresc en l'hivernacle, és a dir de cèl·lules infectades que es van liofilitzar o mantenir en fresc com a reserva de virus, els quals es mantenen inerts fins que troben noves cèl·lules per infectar.

Utilitzant el microscopi electrònic de transmissió, vaig poder observar l'estructura i l'efecte de la infecció dels virus MDMV i PVX en unes mostres de fulles infectades i d'aquesta manera vaig acomplir l'objectiu 4. Això em va proporcionar altres nous coneixements, tant del treball previ de preparació de les cèl·lules per a l'observació al microscopi, com del propi maneig i de la interpretació de les ultramicrografies obtingudes.

## Conclusions

Un cop realitzats tots els tractaments, es va dur a terme la recollida de resultats que ens permeten abordar l'objectiu 5 i comparar l'efecte d'*A. brasilense* i de l'àcid salicílic sobre les plantes tractades, tant en els paràmetres de desenvolupament com els fisiològics quan la planta està o no infectada amb PVX i MDMV. Amb els resultats anteriors, arribem a les conclusions següents:

- La inoculació mecànica amb virus ha estat efectiva en els dos patosistemes d'estudi.
- *Azospirillum brasilense* per si mateix sembla induir resistència sistèmica (IRS) a les plantes de tomàquet contra PVX en les nostres condicions. En el cas del panís, potencia el desenvolupament de les plantes, però no a nivells detectables als paràmetres fisiològics enregistrats. Encara que és un biofortificant de cereals ja emprat en conreus de Sud-Amèrica per potenciar el creixement i rendiment.
- L'àcid salicílic pal·lia els efectes de PVX i MDMV degut a que les plantes adquireixen resistència sistèmica (SAR).
- El doble tractament amb *A. brasilense* i àcid salicílic pal·lia els efectes del PVX a l'assaig de tomàquet. En el cas del panís no queda clar. S'hauria d'haver pres mostres en un estat fenològic més avançat per tal d'observar significativament l'enanisme produït per MDMV.
- Al microscopi s'han observat les alteracions induïdes a nivell cel·lular pels dos virus d'estudi (PVX i MDMV) confirmant la inoculació i la presència.

Per acabar, confirmo en part **la hipòtesi** del meu treball que el fet de tractar les plantes amb àcid salicílic o inocular-les amb el bacteri *A. brasilense*, desenvolupen resistència i protecció enfront les posteriors infeccions que, en aquest cas, seran dels virus descrits. De la meva hipòtesi es verifica amb l'experiment, que tant l'*A. brasilense* com l'àcid salicílic, són efectius en el cultiu de tomàquet però no queda tan clar en el cas del panís.

## 7. Bibliografía

**Aminalah, T., Maryam, Z., Asma, T., Akbar, D. i Mina, K.H. 2011.** Role of salicylic acid in resistance to plant viruses. *Genetics in the 3rd Millennium* 8(4):2203-2212.

**Agrios, G.N. 1988.** Plant Pathology. 2ª Edición. Academic Press. 703pp.

**Arfan, M., H.R. Athar and M. Ashraf. 2007.** Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 6(4): 685-694.

**Ballaré, C.L. 2011.** Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends Plant Science*, In Press, Corrected Proof(12).

**Barassi, C.A., Sueldo, R.J., Creus, C.M., Carrozzi, L.E., Casanovas, E.M. i Pereyra, M.A. 2007.** Azospirillum spp., a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 1(2):68-82.

**Bashan, Y., Holguin, G. i De-Bashan, L.E. 2004.** Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521–577.

**Bashan, Y. i De-Bashan, L.E. 2002.** Protection of Tomato Seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* by Using the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 2637-2643.

**Bashan, Y. i Levany, H. 1990.** Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 591-608.

**Bashan, Y. i Holguin, G. 2002.** Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees-Structural Function* 16:159-166.

**Chen, B. i Francki, R. I. B. 1990.** Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71 (4): 939-944.

**Chen, Z., Silva, H. i Klessig, D. F. 1993.** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.



## Bibliografía

- Clarck, M.F. i Bar-Joseph, M. 1984.**Enzimeinmunosorbent assays in plant virology. En TD 1994,Achón M.A. Virus del mosaico enanizante del maíz (MDMV) en cataluña. Consultado 4 de abril de 2013. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/8339>
- Cornuet, P. 1992.** Elementos de virologia vegetal. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 218pp.
- Creus, C.M., Graciano, M., Casanovas, E.M., Pereyra, M.A.,Simontacchi, M.,Puntarulo, S.,Barassi, C.A. i Lamattina L. 2005.**Nitric Oxide is Involved in the Azospirillum brasilense-induced Lateral Root Formation in Tomato. *Planta* 221: 297-303.
- Dobbelaere, S.,Vanderleyden, J. iOkon, Y. 2003.**Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere.*Critical Reviews in Plant Sciences*. 22: 107-149.
- Durrant, W.E. i Dong X. 2004.** Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology*, 42(1), p. 185-209.
- Egamberdieva, D. 2012.**The Management of Soil Quality and Plant Productivity in Stressed Environment with Rhizobacteria. D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. DOI 10.1007/978-3-642-23465-1\_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Elad, Y.i L. Chet.1987.** The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamyospore germination of *Fusarium* spp. By *Pseudomonasspp*.*Phytopathology* 77:190-197.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A.,Maniloff, J.,Desselberger, U.iBall, L.A. 2005.**Virus taxonomy. San Diego: *Elsevier Academic Press*. 1259p. (Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 8).
- Flor, H. 1971.**Current status of gene-for-gene concept.*AnnualReviewPhytopathology*, 9(1), p. 275-296.
- G. Camarena-Gutiérrez R. de la Torre-Almaráz. 2007.** Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual.*Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(2): 157-162.
- Gera, A.,Loebenstein, G. iRacah B. 1978.**Detection of Cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay.*Virology* 89: 542-545.
- Glazebrook, J. 2005.**Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.*Annual Review Phytopathology*., 43(1), p.205-227.

## Bibliografia

- Grant, M. i Lamb, C. 2006.** Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 9(4), p. 414-420.
- Gray, S. M.i Banerjee, N. 1999.** Mechanisms of Arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 128-142.
- Gregory, L.V.i Ayers, J.E. 1982.** Effect of inoculum with maize dwarf mosaic virus at several growth stages on yield of sweet corn. *Plant Disease*. 66:801-804.
- Gunes A., Cicek N.C., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Guneri E., Guzelordu T. 2006.** Genotypic response of chickpea (*Cicerarietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre-and post-anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. *Plant. Soil. Environ.* 52: 368–376
- Hammerschmidt, R. 1999.** Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. i Ahmad, A. 2010.** Effect of exogenous salicylic acid under changing environment. *Environmental Experiments in Botanica*. 68(1), p. 14-25.
- Jaulneau, V.,Cazaux, M., Hoi, J.W.S.i Dumas, B. 2010.** Host and Nonhost Resistance in MedicagoColletotrichum Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 23(9), p. 1107-1117.
- Johri, B.N., Sharma, A. iVirdi, J.S. 2003.** Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Advances Biochemical Engineering. Biotechnology* 84:49-89.
- Jones, J.D.G. iDangl, J.L. 2006.** The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Khurana, S.M.P. 1988.** Management of Potato Viruses. In *Diseases of fruits and vegetables: Diagnosis and management*, Volumen I. Ed. S.A.M.H Naqui: 388:440.
- Kloepper, J. W.I Schroth, M. N. 1978.** Plant growth promoting rhizobacteriain radish. In *Proceedings of the4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Ed. Station de Pathologic Vegetal etPhytobacteriologic. Vol. 2, pp. 879-882. Angers, France.
- Korolev, N., David, D.R. iElad, Y. 2008.** The role of phytohormones in basal resistance and Trichoderma-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *A.thaliana*. *Biocontrol*, 53(4), p. 667-683.

## Bibliografía

- Krieg, N. i J. Dóbereiner. 1984.** Bergey's Manual: Systematic bacteriology, Williams and Wilkins, 282 p.
- Larqué-Saavedra, A. 1979.** Stomatal closure in response to acetylsalicylic acid treatment. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 93:371-375.
- Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex R., Nexticapán-Garcés A., Vergara-Yoisura S., i Gutiérrez-Rendón M. (2010).** Efecto del Ácido Salicílico en el Crecimiento de Plántulas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XVI(-), 183-187.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S. i Ryals, J. 1995.** Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:863-870.
- Liu, C.L., Ruan, Y., Lin, Z.J. i Ishii H. 2008.** Antagonism between acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance and jasmonic acid-induced systemic acquired susceptibility to *Colletotrichum orbiculare* infection in cucumber. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 72(4-6), p. 141-145.
- Luz-Nelly Diaz-Puentes. 2012.** Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustria* No 10 No. 2 (257 - 267).
- Maheshwari, D K. 2011.** Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems. DOI 10.1007/978-3-642-18357-7\_2, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Mauch-Mani, B. i Métraux, J.P. 1998.** Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535-540.
- Mayer, A.M., Staples, R.C. i Gil-ad, N.L. 2001.** Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, 58(1), p. 33-41.
- Melgarejo, P., García, J., Jordà, M. C., López, M. M., Andrés, M. F. i Duran, N. 2004-2008.** Patógenos de plantas descritos en España. 2ª Edición c Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino Secretaria General Técnica Centro de Publicaciones. 858pp.
- Moffat, A. S. 1992.** Improving plant disease resistance. *Science* 257:482-483.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T. i Mosinger, E. 1995.** Pathogenesis-related Pr-1 proteins are antifungal: isolation and characterization of 3 14-Kilodalton proteins of tomato and of

## Bibliografía

- a basic Pr-1 of tobacco with Inhibitory activity against P. Infestans. *P. Physio.*, 108(1), p. 17-27.
- Okon, Y. i Labandera-González, C.A. 1994.** Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology Biochemistry* 26:1591-1601.
- Ong, J.T., Koo, Y.J., Park, J.B., Seo, Y.J., Cho, Y.J., Seo, H.S. i Choi, Y.D. 2009.** The expression patterns of AtBSMT1 and AtSAGT1 encoding a salicylic acid (SA) methyltransferase and a SA glucosyltransferase, respectively, in Arabidopsis plants with altered defense responses. *Molecules and Cells*, 28(2), p. 105-109.
- Ordentlich, A., Elad, Y. i Chet I. 1987.** Rhizosphere colonization by *Serratiamarcescens* for the control of *Sclerotiumrolfsii*. *Soil Biology and Biochemistry*. 19: 747-75.
- Perry, K. L., Zhang, L., Shintaku, M. H. i Palukaitis, P. 1994.** Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology* 205: 591-595.
- Pieterse, C.M., Van Wees, S.C.M. i Van Loon, L. 2006.** Networking by small molecule hormones in plant immunity. *Natural Chemistry Biology.*, 2009, p. 308-316.
- Pieterse, C.M.J. i Van Loon, L.C. 1999.** Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Puente, M.E., Li, C.Y. i Bashan, Y. 2004.** Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, II. Growth promotion of cactus seedlings, *Plant Biology* 6: 643-650.
- Rai D., Zachara J., Eary L., Girvin D. C., Moore C. A., Resch C. T., Sass B. M., and Schmidt R. L. (1986)** Geochemical Behavior of Chromium Species, final report. Electric Power Res. Inst.
- Rakib, A., Al-Ani, Mustafa A., Adhab, Muthannah A., El-Muadhidi, Maadh A. i Al-Fahad. (2011).** Induced systemic resistance and promotion of wheat and barley plants growth by biotic and non-biotic agents against barley yellow dwarf virus. *African Journal of Biotechnology* 10(56):12079-12084.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H-Y. i Hunt, M.D. 1996.** Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1009-1819.

## Bibliografia

- Steenhoudt, O. i Vanderleyden, J. 2000.** Azospirillum, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Review* 24:487–506.
- Sticher, L., Mauchmani, B. i Metraux, J.P. 1997.** Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology*, 35(1) , p. 235-270.
- Sylvester, E. S. 1956.** Beet yellows virus transmission by the green peach aphid. *Journal of Economic Entomology* 49 (6): 789-800.
- Tomashow, L.S. i Weller, D.M. 1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170: 3499-3508.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C. i Pedraza, R.O. 2012.** Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 356:279-290.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C. i Pedraza, R.O. 2011.** *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* 193:275–286.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A. i Klessig, D.F. 2009.** Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review Phytopathology*. 47(1), p.177-206.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F. i Park, S.W. 2008.** Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), p. 436-442.
- Watson, M. A. i F. M. Roberts. 1939.** A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus 3*, *Potato virus Y* and *Cucumber virus 1* by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proceeding of the Royal Society of London B*. 127: 543-577.
- Weller, D.M. 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 26:379–407.
- Wiermer, M., Feys, B.J. i Parker, J.E. 2005.** Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), p. 383-389.
- Williams, M.M. i J.K. Pataky. 2012.** *Maize dwarf mosaic* can reduce weed suppressive ability of sweet corn. *Weed Science* 60:577-582.

## **Webgrafia**

**Antigen-Antibody Interactions.** Consultada el 6 de novembre. Disponible a Internet: [http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/antigens\\_antibodies.html](http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/antigens_antibodies.html)

**Autoclave.** Consultada el 21 de juliol. Disponible a Internet: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/esterilizacion-desinfeccion-y-antisepsis/autocave>

**Breve historia de la Evolucion III.** Consultada el 10 d'octubre. Disponible a Internet: <http://desdeelestealoeste.blogspot.com.es/2007/04/breve-historia-de-la-evolucion-iii.html>

**Espectrofotómetro.** Consultada el 23 d'agost. Disponible a Internet: <http://www.glosariografico.com/espectrofotometro>

**García, M. J. i Silva, M.C. 2004.** Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos. Editorial Mad, S. L. 500p. Consultada el 21 de juliol. Disponible a Internet: [http://books.google.es/books?id=WB3IngLAYjAC&pg=PA221&lpg=PA221&dq=Agitador+de+bandeja+de+laboratorio&source=bl&ots=Tutwe4lfve&sig=6jxRRbIOzkHH-td9\\_tjNR8AeYVY&hl=es&sa=X&ei=8o73U4WME9PdarzbgZgB&ved=0CF0Q6AEwBw#v=onepage&q=Agitador%20de%20bandeja%20de%20laboratorio&f=false](http://books.google.es/books?id=WB3IngLAYjAC&pg=PA221&lpg=PA221&dq=Agitador+de+bandeja+de+laboratorio&source=bl&ots=Tutwe4lfve&sig=6jxRRbIOzkHH-td9_tjNR8AeYVY&hl=es&sa=X&ei=8o73U4WME9PdarzbgZgB&ved=0CF0Q6AEwBw#v=onepage&q=Agitador%20de%20bandeja%20de%20laboratorio&f=false)

**Gergerich, R.C., and V. V. Dolja. 2006.** Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible. Trans. Silvina L. Giammaría. 2008 The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0122-01. Consultada l'1 d'agost. Disponible a Internet: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/PlantVirusesEspanol.aspx>

**Inmunovirología.** Consultada el 1 d'agost. Disponible a Internet: [www.inmunovirologia.blogspot.com](http://www.inmunovirologia.blogspot.com)

**Instrumentos de laboratorio.** Consultada el 22 de juliol. Disponible a Internet: <http://www.instrumentosdelaboratorio.net/2012/05/centrifuga.html>

**Introducción al estudio de la célula.** Consultada el 20 d'octubre. Disponible a Internet: <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm>

**Preparación de diluciones.** Consultada el 29 de juliol. Disponible a Internet: [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201504/micro/4\\_1tomamuestras.htm](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201504/micro/4_1tomamuestras.htm)

## Bibliografía

**Querol, A., Almacellas, J. i Achón M. A. 2014.** Efecto de las virosis en la producción de maíz grano. Vida RURAL. Virosis más frecuentes y claves para la lucha contra estas enfermedades. 26-34. Consultada el 7 de noviembre. Disponible a Internet: [http://www.eumedia.es/portales/files/documentos/dossier\\_virosis\\_VR374.pdf](http://www.eumedia.es/portales/files/documentos/dossier_virosis_VR374.pdf)

**Reconstrucción metabólica de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* RE4 biocontroladora del nemátodo *Xiphinema index*.** Consultada l'11 d'agost. Disponible a Internet: <http://platf.biocomputing.cl/Project/Details/3>

**Resistencia Sistémica Adquirida: El "Arma Secreta" de las Plantas. Despertar la Respuesta Inmunológica de las Plantas Ofrece Protección Contra las Enfermedades. (2012).** Consultada l'11 d'agost Disponible a Internet: <http://plantasrobustas.org/salud-vegetal/Resistencia-Sistemica-Adquirida-El-Arma-Secreta-de-las-Plantas>

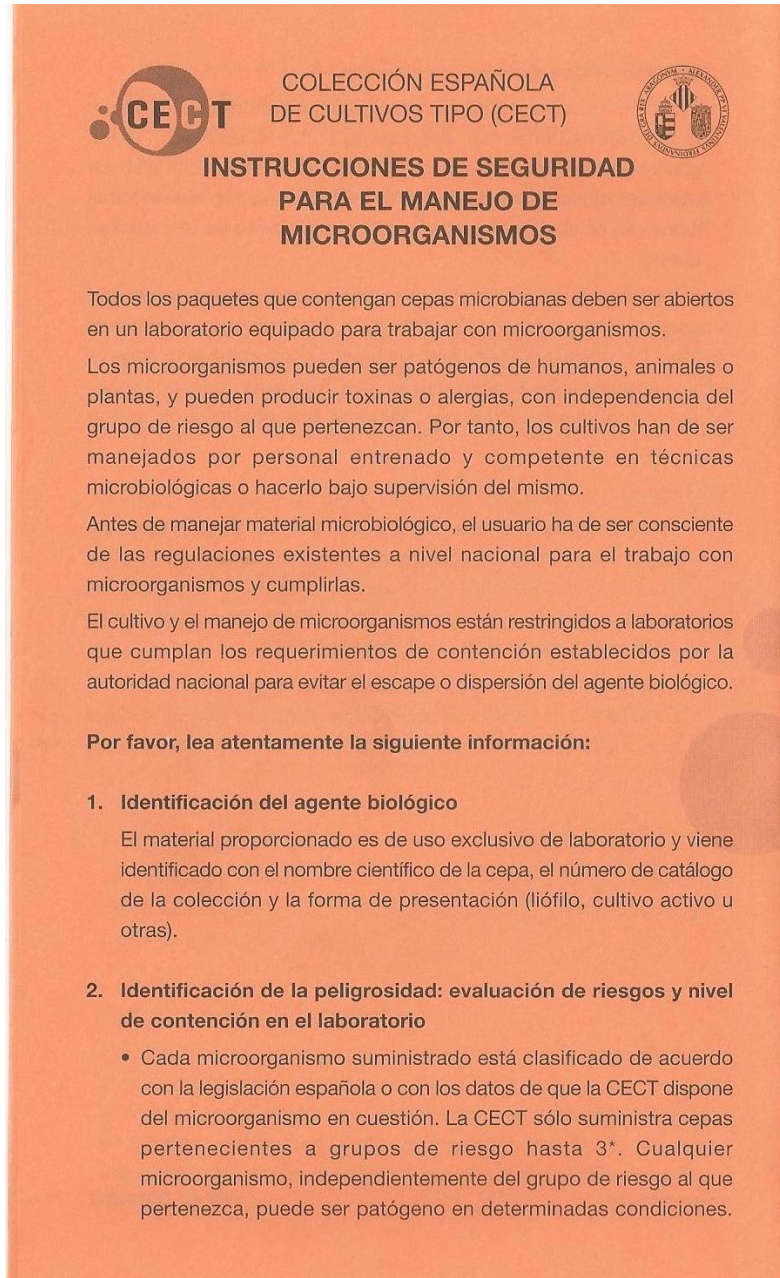
**Rossi Devivo, L. 2001.** Campanas de flujo laminar y gabinetes de seguridad biológica. Consultada el 22 de juliol. Disponible en Internet: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_Campanas\\_de\\_flujo\\_laminar.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Campanas_de_flujo_laminar.pdf)

**Tejidos vegetales.** Consultada el 17 d'octubre. Disponible a Internet: <http://slideplayer.es/slide/158738/>

**ViralZone, 2008.** SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Consultada el 30 d'octubre. Disponible en: [www.viralzone.com](http://www.viralzone.com)

## 8. Annexos

### 8.1 Annex 1. Instruccions per a manipular microorganismes i instruccions per a recuperar cultius liofilitzats



**COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)**

**INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD PARA EL MANEJO DE MICROORGANISMOS**

Todos los paquetes que contengan cepas microbianas deben ser abiertos en un laboratorio equipado para trabajar con microorganismos.

Los microorganismos pueden ser patógenos de humanos, animales o plantas, y pueden producir toxinas o alergias, con independencia del grupo de riesgo al que pertenezcan. Por tanto, los cultivos han de ser manejados por personal entrenado y competente en técnicas microbiológicas o hacerlo bajo supervisión del mismo.

Antes de manejar material microbiológico, el usuario ha de ser consciente de las regulaciones existentes a nivel nacional para el trabajo con microorganismos y cumplirlas.

El cultivo y el manejo de microorganismos están restringidos a laboratorios que cumplan los requerimientos de contención establecidos por la autoridad nacional para evitar el escape o dispersión del agente biológico.

**Por favor, lea atentamente la siguiente información:**

- 1. Identificación del agente biológico**

El material proporcionado es de uso exclusivo de laboratorio y viene identificado con el nombre científico de la cepa, el número de catálogo de la colección y la forma de presentación (liófilo, cultivo activo u otras).
- 2. Identificación de la peligrosidad: evaluación de riesgos y nivel de contención en el laboratorio**
  - Cada microorganismo suministrado está clasificado de acuerdo con la legislación española o con los datos de que la CECT dispone del microorganismo en cuestión. La CECT sólo suministra cepas pertenecientes a grupos de riesgo hasta 3\*. Cualquier microorganismo, independientemente del grupo de riesgo al que pertenezca, puede ser patógeno en determinadas condiciones.



- El trabajo con microorganismos de grupo de riesgo 2 o superior y con aquellos manipulados genéticamente requiere unos niveles de contención establecidos a nivel nacional, que son responsabilidad del receptor.
- En el catálogo de la CECT aparece reflejada la capacidad de algunos microorganismos de producir toxinas, pero dicha información no debe considerarse exhaustiva ni excluyente. La CECT se reserva el derecho de establecer restricciones en cuanto al envío de determinados microorganismos productores de toxinas.
- Se debe evitar cualquier contacto directo con el microorganismo o sus aerosoles, en especial la inhalación o el contacto con piel y ojos.

### 3. Primeros auxilios

En caso de contacto, lavar bien la piel contaminada con jabón antiséptico y agua abundante. Si se sospecha la contaminación de heridas, o se ha producido una ingestión o inhalación fortuita, se deberá buscar inmediatamente atención médica, y se informará al facultativo del nombre del microorganismo.

### 4. Medidas en caso de vertido o derrame del contenido del envase suministrado. Precauciones ambientales

- Descontaminar/esterilizar/autoclavar todo el material que haya podido estar en contacto con el cultivo microbiano.
- Mantener los cultivos alejados de desagües, agua superficial o subterránea y suelo.
- Si se rompe accidentalmente el liofilo/envase que contiene los microorganismos, empapar el área contaminada con un desinfectante apropiado. Los fragmentos de vidrio han de ser eliminados con pinzas, para evitar cortes accidentales.

### 5. Manejo y almacenamiento

Los liofilos o envases conteniendo los cultivos han de ser abiertos y manejados por personal entrenado en un laboratorio del nivel adecuado de seguridad.

### 6. Controles de exposición. Protección del personal

Depende del grupo de riesgo al que pertenezca el microorganismo y está regulado por la legislación nacional. Se minimiza la exposición de los trabajadores combinando por ejemplo el uso de recintos controlados, tales como cabinas de seguridad biológica, con otras medidas de precaución, como guantes protectores, gafas y batas de laboratorio.

### 7. Eliminación del material

Todos los recipientes que contienen cultivos deben esterilizarse una vez utilizados. La esterilización se llevará a cabo mediante tratamiento por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Esto es aplicable también a las batas de laboratorio u otros materiales resistentes al calor. El material inerte (vidrio, metal) puede ser esterilizado también en estufa de calor seco a 170-180°C durante 2 horas.

La CECT ofrece esta información basándose en la legislación vigente y el estado actual de los conocimientos. Es responsabilidad de los receptores de los cultivos estar al día y seguir las disposiciones legales pertinentes en cuanto al manejo y seguridad para prevenir los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. La CECT no acepta responsabilidad alguna en cuanto a las consecuencias derivadas del uso de esta información.

### Bibliografía:

- “Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos” [Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo (BOE nº 124, de 24 de mayo), Orden de 25 de marzo de 1998 (BOE nº 76 de 30/03/1998) y posterior corrección de erratas en el BOE nº 90 de 15/4/1998].
- Directiva 2000/54/CE del parlamento europeo y del consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.



COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO  
 Parc Científic Universitat de València  
 C/ Catedrático Agustín Escardino, 9  
 46980 Paterna (Valencia), España  
 Tel.: +34 96 354 46 12  
 http://www.cect.org



## INSTRUCCIONES PARA LA RECUPERACIÓN DE CULTIVOS LIOFILIZADOS

### Antes de empezar...

#### 1. Las ampollas se deben conservar protegidas de la luz y a temperatura controlada (entre 4 y 24°C, preferiblemente 18°C). No las congele

La CECT garantiza la viabilidad de las cepas durante 1 mes desde su envío. Muchas cepas liofilizadas son viables durante largos periodos de tiempo si se mantienen en condiciones óptimas. Este periodo varía entre las distintas cepas por lo que la CECT no puede asegurar la viabilidad transcurrido el periodo de garantía.

#### 2. Compruebe que dispone del medio de cultivo recomendado para cada cepa y que puede controlar los parámetros fisicoquímicos especificados (temperatura de incubación, condiciones de anaerobiosis,...)

Para ello consulte la ficha de la cepa en nuestro catálogo ([www.cect.org](http://www.cect.org)).

Además del medio líquido necesario para la reconstitución del liófilo, en la mayoría de los casos es conveniente que cuente también con medio sólido.

Los medios a emplear deben estar recién preparados o conservados en buenas condiciones (no resecos ni con humedad excesiva, sin contaminantes ni precipitados, no caducados).

#### 3. Asegúrese de que dispone del material básico apropiado (recipientes para desechar los fragmentos de vidrio, agua estéril, pipetas Pasteur estériles y pinzas metálicas) y de que la infraestructura de su laboratorio le permite trabajar en un entorno de seguridad microbiológica

### Apertura de la ampolla

#### 1. Calentamiento de la punta a la llama

Dependiendo de la intensidad de la combustión puede requerir entre 5 y 15 segundos (algo más si la llama es muy débil).

Asegúrese que el cono de calor sólo afecta a la punta estrecha de la ampolla para no dañar el liófilo.

El tapón interior de algodón no debe oscurecerse (pues sería señal de un calentamiento excesivo).

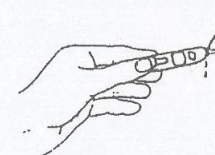


#### 2. Resquebrajado del vidrio con agua estéril

Todas estas operaciones deben hacerse con la debida atención que precisa el manejo de vidrio roto (p. ej. proteja sus ojos, no retire fragmentos con los dedos,...).

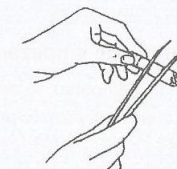
Dejar caer 1-4 gotas (gota a gota, no a chorro) de agua destilada estéril. Si no se produce ningún agrietamiento repita el paso anterior prolongando un poco el tiempo de calentamiento.

Si en el momento del resquebrajamiento el algodón se dispara hacia adentro es señal de que el calentamiento ha sido excesivo (se desplaza por la entrada violenta de aire). En tal caso, utilizar un asa de picadura para extraerlo hasta el extremo. Para más información recomendamos ver el video con las instrucciones de apertura disponible en nuestra web.



#### 3. Retirada de los fragmentos de vidrio

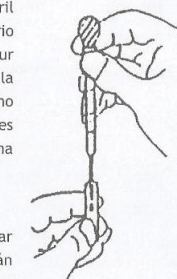
Si no se hubieran desprendido en el momento de resquebrarse se pueden retirar con ayuda de unas pinzas previamente flameadas dando un golpe seco como se muestra en la imagen (o con las puntas juntas si queremos que el golpe sea más contundente). Retire el algodón con las pinzas estériles.



### Resuspensión del liófilo y siembra

#### 1. Resuspensión

Con ayuda de una pipeta Pasteur añada 0.2-0.3 ml del medio líquido estéril recomendado para el crecimiento del microorganismo a la ampolla de vidrio abierta. Resuspenda cuidadosamente el liófilo ayudándose de la pipeta Pasteur para aspirar y expulsar la suspensión. Hágalo suavemente evitando la formación de burbujas de aire, especialmente si se trata de un microorganismo anaerobio o microaerófilo. Siempre y cuando pueda mantener las condiciones de esterilidad deje la suspensión durante 20-30 minutos hasta conseguir una rehidratación completa.



#### 2. Siembra

Utilice toda la suspensión para inocular un medio sólido (tubo con agar inclinado o placa Petri) y un tubo con 5-10 ml de medio líquido que deberán ser incubados hasta observar crecimiento antes de escalar a volúmenes mayores.

No guardar parte de la suspensión en la propia ampolla como reserva.

En la mayoría de nuestros lotes encontrará un rectángulo de filtro de celulosa. Si lo desea puede transferirlo también ya que muchas células se adhieren a él. Sin embargo, es una operación que requiere un poco de destreza (no es fácil de manipular sin contaminarlo), por lo tanto procure hacerlo sin comprometer el estado axénico de toda la suspensión.

#### 3. Incubación

Incubar a la temperatura óptima para el microorganismo siguiendo estrictamente las indicaciones de la ficha de la cepa en nuestro catálogo, (p.ej. incubación en anaerobiosis, exposición a la luz, etc.).

Algunas cepas tienen un largo periodo de latencia. Incubar hasta dos semanas antes de considerar como inviable el cultivo.

### Recomendación importante

Subcultivar al menos una vez después de la activación y antes de su uso como cepa de trabajo.

## 8.2 Annex 2. Tampons per a seguir el protocol ELISA.

10xPBS		PBS
NaCl	80 g	100ml 10xPBS + 900ml H <sub>2</sub> O destil·lada
Kh <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	29 g	
KCl	2 g	
NaN <sub>3</sub>	2 g	<b>PBS-T</b>
		1L PBS + 0,5mL de Tween20®
Afegir 800mL de H <sub>2</sub> O destil·lada		
Regular el pH a 7,4 i ajustar el volum a 1L.		
<b>Tampó de recobriment</b>		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,79 g	Afegir 500mL de H <sub>2</sub> O destil·lada i regular el pH a 9,6
NaH CO <sub>3</sub>	1,46 g	
NaN <sub>3</sub>	0,1 g	
<b>Tampó conjugat</b>		
PBS-T	1 L	Dissoldre bé
Polyvidone (PVP)	20 g	
BSA	2 g	
<b>Tampó sustrat</b>		
Dietanolamina	97 mL	Afegir això a 800mL de H <sub>2</sub> O destil·lada. Ajustar el pH a 9,8 i enrasar a 1L amb H <sub>2</sub> Od.
NaN <sub>3</sub>	0,2 g	
MgCl <sub>2</sub>	0,2 g	