



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I DE MICROBIOLOGIA



INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIES
DEPARTAMENT DE GENÈTICA VEGETAL

**IDENTIFICACIÓN DE UN CANDIDATO PARA EL GEN *nsv* QUE
CONFIERE RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS MANCHAS
NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV) MEDIANTE CLONAJE
POSICIONAL**

TESIS DOCTORAL

MÓNICA MORALES GERMÁN

2005

IDENTIFICACIÓN DE UN CANDIDATO PARA EL GEN *nsv* QUE CONFIERE
RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV)
MEDIANTE CLONAJE POSICIONAL

Memoria presentada por:

Mónica Morales Germán

Para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universitat Autònoma de
Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección de los Drs. Jordi Garcia Mas y Pere Arús i Gorina en
el Departament de Genètica Vegetal del Institut de Recerca i Tecnologia
Agroalimentàries (IRTA)

Mónica Morales Germán

VºBº

Los directores de la tesis

El tutor

Dr. Jordi Garcia Mas

Dr. Pere Arús i Gorina

Dr. Noel Xamena

Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Abril 2005

AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y acompañado en la realización de este trabajo:

En primer lugar, a mis directores de tesis, Dr Jordi Garcia Mas y Pere Arús por su constante dedicación y apoyo que de ellos he recibido durante todo este tiempo, especialmente en este último año.

Al IRTA, por la beca predoctoral que me ha permitido realizar esta tesis.

Al Dr. Noel Xamena por aceptar la tutoría de este trabajo.

A todos los compañeros del IRTA de Cabrils, y en especial:

A mis compañeros de laboratorio con los que compartí los primeros años de tesis: Marian, Txosse, Francesc, Enrique y Enric por ayudarme a sentirme como en casa. A los que se han ido incorporando durante este tiempo al laboratorio, Toni Morforte, Amparo Monfort, Werner Howad, Ana Caño, Torben Jahrmann, por sus consejos y ánimos; a Montse Martín y Santi Vilanova por los buenos ratos pasados en el comedor, sobretodo por el buen humor y los ánimos. Especialmente a las "chicas", Trini, Fuensi, Vanessa (por su gran ayuda durante las extracciones) con las que he podido contar para todo lo que he necesitado, por ser las mejores organizadoras de eventos sociales, y por los buenos momentos pasados en el labo y fuera de él. A los becarios "exiliados" de la casita, Ibo, Mourat (por sus conversaciones), Edu, Iria y Mireia (por su cordialidad y paciencia con el ordenador), por los buenos momentos. A todos los becarios de la casita 2, por esas buenas comidas veraniegas pasadas en el jardín del IRTA. A Angel y a Ia por su ayuda y amistad. A Toni Ortigosa y Eulalia, por las conversaciones durante nuestros trayectos diarios al Vallès y por sus buenos consejos.

A los compañeros del departamento de cultivo in vitro, a Ramón Dolcet-Sanjuan y Elisabeth Claveria (por el trabajo realizado con las transgénicas), a Victoria, Gisela, Marta, M^a José, Elisabeth (por sus consejos), Jose y Manoli por los divertidos desayunos que hemos compartido.

A José Aramburu, por su ayuda en los tests patológicos, por su amistad, sus consejos y apoyo, y por los buenos momentos compartidos tanto dentro y como fuera del Irta.

A Nuria Agustí, por su apoyo en estos últimos meses, por su cordialidad y por su capacidad de tranquilizarme.

A Abdelhafid Bendahmane, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio de Clonaje Posicional del INRA, de conocer otra forma de hacer ciencia, por sus continuos consejos, su ayuda y apoyo en todo momento y simplemente, por su sencillez. A Christien Clepet, por su paciencia y ayuda durante la clonación del ADNc. A los compañeros del laboratorio, Jérôme, Stéphane, Béné, Karine, Christelle por los buenos momentos pasados, especialmente a Mohamed y Hassen, por su hospitalidad y cariño.

A Filip, Carlos, Francisco y Arash por que hicieron mi estancia en París más llevadera, por esas típicas comidas acompañadas siempre de buenos vinos, y también por el agradable viaje a Bélgica.

A Cristina, amiga y compañera de viajes, de piso, de laboratorio en París, por nuestros viajes europeos, por esos paseos por las calles parisinas, londinenses..., por nuestras aventuras, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas y sobretodo, por su apoyo y ánimos. Siempre nos quedará París...

A Carolina, amiga y compañera de piso, mi "hermana" pequeña, con la que lo he compartido "casi" todo, por haberme hecho sentir como en casa cuando estaba lejos, por esas largas conversaciones llenas de sinceridad y tranquilidad que duraban hasta media noche, por descubrir juntas la ciudad, por su cariño, apoyo y consejos, especialmente durante los últimos meses.

A mis amigos, Baldo, Ángela, Manuel, Luz, M^a Carmen, Sergio y Belén, por su apoyo y amistad.

A mi familia, a mis padres, Carlos y Tere, mis hermanas y cuñados, Ana, Maite, Alberto y Clemente, y a los peques de la familia, por su apoyo y cariño, especialmente durante los años que ha durado la realización de este trabajo.

A José Luís por su apoyo incondicional.

RESUMEN

El melón (*Cucumis melo* L.) es una hortaliza de gran importancia económica en la que existen numerosos programas de mejora genética. Uno de los objetivos de estos programas ha sido la incorporación de resistencias genéticas frente a patógenos que provocan importantes pérdidas económicas en este cultivo.

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) es un *Carmovirus* endémico de la familia de las Cucurbitáceas cultivadas bajo invernadero. La única resistencia descrita hasta el momento frente a MNSV es la conferida por el gen recesivo *nsv* de melón. Esta resistencia es efectiva frente a la gran mayoría de aislados conocidos del virus. Se conoce poco sobre el mecanismo de resistencia de la interacción MNSV/*nsv*. Así pues, el estudio de esta resistencia mediante el clonaje del gen *nsv* nos permitirá comprender la estrategia que utiliza el virus para infectar a la planta y esta información podrá ser utilizada para un mejor control de este virus.

El objetivo principal de este trabajo ha sido el clonaje del gen *nsv* mediante la estrategia de clonaje posicional. En primer lugar, el gen *nsv* fue cartografiado en el grupo de ligamiento 11 del mapa genético de melón generado en nuestro laboratorio. A continuación, una población de 69 LDHs fue utilizada para obtener marcadores AFLPs y RADPs ligados al gen *nsv* mediante la estrategia del "Bulked Segregant Analysis". Dos mapas genéticos de alta resolución fueron construidos en dos poblaciones diferentes, una F₂ de 408 individuos y un BC1 de 2727 individuos. Los marcadores flanqueantes y los que cosegregaban con el gen en la primera población de LDHs fueron convertidos en marcadores de PCR para ser usados fácilmente en estas poblaciones de gran tamaño. Además, dos genotecas de BACs de melón, una generada a partir de un genotipo resistente a MNSV y otra a partir de uno susceptible, fueron examinadas con estos marcadores y se obtuvo un mapa físico de la región del gen *nsv* mediante paseo cromosómico. En la población F₂, los marcadores flanqueantes al gen 1L3 y 5B3sp6 se encontraban separados entre sí por 4 recombinantes, mientras que en la población BC1 los marcadores flanqueantes eran 1L3 y 10O16sp6 y 20 el número de recombinantes entre ellos. La relación distancia física/distancia genética en esta región del genoma de melón se estimó en 228 kb/cM, relación óptima para llevar a cabo el clonaje posicional del gen. Finalmente, se ha llegado a identificar el BAC 1-21-10 que contiene físicamente al gen *nsv*.

La existencia de microsintenia en la región del gen *nsv* con una región del genoma de *Arabidopsis* permitió la identificación de un gen candidato para *nsv* de una manera rápida. Se identificó el factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) como el candidato para *nsv*, que había sido previamente identificado como el responsable de la resistencia frente a potyvirus en pimiento, guisante y lechuga. El desarrollo de un marcador de PCR a partir del eIF4E de melón confirmó que éste cosegregaba con el gen *nsv* en las poblaciones F₂ y BC1. A continuación, la secuenciación completa del ADNc de eIF4E reveló que la única diferencia entre las secuencias del alelo resistente y de dos alelos susceptibles residía en un nucleótido, que correspondía con un cambio de aminoácido en la posición 228 de la proteína: una leucina en el genotipo resistente a MNSV y una histidina en los dos genotipos susceptibles. Probablemente, esta mutación en eIF4E es la responsable de la resistencia presente en PI161375.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El melón	1
1.1.1. Origen y taxonomía	1
1.1.2. Importancia económica	2
1.1.3. El genoma del melón	2
1.1.4. Mejora genética del melón	3
1.2. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV)	5
1.2.1. Situación taxonómica del MNSV, organización del genoma y funciones génicas	5
1.2.2. Distribución geográfica, transmisión y control del MNSV	6
1.3. Interacción planta-patógeno	7
1.3.1. Resistencia mediada por genes R	8
1.3.1.1. La estructura y su función de los genes R	8
1.3.1.2. Distribución y origen de los genes R	11
1.3.1.3. Factores de avirulencia de genes R	12
1.3.2. Resistencias recesivas	13
1.3.2.1. Resistencia frente a virus	13
1.3.2.2. Resistencia recesiva frente a bacterias y hongos	15
1.4. Respuestas de defensa inducidas e inespecíficas	16
1.5. Aproximaciones de clonaje de genes de interés agronómico	18
1.5.1. Clonaje posicional	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	23
3.1. Material vegetal	23
3.2. Test de resistencia al MNSV	24
3.3. Clonaje en plásmido	26
3.3.1. Cepas	26
3.3.2. Transformación de Escherichia coli	26
3.3.2.1. Electroporación	26
3.3.2.2. Choque térmico	26
3.4. Extracción del ADN plasmídico	27
3.4.1. Minipreparación	27
3.4.2. Midipreparación	27
3.4.3. Maxipreparación	28
3.5. Extracción de ADN genómico	28
3.5.1. Extracción de ADN genómico en tubo eppendorf (mini extracción)	29
3.5.2. Extracción en placa de 96 pocillos	29
3.5.3. Extracción de tubo de 50 mL	30
3.6. Extracción del ARN	31
3.6.1. Extracción del ARN total	31
3.6.2. Purificación del ARN poliA ⁺	31
3.7. Electroforesis del ADN	32
3.7.1. Electroforesis en geles de agarosa	32
3.7.2. Geles desnaturalizantes de acrilamida	33

3.8. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR	33
3.8.1. Diseño de cebadores	33
3.8.2. Reacción de amplificación de PCR	33
3.8.3. PCR inversa o iPCR	34
3.8.4. PCR específica de alelo	35
3.9. Secuenciación automática del ADN	35
3.9.1. Reacción de PCR de secuencia	35
3.9.2. Precipitación de las reacciones de secuencia en placa	35
3.10. Manipulación del ARN	36
3.10.1. Síntesis del ADNc	36
3.10.2. Amplificación de los extremos del ADNc mediante RACE-PCR	38
3.10.3. Análisis por Northern	38
3.10.3.1. Electroforesis del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído	38
3.10.3.2. Transferencia del ARN a un soporte sólido	38
3.10.3.3. Hibridación y lavados	38
3.11. Marcadores moleculares	39
3.11.1. RAPDs (“Random Amplified Polymorphic DNA”)	39
3.11.2. AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”)	40
3.11.2.1. Digestión del ADN	41
3.11.2.2. Ligación de adaptadores específicos	41
3.11.2.3. Amplificación del ADN	41
3.11.2.4. Visualización de los fragmentos AFLP	43
3.11.3. RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”)	44
3.11.3.1. Digestión del ADN genómico	44
3.11.3.2. Electroforesis	44
3.11.3.3. Transferencia a un soporte sólido	45
3.11.3.4. Hibridación y exposición de las muestras	45
3.11.4. SCAR (“Sequence Characterised Amplified Region”)	45
3.11.5. CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”)	46
3.11.6. Microsatélites o SSR (“Simple Sequence Repeats”)	47
3.11.7. Detección de SNPs mediante SNaPshot	47
3.12. Análisis de segregación en mezclas de ADN (“Bulked Segregant Analysis” o BSA)	48
3.13. Genotecas de BACs	49
3.13.1. Organización y cribado de las genotecas de BACs	49
3.13.2. Minipreparación de ADN de BACs	50
3.13.3. Secuenciación de los extremos de los BACs	50
3.13.4. Desarrollo y cartografiado de marcadores moleculares a partir de los extremos de BACs	52
3.13.5. Construcción del mapa físico	52
3.14. Cartografiado genético y físico	53
3.15. Análisis de las secuencias	53
4. SATURACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES DE LA REGIÓN FLANQUEANTE AL GEN <i>nsv</i> QUE CONFIERE RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV) EN MELÓN	55
4.1. INTRODUCCIÓN	55
4.2. RESULTADOS	56
4.2.1. Cartografiado del locus <i>nsv</i> en el mapa genético de melón	56

4.2.2. Marcadores moleculares ligados al gen nsv y BSA _____	57
4.2.3. Saturación de la región del gen nsv con marcadores moleculares _____	59
4.3. DISCUSIÓN _____	61
5. MAPA GENÉTICO DE MEDIA RESOLUCIÓN Y MAPA FÍSICO DEL LOCUS nsv EN LA POBLACIÓN F₂ _____	65
5.1. INTRODUCCIÓN _____	65
5.2. RESULTADOS _____	65
5.2.1. Conversión de los marcadores AFLPs y RAPDs en marcadores específicos de PCR _____	65
5.2.1.1. Conversión de marcadores AFLPs en marcadores tipo CAPS _____	65
5.2.1.2. Conversión de marcadores RAPD en marcadores de PCR _____	70
5.2.2. Búsqueda de recombinantes entre los marcadores M29, M132, X15 y D0871 _____	
5.2.3. Cartografiado del locus nsv en el mapa genético de melón de la población F ₂ _____	72
5.2.4. Identificación de BACs positivos para los marcadores, desarrollo de nuevos marcadores a partir de sus extremos y construcción del mapa físico _____	73
5.2.4.1. Identificación de los clones BAC 7K20, 5A6 y 38B12 _____	73
5.2.4.2. Identificación del BAC 30L11 _____	75
5.2.4.3. Identificación del BAC 5B3 _____	76
5.2.4.4. Identificación del BAC 52K20 _____	77
5.2.4.5. Identificación del BAC 1-21-10 _____	78
5.3. DISCUSIÓN _____	81
6. MAPA GENÉTICO DE ALTA RESOLUCIÓN Y MAPA FÍSICO DEL LOCUS nsv EN UNA POBLACIÓN BC1 _____	85
6.1. INTRODUCCIÓN _____	85
6.2. RESULTADOS _____	85
6.2.1. Desarrollo de los marcadores específicos de alelo _____	85
6.2.2. Test de resistencia al MNSV en la población BC1 _____	87
6.2.3. Búsqueda de individuos recombinantes entre los marcadores flanqueantes ns1 y ns2 y cartografiado del gen nsv en la población BC1 _____	87
6.2.4. Cribado de la genoteca de BACs del parental WMR-29 e identificación de BACs positivos para los marcadores _____	89
6.2.5. Mapa físico y genético desarrollado en la población BC1 _____	90
6.3. DISCUSIÓN _____	95
7. ANÁLISIS DE MICROSINTENIA Y CLONAJE DE UN GEN CANDIDATO PARA nsv _____	97
7.1. INTRODUCCIÓN _____	97
7.2. RESULTADOS _____	97
7.2.1. Análisis de microsintenia con Arabidopsis thaliana e identificación de un gen candidato para el gen nsv _____	97
7.2.2. Clonaje del eIF4E de melón _____	100
7.2.2.1. Diseño de los cebadores degenerados _____	100
7.2.2.2. Amplificación con cebadores degenerados en ADN de melón _____	100

7.2.2.3. Diseño de cebadores específicos de eIF4E de melón y amplificación sobre ADN genómico	101
7.2.3. Desarrollo de un marcador molecular a partir del melF4E y cartografiado de éste en las poblaciones F ₂ y BC1	102
7.2.3.1. Cartografiado de melF4E en la población F ₂	102
7.2.3.2. Cartografiado del marcador melF4E en la población BC1	103
7.2.4. Clonaje del ADNc de secuencia completa del eIF4E de melón	105
7.2.4.1. Extracción y cuantificación del ARN	105
7.2.4.2. Diseño de cebadores específicos en la región exónica de la secuencia genómica parcial del eIF4E de melón	106
7.2.4.3. Obtención del ADNc de secuencia completa del eIF4E	106
7.2.5. Polimorfismo detectado entre eIF4E de PI, Ved y WMR-29	108
7.2.6. Localización y amplificación de los intrones del eIF4E de melón	112
7.2.7. Estructura y secuencia completa del gen eIF4E de melón	114
7.2.8. Análisis por Southern-blot	115
7.3. DISCUSIÓN	117
8. SNPs DETECTADOS EN ESTs DE MELÓN	121
8.1. INTRODUCCIÓN	121
8.2. RESULTADOS	123
8.2.1. Distribución y tipos de polimorfismos	123
8.2.2. Detección de SNPs y mapeado	126
8.3. DISCUSIÓN	128
9. DISCUSIÓN GENERAL	133
10. CONCLUSIONES	139
11. BIBLIOGRAFÍA	141
12. APÉNDICES	153
APÉNDICE A	153
APÉNDICE B	159

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El melón

1.1.1. Origen y taxonomía

El melón (*Cucumis melo* L.) pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, la cual comprende unas 750 especies distribuidas en 90 géneros, la mayoría de ellas de zonas cálidas, sobretodo de regiones tropicales y subtropicales. De esas 750 especies hay aproximadamente unas 30 que son especies cultivadas (Nuez y col., 1996), entre ellas la sandía (género *Citrullus*), el pepino (género *Cucumis*), la calabaza y el calabacín (género *Cucurbita*).

El género *Cucumis* comprende 32 especies, algunas de ellas cultivables, siendo el melón y el pepino los cultivos más importantes, y el resto corresponden a especies silvestres africanas. Dentro de este género, 30 especies, incluido el melón, presentan un número cromosómico básico de $n=12$ y únicamente dos de ellas, *C. sativus* L. y *C. hystrix* Chakravarty, presentan un número $n=7$ (Kerje y Grum, 2000).

El origen se sitúa en África para las especies del género *Cucumis* con número cromosómico básico 12, mientras que *C. hystrix* Chakravarty y *C. sativus* tienen su origen en China y desde allí se distribuyó a Tailandia e India (Pitrat y col., 2000). El cultivo del melón se describe en el año 2000 a.C. en Egipto, Mesopotamia, este de Irán y China y en el año 1000 a.C. en la India. Desde el continente africano el melón se expandió hacia Asia y desde allí a Europa. La domesticación se produjo principalmente en Asia, donde el comercio intensivo y la elevada domesticación produjeron una rápida dispersión y diversificación de la especie en numerosos cultivares (Kerje y Grum, 2000).

El melón es una de las especies más diversas dentro del género *Cucumis* (Kirkbride, 1993), y es en los frutos de las variedades cultivadas donde se encuentra el mayor grado de diversidad. Este polimorfismo ha llevado a los botánicos a proponer diferentes clasificaciones intraespecíficas, siendo la clasificación más aceptada, la que divide el género en 7 grupos: 6 que incluyen las variedades cultivadas (*cantalupensis*, *inodorus*, *conomon*, *flexuosus*, *dudaim*, *momordica*) y un grupo que incluye las variedades silvestres (*agrestis*) (Munger y Robinson, 1991).

Por otro lado, el estudio con marcadores moleculares (Perl-Treves y col., 1998; Silberstein y col., 1999; Stepansky y col., 1999; Monforte y col., 2003) ha confirmado la división de la especie en dos subespecies (subsp. *Agrestis* y subsp. *Melo*) y ha propuesto a India y África como centros de diversificación.

1.1.2. Importancia económica

El melón es una especie vegetal de importancia económica a escala mundial. Se cultiva ampliamente en casi todas las regiones templadas, tropicales y subtropicales del mundo. El fruto es la parte más aprovechable de la planta. Algunos de los melones de mayor comercialización son los tipo Cantaloupe reticulado y Honeydew, cultivados e importados por los Estados Unidos; y los tipo Galia, Piel de Sapo y Charentais, producidos y distribuidos especialmente en Europa.

De acuerdo con las estadísticas de la FAO, el melón es uno de los principales productos de fruta dulce consumida en fresco. La producción de este cultivo se centra en Asia, con un 65% de la producción mundial, teniendo como principal productor Turquía. El resto de la producción se divide entre América con un 13.7% de la producción, Europa con un 9.1% y África con un 6.74%, siendo Estados Unidos, España y Egipto sus principales productores, respectivamente. En el año 2003, el melón representó en España el segundo cultivo hortícola, después del tomate, tanto en producción (1.031.900 t) con en superficie de cultivo (38.900 Ha). Los datos del año 2004 son del mismo orden. La mayor producción se encuentra en Andalucía, concretamente Almería, con un 69% de la producción de toda la comunidad autónoma; y en Castilla la Mancha (FAO, 2004).

En los últimos años, ha habido una tendencia a la disminución de la superficie cultivada y sin embargo, un aumento en la producción. Esto se puede explicar por el uso de nuevas variedades mejoradas y por el aumento de la superficie dedicada al cultivo protegido (Torres, 1997).

1.1.3. El genoma del melón

El melón es una especie diploide con un número básico de cromosomas $n=12$ ($2n=2x=24$) (Whitaker, 1976). El tamaño de su genoma se ha estimado en 450-500 Mb (Arumuganathan y Earle, 1991), muy cercano al del arroz (419 Mb) y un poco más del triple que el de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (125 Mb). El ADN repetitivo se ha cuantificado entre un 30% (Benich y Anderson, 1974) y un 40% (Neuhausen, 1992). Este elevado valor puede ser debido a la presencia de grandes cantidades de ADN tipo microsatélite, retrotransposones, transposones o pseudogenes, presentes en el genoma del melón.

El polimorfismo detectado en el ADN de esta especie es relativamente bajo (Wang y col., 1997; Kerje y Grum, 2000), a pesar de la gran variabilidad fenotípica que se observa en *C. melo*, sobre todo en el fruto. No obstante, Neuhausen (1992) afirma que a pesar del bajo nivel de polimorfismo, éste es suficiente para construir mapas

genéticos o estudiar la filogenia si se utilizan individuos distantes procedentes de bancos de germoplasma. Por otro lado, en los estudios de filogenia realizados entre distintos genotipos de melón se ha llegado a observar un 57% de sondas polimórficas de RFLPs, AFLPs y RAPDs, indicando la existencia de un grado considerable de polimorfismo (García-Mas y col., 2000).

1.1.4. Mejora genética del melón

En los últimos años, se han establecido diferentes programas de mejora genética de esta especie, tanto en España como en otros países productores, justificados por la importancia económica del cultivo del melón. Los principales objetivos que se han llevado a cabo en estos programas han sido: 1) la producción de frutos de mayor calidad adaptados a las exigencias del mercado, unido a las características organolépticas como el aroma, el dulzor y la firmeza de la pulpa; 2) la producción de variedades tempranas, regulares y de rendimiento elevado, que permitan tener un fruto de mayor valor en el mercado en épocas de no-abundancia y con variedades que produzcan mayores rendimientos; 3) la producción de frutos adaptados a condiciones adversas del medio físico (como el frío, la sequía, la falta de luz o la salinidad) para aumentar la producción en determinadas zonas poco favorables; 4) el aumento de la conservación postcosecha de los frutos, que permita la comercialización de variedades en zonas alejadas de donde se producen; 5) la incorporación de resistencia a plagas y enfermedades, uno de los mayores problemas del cultivo del melón que provoca importantes pérdidas económicas.

Las enfermedades que aparecen asociadas al cultivo del melón pueden ser producidas por una gran variedad de patógenos, entre los que se encuentran los insectos, como la mosca blanca y el pulgón; o los ácaros, como la araña roja. Sin embargo, las enfermedades que aparecen con más frecuencia en los cultivos de melón, tanto al aire libre como en invernaderos, son las ocasionadas por hongos (oidio (*Sphaerotheca fuliginea*), mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*) o fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*), bacterias y virus. Los principales virus que afectan a los cultivos españoles cultivados al aire libre son el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), el virus de las manchas circulares de la papaya (*Papaya ringspot virus*, PRSV), el virus del mosaico de la sandía (*Watermelon mosaic virus*, WMR) y el virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) (Luis-Arteaga y col., 1998), transmitiéndose de forma no persistente por pulgones y provocando grandes pérdidas económicas si afectan a plantas jóvenes. En cultivos protegidos, los principales virus que infectan son el virus del enanismo

amarillento de las cucurbitáceas (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV) y el virus del amarilleo de las venas del pepino (*Cucumber vein yellowing virus*, CVYV), transmitidos por la mosca blanca de forma semipersistente (Berdiales y col., 1999) y el virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) transmitido por el hongo *Ospidium bornavanus* y a través de semillas (Luis-Arteaga, 1991; Cuadrado y col., 1993).

Los virus son los patógenos que adquieren mayor importancia debido a la dificultad que supone su control. Frente a hongos y bacterias, se pueden utilizar productos químicos para proteger al cultivo; sin embargo, frente a virus no se dispone de esta posibilidad, ya que el virus precisa de la maquinaria de la planta para multiplicarse. Por ello, el uso de resistencias naturales como método de control de las enfermedades producidas por virus es una de las mejores alternativas, y presenta la ventaja que no supone ningún esfuerzo para el agricultor, ni gasto económico ni ecológico adicional, como ocurre en los casos donde se aplican plaguicidas para controlar a los vectores de los virus (como insectos u hongos).

El estudio de recursos filogenéticos ha mostrado la existencia de fuentes de resistencia a algunas enfermedades en ciertos genotipos (Gómez-Guillamón y col., 1998; Lecoq y col., 1998; Pitrat y col., 1998). No obstante, estas resistencias suelen encontrarse en genotipos salvajes muy lejanas de las cultivadas en España (Álvarez, 1997), dificultando el proceso de mejora ya que se necesitan un gran número de generaciones de retrocruzamiento para incorporar la resistencia. Todas estas razones hacen pensar en la necesidad de utilizar nuevas técnicas que superen estos inconvenientes. La biotecnología abre muchas posibilidades en el campo de la mejora genética, permitiendo que los procesos sean más rápidos y fiables. En este sentido, las técnicas biotecnológicas más interesantes son la selección asistida por marcadores moleculares, las técnicas de cultivo *in vitro* y la transformación genética.

Los marcadores moleculares y los mapas genéticos son parte importante de estas técnicas y sirven para identificar genes de interés. Los marcadores existen en un número elevado, lo que permite construir mapas genéticos de alta densidad, que son la base para llevar a cabo programas de mejora asistida por marcadores (MAS). Esto nos permite hacer cruces dirigidos y diagnóstico de las características deseadas precozmente, sin tener que esperar a que la planta sea adulta. En los mapas genéticos se pueden localizar genes de interés como resistencias a enfermedades, características agronómicas o del fruto. El desarrollo de marcadores que nos permitan determinar la presencia o no del gen deseado, sin estar influidos por el ambiente, es una forma de selección más rápida y fiable que los procesos de selección tradicional.

1.2. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV)

1.2.1. Situación taxonómica del MNSV, organización del genoma y funciones génicas

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) pertenece al género *Carmovirus*, uno de los 7 géneros de la familia *Tombusviridae* de virus de plantas (Murphy y col., 1995). Los miembros de este género se caracterizan por tener morfología similar, partículas icosaédricas, y genomas pequeños de RNA de menos de 4.4 Kb, normalmente de cadena simple. El genoma de los *Carmovirus* se parece al de los géneros *Aureusvirus* y *Tombusvirus* por presentar 5 marcos abiertos de lectura potenciales (“Open Reading Frame” ORFs) y una gran proteína de la cápside (“Coat Protein” CP) de más de 35 kDa, pero se diferencia de éstos por presentar un genoma de menor tamaño (<4.4 Kb). La morfología de los viriones es isométrica. Las partículas tienen un diámetro alrededor de 30 nm y están compuestas por ácido nucleico en un 17% (Hibi y Furuki, 1985).

Las características del genoma dentro del género *Carmovirus* son: la presencia de una única molécula de ARN linear, de cadena simple, positiva y de longitud entre 4000-4100 nt, ausencia de la cola de poliadenilación en el extremo 3' y de la estructura cap (m^7G^5pppNp) en el extremo 5', ésta última demostrada únicamente en el virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV).

Actualmente, se conoce la secuencia nucleótida completa de dos aislados del MNSV: el aislado MNSV-M α 5 (Díaz y col., 2003) y el MNSV-Duch (Riviere y Rochon, 1990). Nosotros hemos trabajado con el aislado MNSV-M α 5, caracterizado por Díaz y col. (2003). El análisis de la secuencia de 4271 nt de MNSV-M α 5 reveló que su genoma presenta 5 posibles ORFs, una región no codificante en el extremo 5' (5'-UTR) de 84 nt y otra en el 3' (3'UTR) de 287 nt (**Fig. 1.1**). Los 5 ORFs codificarían para: la polimerasa de 29 kDa (p29) (ORF1), cuyo marco de lectura se extiende desde el nucleótido 85 hasta el 891, la polimerasa de 89 kDa (p89) (ORF2: 85-2460 nt), la proteína del movimiento 1 de 7 kDa (p7A) (ORF3: 2439-2636 nt), la proteína de movimiento 2 de 7 kDa (p7B) (ORF4: 2640-2825 nt) y la proteína de la cápside de 42 kDa (CP) (ORF5: 2815-3984 nt). Tras el codón de parada del ORF5 se encuentra la región no codificante 3'UTR (Díaz y col., 2003). La estrategia de expresión propuesta para MNSV es similar a la de otros carmovirus, y describe que el ARN genómico viral (ARNg) actuaría como mensajero de las proteínas p29 y p89, y el ARN subgenómico 1 (ARNsg1) como mensajero de las proteínas p7A y p7B y el ARNsg2 como mensajero de la proteína de la CP (Riviere y Rochon, 1990) (**Fig. 1.1**). La comparación de las

secuencias de los dos aislados, MNSV-M α 5 y MNSV-Duch, mostró una organización genómica similar, excepto por la presencia de un codón ámbar entre los ORF3 y ORF4 en el aislado holandés, pudiéndose expresar una proteína de 14 kDa (Riviere y Rochon, 1990), mientras que MNSV-M α 5 presenta un codón stop en esta misma posición (Díaz y col., 2000).

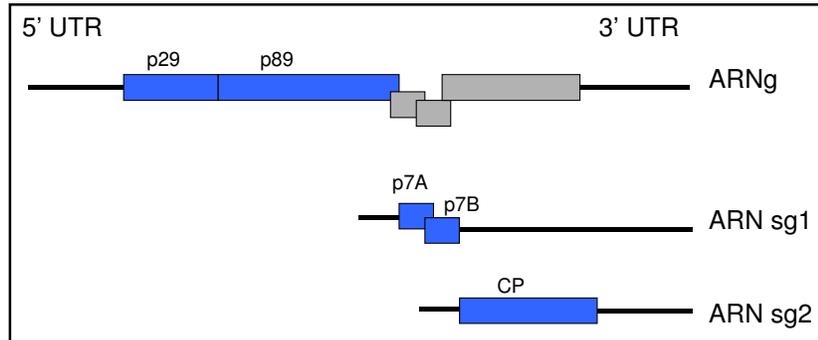


Fig. 1.1. Organización genómica y probable estrategia de expresión de MNSV (Riviere y Rochon, 1990). Las proteínas p29 y p89 se expresarían a partir de ARNg, las proteínas del movimiento p7A y p7B a partir del ARNsg1 y la CP a partir de ARNsg2.

1.2.2. Distribución geográfica, transmisión y control del MNSV

La gama de huéspedes de MNSV se limita principalmente a la familia de las cucurbitáceas que crecen en invernaderos, como por ejemplo el melón, la sandía o el pepino (Hibi y Furuki, 1985). Los síntomas que provoca la enfermedad son lesiones necróticas en hojas, manchas necróticas y acorchamientos en frutos y estrías necróticas en tallos, provocando grandes pérdidas en la producción. En 1966, fue descrito por primera vez en Japón (Kishi, 1966) y fue más tarde, en 1979, cuando se registró en invernaderos de zonas de California (Gonzales-Garza y col., 1979) y Grecia (Avgelis, 1990). En Holanda y Reino Unido hubo una gran incidencia del virus en cultivos de pepino a principios de los 80 (Bos y col., 1984). En España fue descrito por primera vez en 1984 y afectando a los cultivos protegidos del melón de la costa mediterránea (Cuadrado y col., 1993; Luis-Arteaga y col., 1998), aunque también se ha descrito en cultivos de sandía y pepino, pero sin representar un gran problema en estos últimos. Así pues, MNSV es un virus endémico de los cultivos de cucurbitáceas crecidos en invernaderos en todo el mundo (Hibi y Furuki, 1985).

La transmisión natural del virus se realiza a través de las zoosporas del hongo *Olpidium bornovanus* y a través de semillas infectadas (Gonzales-Garza y col., 1979; Avgelis, 1985). Sin embargo, la frecuencia de transmisión del virus a través de semillas aumenta mucho cuando el hongo está presente en el suelo (Furuki, 1981).

Por otro lado, la localización del virus se ha descrito en las cubiertas de las semillas infectadas (Campbell, 1996).

Para controlar el MNSV se pueden utilizar semillas libres de virus y variedades genéticas resistentes, pero también es importante controlar el vector de transmisión. Los tratamientos de desecación de más de 4 días (Dumas de Vaulx, 1970) o los tratamientos con ácidos pueden eliminar el virus de la cubierta de la semilla. Estos tipos de tratamientos son importantes sobretodo cuando se trabaja con colecciones de germoplasma. Estas prácticas implican un elevado coste económico y ecológico, por tanto, una solución a estos problemas sería la utilización de variedades resistentes al virus.

En la actualidad, se conocen al menos dos fuentes naturales de resistencia: el cultivar “Gulfstream” y la accesión coreana PI 161375 (**Fig. 3.1**). La resistencia genética a MNSV está controlada por el alelo recesivo del gen *nsv* (Coudriet y col., 1981). Esta resistencia es efectiva frente a todos los aislados conocidos del virus, excepto uno que es capaz de superarla (MNSV-264) y que ha sido descrito en Murcia (Díaz y col., 2000). En estos momentos existen en el mercado diversas variedades comerciales e híbridos que incorporan la resistencia a *nsv*, pero sin duda, el conocimiento del mecanismo de resistencia mediante el clonaje del gen *nsv* nos permitirá comprender la estrategia que utiliza el virus para superar la resistencia y esta información podrá ser utilizada para un mejor control del virus.

1.3. Interacción planta-patógeno

Sólo una pequeña proporción de las infecciones producidas por patógenos produce enfermedades y esto se debe principalmente a varias razones: a) la especie vegetal atacada por el patógeno no presenta los requerimientos que éste necesita y la planta se considera no-huésped (resistencia a nivel de especie o “non-host resistance”); b) a la presencia de barreras preformadas, estructuras o componentes tóxicos que presenta la planta y que impiden la entrada del patógeno; c) los mecanismos de defensa son activados tras el reconocimiento planta-patógeno. En todos estos casos decimos que la interacción es incompatible (resistencia) pero sólo en el tercer caso el mecanismo de defensa depende exclusivamente de respuestas inducidas para limitar el ataque del patógeno. La enfermedad (interacción compatible) ocurrirá sólo cuando las defensas preformadas de la planta sean inadecuadas, las condiciones ambientales sean favorables para el patógeno y/o si las repuestas activas de defensa no sean efectivas.

1.3.1. Resistencia mediada por genes R

La resistencia a enfermedades en plantas depende a menudo de la capacidad de la planta de reconocer al patógeno y de provocar una activación rápida de los mecanismos de defensa de la misma. La existencia de este proceso de reconocimiento específico ha sido revelada por el análisis de interacciones planta-patógeno. La definición genética de esta interacción se explica mediante la hipótesis de Flor obtenida tras su trabajo realizado de la interacción entre el lino cultivado (*Linum usitatissimum*) y el hongo biotrófico *Melampsora lini* (Flor, 1947). Flor demostró que la expresión o no de la resistencia de la planta, en un reconocimiento específico planta-patógeno, está gobernada por la presencia de un gen de resistencia dominante (*R*) en la planta, el producto del cual es reconocido por el producto de un gen específico de avirulencia dominante (*Avr*) del patógeno. Una pérdida o alteración de algunos de los dos genes inducirá la enfermedad. Este es el denominado sistema gen-a-gen (Flor, 1971). El modelo fue desarrollado en una interacción planta-hongo, sin embargo, también proporciona la base genética para la mayoría de las resistencias activas en plantas contra patógenos tan diversos como bacterias, hongos, virus, nemátodos e insectos (Keen, 1990; Dangl, 1992).

1.3.1.1. La estructura y su función de los genes R

Desde que en 1993 se identificara el primer gen de resistencia en tomate, *Pto*, mediante una aproximación del clonaje posicional (Martin y col., 1993), se han identificado y clonado un gran número de genes R que confieren resistencia frente a patógenos muy diversos. A pesar de ello, los genes R se pueden agrupar principalmente en sólo 4 clases que codifican proteínas estructuralmente similares. Esta similitud sugiere una elevada conservación de los mecanismos de transducción de señales existentes en las plantas para desencadenar las respuestas de defensa mediadas por genes R.

La primera clase de genes R es la más abundante y codifica para proteínas de la clase NBS-LRR (“nucleotide-binding site leucin-rich repeat”) (Dangl y Jones, 2001). El dominio LRR está constituido de un número variable de secuencias repetitivas ricas en leucinas y otros residuos hidrofóbicos posicionados de manera regular. Los dominios LRR de algunas proteínas están implicados en funciones de interacción entre proteínas, interacción proteínas-carbohidratos y en unión de péptidos-ligandos (Jones y Jones, 1996; Kajava, 1998), por esta razón se supone que en los genes R estarían implicados en la interacción directa con el elicitador (*Avr*) (Bendahmane y col., 2000; Ellis y Peter, 2000).

El dominio NBS (“Nucleotide Binding Site”) está presente en diversas proteínas con actividad de unión a ATP o GTP, como las ATPasas y las proteínas G, lo que sugiere una posible función en las proteínas R como lugares de unión a nucleótidos; sin embargo, no está claro como ocurren estas uniones (Dangl y Jones, 2001). El dominio NBS abarca diferentes secuencias: quinasa 1a (también conocida como P-loop que presenta la secuencia consenso GXXXXGK[T/S]), quinasa 2 y quinasa 3. La presencia del dominio NBS altamente conservado en muchos de los productos de los genes R sugiere que la función de unión a nucleótidos sería esencial para el funcionamiento de estas proteínas. Sin embargo, el papel de los dominios NBS en la activación de las defensas de las plantas todavía no se conoce (Bent, 1996).

Dentro de los genes R con dominio NBS-LRR, se pueden distinguir dos subclases, en función de la naturaleza del extremo N-terminal: la presencia de un dominio TIR o de un dominio CC. La subclase TIR-NBS-LRR presenta un dominio denominado TIR (*Toll/Interleukin-1 Resistance*) que tiene una gran homología con dominios citoplasmáticos de señales intracelulares de la proteína *Toll* de *Drosophila* y del receptor Interleukina 1 de mamíferos (con una similitud en la secuencia de aminoácidos del 42 y 41% respectivamente) (Hammond-Kosack y Jones, 1997). Esto indica que el dominio TIR estaría implicado en vías de transducción de señales, por la similitud que presenta con los dominios citoplasmáticos de *Toll* y IL-1, además también podría estar implicado en el reconocimiento específico del patógeno. En este grupo estarían incluidos los genes *N* de tabaco frente al virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Whitham y col., 1994), el gen *L6* de lino frente *M. lini* (Lawrence y col., 1995) o *RPP5* de *Arabidopsis* frente al hongo *Peronospora parasitica* (Parker y col., 1997).

La subclase CC-NBS-LRR presenta en el extremo N-terminal un dominio CC (“coiled coil”), que es una secuencia repetida de 7 residuos con aminoácidos hidrofóbicos intercalados. La estructura del dominio CC consiste en dos o más hélices alfa que interaccionan para formar una estructura helicoidal y que podrían estar implicadas en interacciones proteínas-proteínas, incluso en la formación de dímeros o trímeros, aunque también podrían estar involucradas en la transducción de señales (Martin y col., 2003). En este grupo están incluidos los genes *RPS2* de *Arabidopsis* frente a *P. syringae* (Mindrinos y col., 1994) y el *Rx* de patata frente al virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX) (Bendahmane y col., 1999).

La segunda clase de genes R, la clase que codifica para serin-protein quinasas (PK), estaría representado por un solo miembro, el gen *Pto* de tomate que confiere resistencia a *P. syringae*, probablemente de localización citoplasmática. El clonaje del

este gen puso en evidencia la importancia de sistemas de fosforilación/desfosforilación en la transducción de señales activando las defensas del huésped (Martin y col., 1993).

Las clases de genes R descritas hasta el momento carecen de dominios transmembrana (TM) lo que sugiere una localización intracelular de sus productos.

La tercera clase de genes R la forman los distintos genes *Cf* (*Cf-2* (Dixon y col., 1996), *Cf-4* (Thomas y col., 1997), *Cf-5* (Dixon y col., 1998), *Cf-9* (Jones y col., 1994)) que confieren resistencia frente al hongo *Cladosporium fulvum* (actualmente denominado *Fulvum fulva*) en tomate. Estos genes carecen del dominio NBS, y en su lugar presentan un dominio TM, además de un dominio LRR extracelular (eLRR) y una pequeña cola citoplasmática de la que se desconoce su función (Martin y col., 2003).

La cuarta clase de genes R está formada por el gen *Xa21* de arroz, que confiere resistencia a más de 30 cepas distintas de la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Codifica para una proteína que posee un péptido señal putativo, 23 eLRRs con numerosos lugares de glicosilación potenciales, un dominio TM como los que presentan los genes *Cf*, además de un dominio PK intracelular, como el presente en *Pto* (Song y col., 1995).

La presencia del dominio LRR en 3 de las 4 clases principales de genes R sugiere que este dominio tiene un papel central en el mecanismo de defensa (Xiao y col., 2003). En el caso del gen *Pto*, la única clase de genes que carece del dominio NBS-LRR, se ha descrito que requiere de la presencia de una proteína CC-NBS-LRR, *Pfr*, para activar el mecanismo de defensa (Salmeron y col., 1996).

En los últimos años se han identificado otros genes R que no se incluyen en estas 4 clases principales, debido a la presencia de algunos motivos proteicos diferentes. Algunos ejemplos son el gen *RRS1-R* de *Arabidopsis* que confiere resistencia no específica de raza a la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Deslandes y col., 2002). Este gen presenta una estructura TIR-NBS-LRR y además, en su extremo C-terminal presenta un motivo característico WRKY de la familia de proteínas activadoras de la transcripción en plantas. Otro ejemplo es el gen *RPW8* de *Arabidopsis* que confiere resistencia de amplio espectro a todas las razas de oídio que han sido probadas y que presenta una estructura nueva: un dominio CC que está probablemente asociado a la membrana (Xiao y col., 2001). Los genes *Ve1* y *Ve2* que confieren resistencia en tomate al hongo *Verticillium albo-atrum*, presentan estructuras similares a las del tipo *Cf*, pero con dominios adicionales CC y PEST, respectivamente. Este último está relacionado con procesos de degradación de proteínas (Kawchuk y col., 2001). Recientemente, se ha descrito el gen *Rpg1* de cebada que confiere resistencia de

amplio espectro al hongo *Puccinia graminis* y que codifica para dos dominios de protein-quinasas en tandem y un dominio transmembrana putativo, siendo la primera vez que se describe un tipo de gen R como este (Brueggeman y col., 2002).

1.3.1.2. Distribución y origen de los genes R

Durante los proyectos de clonaje posicional de genes R de varias especies vegetales se observó que estos se presentaban agrupados o en “cluster” en los cromosomas. Un claro ejemplo de ello se ha observado en lechuga, que presenta al menos 11 genes de resistencia en un mismo cluster, 10 de los cuales confieren resistencia al hongo *Bremia lactucae* (genes *Dm*) y 1 estaría implicado en la resistencia a un áfido (Meyers y col., 1998). Además, dentro de cada locus se pueden encontrar distintos alelos que confieren resistencia a diferentes razas del mismo patógeno, como es el caso del lino, que presenta 31 genes de resistencia al hongo *Melampsora lini*, localizados en 5 loci designados como K, L, M, N y P que contienen respectivamente 2, 13, 7, 3 y 6 versiones alélicas (Lawrence y col., 1995). A pesar de que en los genomas vegetales se ha observado que los genes tipo NBS-LRR se encuentran normalmente distribuidos en agrupaciones, esto no parece ocurrir cuando se analiza el genoma completo de *Arabidopsis*, donde se pueden encontrar genes R en agrupaciones y también aislados en sus 5 cromosomas (Dangl y Jones, 2001).

La complejidad de las interacciones gen a gen implica que las plantas deben de tener un sistema para generar y mantener la diversidad en el repertorio de genes de resistencia. Las agrupaciones de genes R y los loci multialélicos observadas en muchas interacciones ampliamente estudiadas pueden reflejar la existencia de este sistema. Estudios en la organización genética de genes R sugieren al menos dos mecanismos para la creación de nuevas especificidades. La recombinación intragénica (recombinación entre alelos) puede crear nuevas especificidades, mientras que la recombinación intergénica (recombinación desigual) entre distintos genes podría resultar en la duplicación, delección o inserción, afectado al tamaño de los clusters (Hammond-Kosack y Jones, 1997). La presencia de dos genes *Cf-2* casi idénticos y la observación de recombinación intergénica en este locus podría ser el origen de los genes de resistencia frente a *Cladosporium fulvum* en tomate (Dixon y col., 1996).

La gran diversidad de patógenos hace pensar en la necesidad de las plantas de presentar un gran repertorio de genes R. Sin embargo, en *Arabidopsis* únicamente se han identificado un centenar de loci R distribuidos en los 5 cromosomas (Dangl y Jones, 2001). Una explicación podría ser que la proteína R reconociera la presencia de más de una proteína Avr, incluso si ésta perteneciera a patógenos muy diferentes.

Esto se conoce como reconocimiento dual y se ha demostrado en algunos casos, como por ejemplo en el gen *RPM1* de *Arabidopsis* que confiere resistencia a *P. syringae*. En esta caso, la bacteria expresa los genes *AvrRpm1* y *AvrB* y ambos productos son reconocidos por el producto del gen *RPM1* (Tornero y col., 2002). Otro ejemplo es el gen *Mi* de tomate que confiere resistencia al áfido *Macrosiphum euphorbiae* y al nemátodo *Meloidogyne incognita* a la vez (Rossi y col., 1998). Otra posibilidad para explicar el bajo número de genes R en *Arabidopsis* sería que éstos reconocieran moléculas altamente conservadas de los patógenos.

1.3.1.3. Factores de avirulencia de genes R

La definición bioquímica del sistema gen a gen implica la existencia de una molécula elicitora producida por el gen del patógeno Avr y su correspondiente receptor producido por el gen R de la planta huésped. Hasta el momento, se han clonado un elevado número de genes Avr de diferentes patógenos y se han identificado una gran variedad en cuanto a secuencias. Se ha sugerido que los factores de avirulencia podrían haber evolucionado a partir de factores de virulencia que se han convertido en proteínas reconocidas por los genes R de la planta (Bonas y Lahaye, 2002). En el caso de los virus, se han identificado varios determinantes de Avr, como la proteína de la cápside del virus X de la patata (PVX) que provoca la resistencia en patata mediada por el gen *Rx1* (Bendahmane y col., 1995), una proteasa del virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) (NIa) que es el elicitor de la resistencia mediada por el gen *Ry* de patata (Mestre y col., 2000) y la helicasa del virus del mosaico del tabaco (TMV) implicada en la resistencia específica del gen *N* en tabaco (Whitham y col., 1994). Se conocen casos en los que sustituciones de algún aminoácido del producto del gen Avr provocan la pérdida de especificidad y confieren al virus la habilidad de superar la resistencia.

A pesar de que no se ha demostrado su función in vivo, se ha identificado factores de avirulencia que podrían estar implicados en la degradación de sus dianas en la célula vegetal, como por ejemplo *Avr-Pita* de *Magnaporthe grisea* (Bonas y Lahaye, 2002) y *AvrPphB* de *Pseudomonas* (Hammond-Kosack y Parker, 2003) que podrían codificar para proteínas tipo proteasa. En el caso de *Cladosporium fulvum* los elicitores de resistencia conferidos por los genes *Cf* de tomate serían polipéptidos codificados directamente por el propio hongo (van Kan y col., 1991).

En bacterias se han identificado hasta 40 genes *Avr*, entre ellos se encuentra el gen *avrD* de *P. syringae* pv. *glycinea* que codifica para enzimas que producen siringolidos, responsables de inducir la respuesta de hipersensibilidad en genotipos de

soja que contienen el gen de resistencia *Rpg4* (Keen, 1990). Otro ejemplo sería el gen *avrBs2* de *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* cuyo producto confiere resistencia en genotipos de pimiento que presentan el gen *Bs2* (Martin y col., 2003) y que codifica para los enzimas glicerol sintasa y agrocinopina sintasa, de los cuales no se conoce su sustrato. Cabe destacar que las bacterias necesitan los genes *hrp* (“hypersensitive response induction and pathogenesis”) para poder introducir los productos *Avr* desde los espacios intercelulares al interior de la célula. Los genes *Hrp* codifican un complejo de proteínas con gran homología con el sistema tipo III de secreción que usan las bacterias para infectar en células de mamíferos (Dangl, 1995).

1.3.2. Resistencias recesivas

Las resistencias recesivas no se pueden explicar mediante el modelo gen a gen designado en los genes R. Una de las hipótesis más aceptadas para explicar las resistencias recesivas es que éstas son debidas a la falta o a la mutación de un factor de la planta que es necesario para que el patógeno complete su ciclo vital. Aunque otras hipótesis postulan que las resistencias recesivas se deben a una mutación en reguladores negativos de la reacción de defensa.

1.3.2.1. Resistencia frente a virus

Las resistencias recesivas parecen ser más frecuentes frente a virus de plantas que frente a otro tipo de patógenos, en los que predomina los genes dominantes R (Fraser, 1990). Además, este tipo de resistencia es más frecuente frente a potyvirus que frente a otros tipos de virus (Díaz-Pendón y col., 2004b). Esto quizás sea debido a la importancia relativa de los virus de esta familia, ya que probablemente sea el grupo de virus más numeroso e importante, comprendiendo casi el 40% de virus que infectan a plantas (Hollings y Brunt, 1981).

Los virus son parásitos obligados que dependen de factores del huésped para mantener sus etapas de multiplicación y propagación, por ello necesitan la maquinaria bioquímica de la planta para completar su ciclo biológico. La identificación de algunos de estos factores se ha llevado a cabo mediante la caracterización de mutantes en *Arabidopsis* o *Saccharomyces cerevisiae*, o mediante la manipulación de la expresión de los genes en cuestión. Datos recientes han mostrado que los factores del huésped juegan un importante papel en el ensamblaje del complejo de replicación del ARN, seleccionando y reclutando las cadenas del ARN molde o activando el complejo para la síntesis del ARN, entre otros pasos. Cada una de estas interacciones virus-huésped pueden contribuir a la especificidad del huésped, a la especificidad del tejido o a la

patología de la infección. Además, cada una de estas interacciones representa una diana potencial para el control de los virus (Ahlquist y col., 2003).

En levadura se han identificado varios genes del huésped necesarios para la traducción y la replicación del ARN del virus del mosaico del bromo (*Brome mosaic virus*, BMV) (Ahlquist y col., 2003). Uno de ellos es el gen *ded1* que codifica para una helicasa de ARN necesaria para el inicio de la traducción de los ARNm de *S. cerevisiae*. Ciertas mutaciones en este gen bloquean la replicación del virus, pero no afectan al crecimiento de la levadura a pesar de ser un gen imprescindible para ésta (Noueiry y col., 2000). Otro ejemplo es el gen *lsm1*, que codifica para una proteína con un motivo conservado Sm implicado con el “turnover” de los ARNm celulares y además, es necesario para un eficiente reclutamiento del ARN 1a vírico. Estos mutantes presentan una importante reducción en la traducción de los ARN genómicos virales (Diez y col., 2000). Otros dos mutantes, *ydj1* y *ole*, están relacionados con la síntesis del ARN viral. Mutaciones en el gen *ydj1* de levadura son las responsables de que no se inicie la síntesis de la cadena negativa del ARN del BMV. Este gen codifica para una chaperona implicada en la formación de los complejos de replicación de BMV, y posiblemente, esta chaperona puede actuar directamente plegando la polimerasa 2a del virus o en un paso de interacción necesario para la síntesis del ARN (Tomita y col., 2003). Los mutantes en el gen *ole1* también presentan bloqueada la replicación del ARN del BMV en los primeros pasos de la infección debido a una reducción en los niveles de ácidos grasos insaturados en las membranas. Este gen codifica para un enzima clave en la conversión de ácidos grasos saturados en insaturados (Lee y col., 2001).

En *Arabidopsis* también se han identificado varios mutantes implicados en la multiplicación viral. Los genes *tom1* y *tom2A* son necesarios para que el virus del mosaico de tabaco (TMV) se multiplique de forma eficiente en protoplastos. En el caso de *tom1* está afectada la amplificación de virus y en *tom2A* está afectada la acumulación del mismo. Ambos codifican para proteínas integrales de membrana del huésped que interaccionarían entre ellas y, a su vez, también interaccionarían con factores de replicación de TMV (Tsujiyamoto y col., 2003). El gen *lsp1* de *Arabidopsis* codifica para el factor de iniciación de la traducción (iso) 4E (eIF(iso)4E), proteína con actividad de unión a la estructura cap de los ARNm, y que es necesaria para la replicación en protoplastos de *Arabidopsis* del virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) y del virus del estriado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) (Lellis y col., 2002). Otros dos mutantes en genes que también codifican para factores de traducción son *cum1* y *cum2* de *Arabidopsis*, concretamente codifican para los

factores de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) y 4G (eIF4G), respectivamente. Las mutaciones *cum1* y *cum2* presentan inhibida la acumulación de la proteína 3a del virus del mosaico del pepino (CMV) en protoplastos, necesaria para el movimiento célula a célula y por tanto, presentan una inhibición de la propagación de CMV (Yoshii y col., 2004).

Respecto a las resistencias recesivas naturales descritas hasta ahora, la mayoría se han encontrado en especies cultivadas. Hasta el momento se han caracterizado los genes de resistencia recesivos *pvr2* en pimiento que confiere resistencia frente al virus Y de la patata (PVY) (Ruffel y col., 2002), el gen *mo1* en lechuga frente a virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*, LMV) (Nicaise y col., 2003) y el gen *sbm1* de guisante frente al virus del mosaico de la semilla del guisante (*Pea seed-borne mosaic virus*, PsBMV) (Gao y col., 2004) y todos codifican para el mismo gen del huésped: el factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E). En todos estos casos, la resistencia se debe a mutaciones del gen, que muy probablemente no afecten a la función de la proteína en la planta, pero que impiden el reconocimiento de la proteína vírica VPg (proteína que está unida de forma covalente al extremo 5' del RNA de los potyvirus) con el mismo, impidiendo la traducción del virus y por tanto, evitando la infección viral (Leonard y col., 2000).

Poca información se posee respecto a los factores de avirulencia de virus que interaccionan con el gen de resistencia. La mayoría de datos surgen de la familia de los potyvirus, donde se ha caracterizado las proteínas VPg (Schaad y Carrington, 1996; Kuhne y col., 2003; Sato y col., 2003) y P3-6k1 del genoma de potyvirus (Johansen y col., 2001) como determinantes de avirulencia. Hasta el momento, sólo se ha identificado un determinante de avirulencia para un virus que no pertenece a los potyvirus, el virus del cribado del melón (MNSV) y que probablemente sea la secuencia no traducida del extremo 3' UTR (Díaz y col., 2004).

1.3.2.2. Resistencia recesiva frente a bacterias y hongos

Se conocen algunos ejemplos de resistencias recesivas en las interacciones planta-bacteria y planta-hongo. En arroz se han identificado fenotípicamente más de 20 genes que confieren resistencia a la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*), de los cuales sólo 6 son genes recesivos, *xa5*, *xa8*, *xa9*, *xa13*, *xa19*, y *xa20* (Kinoshita, 1995). Recientemente se ha clonado el gen *xa5* y codifica para la subunidad gamma del factor de traducción IIA (TFIIA_{gamma}). Parece ser que la resistencia se debe a un cambio de dos nucleótidos que resulta en el cambio de un aminoácido, siendo la primera vez que se describe este factor en un papel de resistencia (Iyer y McCouch,

2004). En este caso, la resistencia recesiva de *xa5* frente a *Xoo* podría explicarse de la misma manera que ocurre en la resistencia recesiva frente a virus: una mutación en un factor del huésped impide que la bacteria pueda multiplicarse.

Una de las primeras interacciones planta-hongo caracterizadas fue la que tiene lugar entre el oidio *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* y la cebada. La resistencia de amplio espectro frente a este hongo en cebada es debida al gen de resistencia recesivo *mlo*. Este gen codifica para una proteína que presenta dominios transmembrana similares a los que presentan los receptores ligados a proteínas G de metazoos (Buschges y col., 1997) y parece tener una función de regulador negativo del proceso de resistencia, regula negativamente la inducción de la muerte celular (Piffanelli y col., 2002). Los mutantes *mlo* confieren resistencia a oidio gracias a una amplificación de la respuesta de la muerte celular y a la deposición de una barrera de callosa en el lugar de la infección (Wolter y col., 1993). Otro ejemplo parecido al anterior es el gen *edr1* de *Arabidopsis* que confiere resistencia de amplio espectro al oidio *Erysiphe cichoracearum* y cuyos mutantes presentan una inducción de varias respuestas de defensa, entre ellas la muerte celular. El gen *edr1* codifica para una quinasa MAPKK y parece ser que podría ser un regulador negativo de la respuesta de defensa dependiente del ácido salicílico (Frye y col., 2001). Se ha identificado otro gen de *Arabidopsis*, *pmr6*, que también confiere resistencia al oidio *E. cichoracearum*, pero sin embargo, se diferencia de los descritos anteriormente en hongos en que no se trata de un regulador negativo de una respuesta de defensa. En este caso, *pmr6* codifica para un enzima que degrada la pectina y la mutación de este gen implica un aumento de la pectina en las células epidérmicas, que probablemente impida la penetración del hongo en el interior de la planta. Este gen es necesario durante la infección del hongo y se ha llegado a denominar “factor de susceptibilidad”, ya que es necesario para la colonización del hongo (Vogel y col., 2002).

1.4. Respuestas de defensa inducidas e inespecíficas

Las interacciones planta-patógeno inducen algunas respuestas de defensa en la planta, independientemente de que la reacción sea o no compatible. Una de las respuestas inducidas de defensa más rápidas tras el reconocimiento específico del producto del gen Avr por el producto del gen R es la respuesta de hipersensibilidad (HR), uno de los mecanismos de resistencia activa frente al ataque de todo tipo de patógenos. Esta respuesta se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en los lugares donde ha tenido lugar el contacto con el patógeno y provoca la muerte celular alrededor del lugar de la infección, confinando así los patógenos en una pequeña zona

de la planta y permitiendo que la planta resista al patógeno (Dangl y col., 1996). Sin embargo, también se han descrito casos de interacción incompatible en las que no se observa la HR, como por ejemplo, la resistencia de la cebada contra todas las razas de *Erysiphe graminis* f sp *hordei*, conferida por el gen de resistencia *mlo*, y la interacción entre el virus X de la patata (PVX) y el gen *Rx*. La hipótesis más aceptada en el mecanismo de formación de la HR es la que postula que esta respuesta está controlada genéticamente y se trata de un tipo de muerte celular programada o apoptosis, activada tras el reconocimiento del patógeno (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000). Inicialmente, también se había sugerido que la HR ocurría debido a un cambio en el metabolismo de las células de la planta que podría producir componentes tóxicos para el huésped y el patógeno que causarían la necrosis rápidamente (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Por otro lado, la HR se asocia a menudo con el inicio de la resistencia sistémica adquirida en tejidos distales de la planta.

Otras respuestas generales de defensa incluyen la síntesis de metabolitos antimicrobianos (por ej. fitoalexinas), síntesis de enzimas dañinos para el patógeno, como quitinasas y glucanasas, y refuerzo de la pared celular. Además, otras respuestas, involucradas en la transducción de señales, son los cambios en el flujo de iones, especialmente en el Ca^{2+} , cambios en la fosforilación de proteínas, síntesis de especies reactivas de oxígeno (superperóxidos) o la producción de ácido salicílico (SA) (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Cabe remarcar, que muchas de las respuestas bioquímicas arriba indicadas, también tienen lugar en interacciones compatibles con desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo la expresión y biosíntesis de quitinasas y fitoalexinas que reducirían el crecimiento del patógeno a pesar de no bloquear el desarrollo de la enfermedad (Bent, 1996).

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es otra respuesta inducida de defensa que se activa tras el reconocimiento de un patógeno, siendo la formación de necrosis local a través de la HR u otros mecanismos, la señal de activación propiamente dicha. La activación de la SAR resulta en un incremento de resistencia de la planta frente a diferentes especies de patógenos en lugares distintos al de la infección inicial. Se trata de una respuesta de amplio espectro presente en toda la planta y tiene una duración de varias horas. La SAR conlleva la activación de un tipo de genes, los PR (pathogenesis related), algunos de los cuales codifican para glucanasas y quitinasas. Así pues, la SAR convierte una interacción planta-patógeno compatible en una interacción incompatible. El primer estudio realizado sobre la SAR se realizó en la interacción tabaco/TMV (Ross, 1961) y aparentemente parece ser un fenómeno ubicuo en plantas superiores demostrándose en soja, patata, tomate, alfalfa, judía verde,

Arabidopsis, arroz o cebada (Kessmann y col., 1994). El ácido salicílico (SA) tiene un papel clave en la activación de la SAR, que fue demostrado en plantas transgénicas de tabaco que expresaban de forma constitutiva el gen hidrolasa salicilato (*nahG*) de *Pseudomonas putida*. Estas plantas no acumulaban SA en respuesta de la infección de un patógeno y no eran capaces de desarrollar la SAR (Gaffney y col., 1993). Sin embargo, la aplicación exógena de INA (2,6 ácido diclorisonicotínico), un análogo químico del SA, inducía la SAR en las plantas *nahG*. Esto sugería que estas plantas no eran defectivas en la cascada de señalización celular, sino que no son capaces de activar la cascada debido a la ausencia del SA.

1.5. Aproximaciones de clonaje de genes de interés agronómico

El clonaje de genes de interés agronómico, como los genes relacionados con la calidad del fruto o con resistencia a enfermedades, ha sido uno de los objetivos de la mejora genética. Un conocimiento de dicho gen permitiría desarrollar marcadores genéticos a partir del mismo para su uso en la selección temprana del carácter, además de que también se podrían usar para introducirlos en otros genotipos mediante transformación génica. El clonaje de genes de los que sólo se conoce el fenotipo se ha llevado a cabo principalmente mediante dos técnicas: la mutagénesis insercional y el clonaje posicional. La primera técnica consiste en la generación de mutantes mediante la inserción de un fragmento foráneo de ADN en el gen (normalmente transposones), alterando la función del gen. El estudio de la cosegregación del fenotipo mutante con el fragmento insertado permite la localización del gen. Mediante mutagénesis insercional se han clonado con éxito un número importante de genes entre otros el gen *Cf9* que confiere resistencia a *Cladosporium fulvum* en tomate (Jones y col., 1994) y el gen *N* que confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco (TMV) (Whitham y col., 1994) y otros muchos de *Arabidopsis* (Paterson, 1996b). Sin embargo, algunos inconvenientes, como por ejemplo el hecho de que la mayoría de las mutaciones resultan en una pérdida de función, y por tanto, no podrían clonarse genes esenciales para la planta, o la necesidad de un sistema de transposones adecuado para cada especie, que no siempre está disponible (como es el caso del melón), hacen de la mutagénesis insercional una técnica con limitaciones para clonar genes.

Por otro lado, el clonaje posicional está siendo utilizado de forma generalizada para clonar genes de interés, ya que únicamente se necesita disponer de una población segregante para el carácter de interés y que el gen pueda situarse en una

posición cromosómica que presente marcadores moleculares en posiciones adyacentes.

1.5.1. Clonaje posicional

La estrategia del clonaje posicional ha sido utilizada para clonar varios genes de plantas (Martin y col., 1993; Bent y col., 1994; Dixon y col., 1996; Botella y col., 1998; Tai y col., 1999; Zhou y col., 2001; Joobeur y col., 2004) entre otros. Para llevar a cabo esta técnica se requiere la identificación de marcadores de ADN estrechamente ligados al gen de interés y de eventos de recombinación cerca de este locus. Los marcadores son rigurosamente posicionados en relación con los eventos de recombinación para generar un mapa genético de alta resolución y los marcadores flanqueantes que se encuentran más estrechamente ligados al gen se utilizan para rastrear genotecas de ADN. La identificación de clones de una genoteca de BACs (“Bacterial Artificial Chromosome”) que abarcan la región se realiza mediante el paseo cromosómico (“chromosome walking”). El solapamiento sucesivo de los clones identificados permitirá cubrir la distancia física que separa el marcador del gen de interés e identificar un BAC que contenga físicamente el gen (Pico y Ruiz, 2000). Sin embargo, el paseo cromosómico presenta algunos pasos críticos, como es el tiempo que se necesita para recorrer esta distancia o la presencia de ADN repetitivo en la región de interés que puede llevar a errores en la identificación de los fragmentos solapados. Por estas razones, el aterrizaje cromosómico (“chromosome landing”) se planteó como una estrategia más eficaz (Tanksley y col., 1995) ya que se reducía el tiempo dedicado al paseo cromosómico. Esta estrategia consiste en identificar marcadores moleculares tan cercanos al gen diana que permitieran identificar un único clon, o un número muy bajo de clones que permitieran llevar a cabo un paseo muy corto, que contuvieran a los marcadores flanqueantes y por tanto, al gen de interés. Los mapas genéticos de alta resolución son necesarios para identificar marcadores estrechamente ligados al gen y se obtienen en poblaciones de un tamaño considerable (2000-3000 individuos) segregantes para el carácter. Finalmente, una vez identificado el BAC que contiene el gen, se identificará el gen candidato y mediante transformación genética se confirmará que se ha clonado el gen diana.

Además, el progreso de algunas técnicas en genética molecular ha facilitado el uso del clonaje posicional. Por ejemplo, el uso del “Bulked Segregant Analysis” (BSA) facilita la identificación de marcadores ligados a un locus (Michelmore y col., 1991) mediante la utilización de marcadores moleculares que permiten detectar un número elevado de loci con un número limitado de cebadores, como los AFLPs (“Amplified

Fragment Length Polymorphism”) (Vos y col., 1995). Además, los mapas genéticos saturados de que se dispone actualmente en melón (Wang y col., 1997b; Oliver y col., 2001; Périn y col., 2002) son buenas herramientas para cartografiar el locus de interés.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo central de esta tesis es el clonaje del gen *nsv*, que confiere resistencia a MNSV, mediante la estrategia de clonaje posicional. Para llevarlo a cabo nos hemos marcado los siguientes objetivos parciales:

- 1- Construcción de un mapa genético de baja resolución en una población de 69 LDHs que nos permita cartografiar el gen *nsv* en el genoma de melón e identificar marcadores moleculares ligados al gen mediante la estrategia del “Bulked Segregant Analysis”.
- 2- Construcción de un mapa genético de alta resolución en la región del gen *nsv* en una población de gran tamaño que nos permita identificar eventos de recombinación entre el gen y los marcadores flanqueantes a éste.
- 3- Construcción de un mapa físico de la región del gen *nsv* utilizando una genoteca de BACs e identificación de un BAC que contenga los marcadores flanqueantes al gen de resistencia y, por tanto, el gen propiamente dicho.
- 4- Identificación del gen responsable de *nsv* tras la secuenciación del BAC que lo contenga.
- 5- Puesta a punto de un método de descubrimiento y detección de SNPs en melón, que permita cartografiar eficientemente los polimorfismos detectados en los marcadores del mapa genético.

3. Material y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Las poblaciones que han sido utilizadas en este trabajo segregan para el gen de resistencia *nsv*, y se diferencian en el número de individuos que las forman y en las líneas parentales. Cuando se inició este trabajo se disponía de una población F_2 de 93 individuos obtenida del cruce entre la accesión coreana PI 161375 (PI), resistente al MNSV (*nsv*), y la línea susceptible T111 tipo “Piel de Sapo” (PS) (cedida por Semillas Fitó). Esta población había sido generada anteriormente para la construcción del mapa genético de melón elaborado en nuestro laboratorio (Oliver y col., 2001) (**Fig. 3.1**) y nos permitió cartografiar el gen *nsv* en el grupo de ligamiento correspondiente de este mapa genético, mediante un test de resistencia de progenie F_3 .

Además, una población de 69 líneas doble haploides (LDHs) fue utilizada para saturar la región del gen *nsv* de marcadores moleculares. Esta población deriva del híbrido F_1 entre PI y PS y fue generada en nuestro laboratorio por partenogénesis inducida *in situ* mediante polinización con polen estéril irradiado y rescate *in vitro* de embriones. Las plantas haploides fueron tratadas con colchicina para obtener plantas diploides homocigotas y una posterior autofecundación produjo semillas en gran cantidad de cada línea (**Fig. 3.1**) (Gonzalo, 2003).

Para la construcción del mapa genético de alta resolución utilizamos dos poblaciones. Inicialmente, trabajamos con una población F_2 de 408 individuos, obtenida a partir de las mismas líneas parentales (PI x PS). Estos individuos nos permitieron conocer los eventos de recombinación entre los marcadores ligados al locus *nsv*. También en este caso, mediante autofecundación generamos familias F_3 a partir de esta población F_2 , para realizar el test de progenie de resistencia al MNSV. Las flores acabadas de abrir fueron autopolinizadas, dos o tres flores por individuo, y se cubrieron con pequeños sobres de papel para evitar polinizaciones cruzadas. Pasados unos cuatro días se eliminaron los sobres y los frutos que se desarrollaron maduraron en un periodo de tiempo de 45 a 60 días. A continuación, realizamos la recolección de las semillas F_3 y su almacenamiento en un lugar fresco y seco.

Posteriormente, gracias a la colaboración con el grupo de clonaje posicional del Dr. Bendahmane de la URVG-INRA de Evry (Francia), laboratorio donde realicé una estancia predoctoral, trabajamos con una población de retrocruzamiento (BC1) de 2727 individuos, entre la línea resistente PI 161375 (PI) y Vendrantais (Ved) (línea susceptible al MNSV), siendo PI el parental recurrente [(Ved x PI) x PI]. Antes de utilizar la población BC1, verificamos que los marcadores moleculares que

flanqueaban al gen *nsv* en la población F_2 también lo hacían en una población de 100 RILs (“Recombinant Inbred Lines”) obtenida a partir de PI x Ved (Périn y col., 2002).

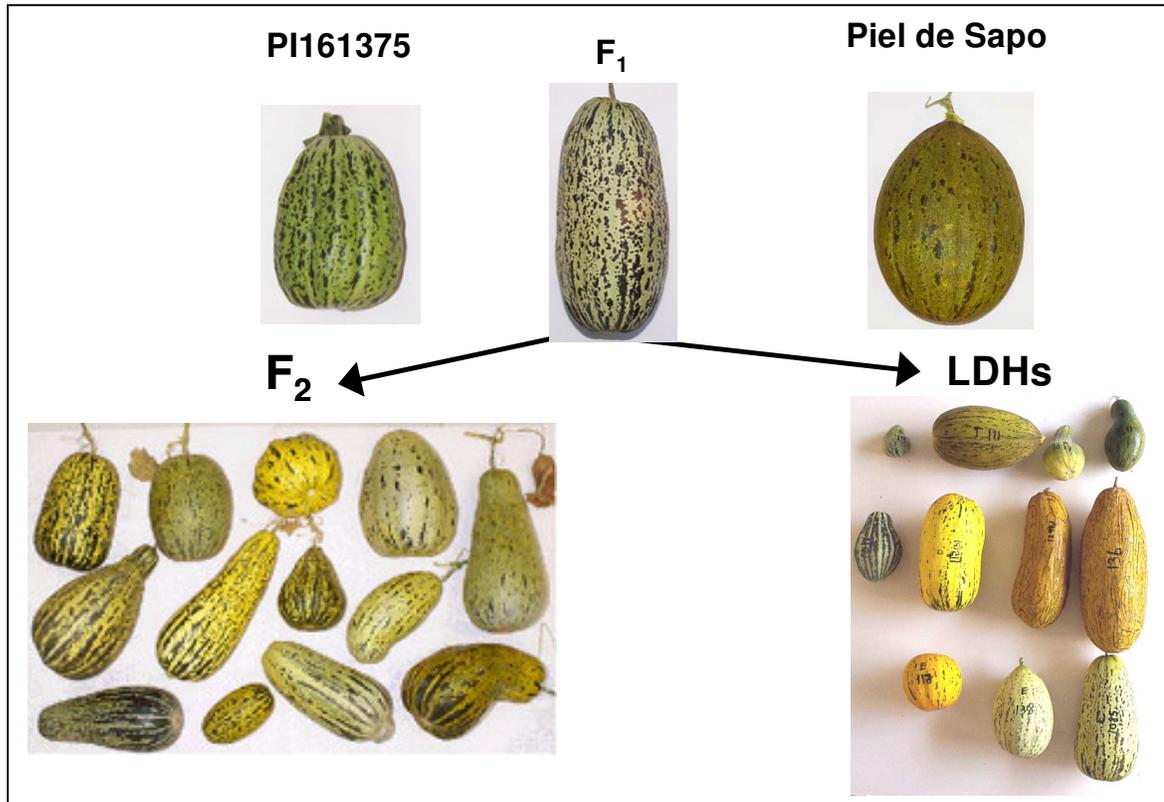


Fig 3.1: Frutos de los parentales y del híbrido F_1 del cruzamiento PI 161375 (PI) x Piel de Sapo (PS) a partir del cual se generaron las poblaciones F_2 y LDHs. Observamos gran diversidad de formas y colores entre los frutos de estas dos poblaciones (fotografía cortesía de Iban Eduardo).

3.2. Test de resistencia al MNSV

El test de resistencia al MNSV se realizó mediante inoculación mecánica, sobre cotiledones totalmente extendidos de plantas de dos semanas de edad. Se utilizó como inóculo lesiones necróticas frescas del virus obtenidas de inoculaciones anteriores, ya que son más infectivas que las que han sido liofilizadas previamente. Por este motivo, antes de emprender la evaluación de las poblaciones F_3 y LDHs, se realizó una inoculación mecánica del aislado M-8-85 de MNSV procedente de la estación experimental de la Mayora (Dr. M. Aranda), sobre cotiledones de la línea de melón susceptible PS, para conservarla como fuente del virus.

En un mortero se trituró un gramo de tejido de disco de los cotiledones que contenían lesiones frescas del virus con 4 mL de Na_2HPO_4 0.03 M pH 8.5, que contenía DIECA 0.2% y carbón activo (75 mg/mL). Este extracto se extendió sobre los cotiledones de las plantas jóvenes, a las que previamente se las había espolvoreado con carborundo, siendo posible también añadir éste último al extracto antes de la

inoculación (75 mg/mL). Transcurridos unos minutos tras la inoculación, los cotiledones se lavaron con agua para eliminar el exceso del inóculo y de carborundo.

Las plantas que mostraron lesiones necróticas en los cotiledones después de 3-5 días de la inoculación eran consideradas susceptibles al MNSV. En cambio, las resistentes no desarrollaron ningún síntoma incluso después de 10 días de la inoculación (Pitrat y Lecoq, 1984) (**Fig. 3.2**).

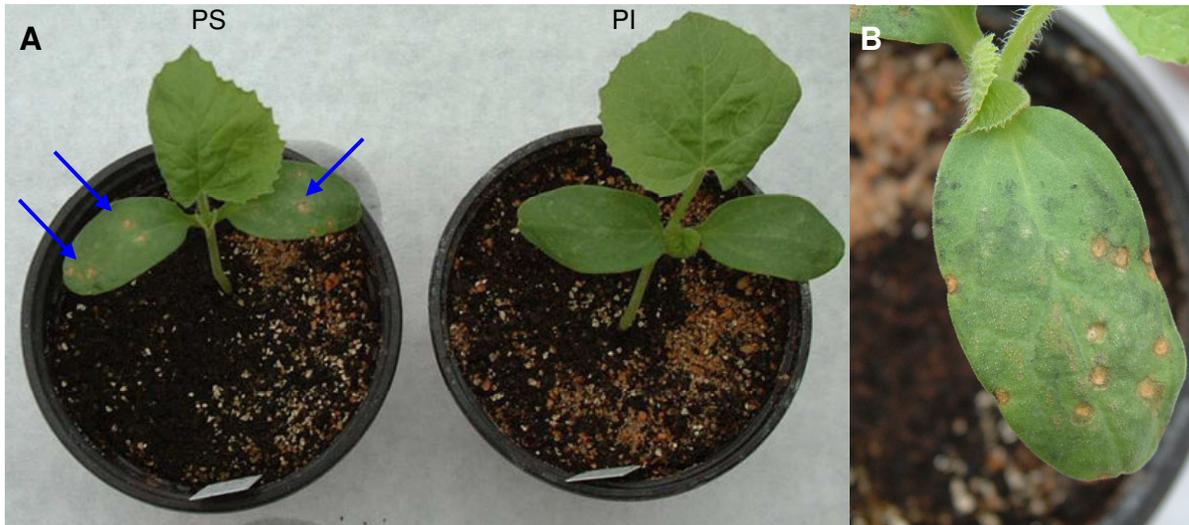


Fig. 3.2. A) Plantas de melón de dos semanas de edad inoculadas mecánicamente con el virus MNSV. El parental susceptible PS presenta lesiones necróticas en los cotiledones (flechas) al cabo de unos 5 días después de la inoculación, mientras, la línea resistente PI no presenta ningún síntoma. B) Detalle de lesiones necróticas en un cotiledón de PS.

Las poblaciones utilizadas en este trabajo fueron evaluadas para la resistencia a MNSV en distintos laboratorios, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las poblaciones de LDHs y F_2 de 93 individuos se evaluaron en el “Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón” (Dra. Marisol Luis): se inocularon 10 individuos de cada una de las líneas LDHs y 20 individuos F_3 que provenía de cada familia F_2 . La población F_2 de 408 individuos se evaluó en nuestro laboratorio y también se realizó el test de progenie con 20 individuos F_3 , pero únicamente de los individuos recombinantes entre los marcadores flanqueantes al gen. Por último, la población BC1 de 2727 individuos fue inoculada en el centro INRA Montfavet (Dra. Dogimont), donde se inocularon mecánicamente los cotiledones de cada individuo.

3.3. Clonaje en plásmido

3.3.1. Cepas

Las cepas de *E. coli* utilizadas de manera rutinaria en los experimentos de clonaje y en la propagación de los plásmidos fueron las siguientes: (1) las células DH10B electrocompetentes (Invitrogen) y (2) las células JM 109 competentes por choque térmico, que vienen adjuntas con el kit del vector de clonaje pGEM-T “Easy Vector System” (Promega), que hemos utilizado de forma rutinaria en los clonajes de productos de PCR.

3.3.2. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de *E. coli* se realizó utilizando dos métodos diferentes: la electroporación y el choque térmico, dependiendo de la cepa bacteriana utilizada.

3.3.2.1. Electroporación

La electroporación se llevó a cabo en el electroporador GIBCO BRL (Cell Porator and Voltaje Booster) en cubetas enfriadas en hielo y de acuerdo con las condiciones del fabricante (330 μ F capacitancia, 4000 Ω resistencia, 400V, baja Ω impedancia, tasa de carga rápida). Entre unos 0.5 a 3 μ l de la reacción de ligación se añadieron a 20 μ l de células electrocompetentes (DH10B). Después de la electroporación, las células se transfirieron a 0.4 mL de medio SOC (2% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa). Se incubaron a 37°C durante 1 hora con una agitación suave (80 rpm), para dejar que las células pudieran expresar el gen de resistencia al antibiótico.

3.3.2.2. Choque térmico

La transformación de las células competentes JM109 se llevó a cabo mediante choque térmico: entre 1-3 μ l de la reacción de ligación se añadió a 50 μ l de células que se incubaron en hielo durante 30 min. El choque térmico se realizó a 42°C entre 45-50 s y rápidamente se incubó 2 min más en hielo. La suspensión se transfirió a un tubo que contenía 950 μ l LB (1 % bacto-triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.5 % NaCl pH 7.0) en un incubador a 37°C durante 1 h a 200 rpm.

Las células transformadas, tanto por electroporación como por choque térmico, fueron seleccionadas en placas de LB agar (LB, 1.5 % bacto-agar) complementado

con el antibiótico correspondiente con el gen de resistencia que contiene el plásmido: ampicilina (50 µg/mL) o carbemicina (100 µg/mL). Además, también se incluyeron X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-galactosidasa) (0.12 mg/mL) e IPTG (isopropiltio-β-D-galactosidasa) (40 µg/mL) para la selección por α-complementación. Las placas se dejaron incubar durante toda la noche a 37°C. Los stocks de glicerol de los transformantes se realizaron en LB y 50 % glicerol a -70°C.

3.4. Extracción del ADN plasmídico

La extracción del ADN del plásmido se realizó a partir de un cultivo que provenía de una única colonia bacteriana crecida durante toda la noche a 37°C en agitación, en medio LB y el antibiótico correspondiente. Todas las centrifugaciones se han llevado a cabo a 4°C.

3.4.1. Minipreparación

La purificación del ADN del plásmido de pequeñas cantidades se realizó con el kit Qiagen® Miniprep (Qiagen), cuyo protocolo se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas (Birnbom y Doly, 1979) con alguna modificación, seguida de una neutralización y equilibrado en presencia de altas concentraciones de sales. Las sales causan la desnaturalización de las proteínas y del ADN cromosómico, mientras el pequeño ADN del plásmido se renaturaliza correctamente y permanece en solución. Utilizamos 3 mL de cultivo bacteriano crecido durante la noche, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y el precipitado fue resuspendido con la solución I. A continuación, se añadió la solución II (que produce la lisis celular) y se dejó un máximo de 5 min. La solución III neutralizó la lisis y mediante centrifugación a 3000 rpm precipitaron los restos celulares. El ADN del plásmido contenido en el sobrenadante quedó fijado a la membrana de la columna QIAprep mediante centrifugación y finalmente, un volumen de 50 µl de agua estéril eluyó el ADN plasmídico de las membranas.

3.4.2. Midipreparación

Las midipreparaciones se realizaron en 50 mL de cultivos crecidos durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. El precipitado bacteriano se resuspendió en 4 mL de la solución I (5 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/mL ARNasa A) y lisado con 5 mL de la solución II (SDS 1%, NaOH 0.2 M) durante 5 min. La lisis se neutralizó con 5 mL de la solución III (potasio 3M/acetato 5M pH 5.5, ácido acético 0.11 volúmenes) durante 15 min en hielo. Una centrifugación de 20 min a 4000 rpm precipitó las proteínas. El sobrenadante se filtró con papel Miracloth, se recuperó

y se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol durante 1 hora a -20°C (ó 15 min a -80°C) para precipitar el ADN y finalmente, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. El precipitado de ADN se resuspendió con 2 mL de agua estéril y se repartió este contenido en tubos eppendorf. Añadimos 2 volúmenes de etanol 95% para precipitar de nuevo el ADN, el precipitado se lavó con etanol 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Finalmente, el ADN se resuspendió en 100 μl de agua estéril.

3.4.3. Maxipreparación

Las maxipreparaciones se realizaron a partir de 1 litro de cultivo bacteriano. Las bacterias se precipitaron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 30 min. Se resuspendieron en 60 mL de solución I (sección 3.4.2) y se lisaron en 120 mL de la solución II (sección 3.4.2) durante 5 min. La lisis fue neutralizada con 90 mL de solución III (sección 3.4.2) durante 15 min en hielo. Los restos celulares fueron precipitados a 13000 rpm durante un mínimo de 30 min. El sobrenadante se filtró con papel Miracloth y los ácidos nucleicos se precipitaron con isopropanol (0.6 volúmenes) durante 1 hora a -20°C y centrifugación a 13000 rpm durante 1 hora. El precipitado se resuspendió en 5 mL de agua estéril. Los ARNs son precipitados 30 min en hielo con una solución de LiCl 2 M en concentración final. El sobrenadante se recuperó después de una centrifugación a 4000 rpm durante 30 min donde han precipitado los ARNs. Los ácidos desoxirribonucleicos fueron precipitados con 2 volúmenes de etanol 95% durante 15 min a -80°C y centrifugación a 4000 rpm durante 30 min. El precipitado se lavó con 3.5 mL de etanol 70% y se resuspendió en 500 μl de agua estéril.

3.5. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de material vegetal de melón, eligiendo hojas tiernas jóvenes de todos los individuos con los que trabajamos. En la extracción en tubo eppendorf y en placa se escogió la primera hoja verdadera, mientras que en la extracción en tubo falcon se escogieron las hojas más jóvenes y tiernas. La concentración y la calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% a 80 V durante 1 hora. El ADN de buena calidad aparece como una banda compacta de alto peso molecular sin restos de degradación (**Fig. 3.3**).

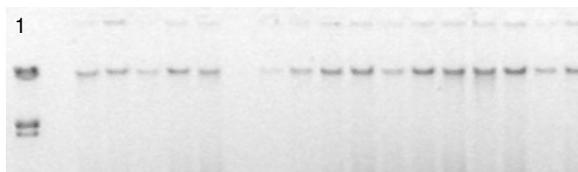


Fig. 3.3. Gel de agarosa al 0.8 % donde se observa la única banda correspondiente al ADN genómico después de la mini extracción (sección 2.5.1). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*.

3.5.1. Extracción de ADN genómico en tubo eppendorf (mini extracción)

La extracción del ADN en las poblaciones F_2 y LDHs se realizó en tubo eppendorf (Doyle y Doyle, 1990) y se realizaron algunas modificaciones sobre el protocolo para mejorar la calidad del ADN (Garcia-Mas y col., 2000).

Una hoja joven se introdujo en un tubo de 1.9 mL y se trituró en presencia de nitrógeno líquido. El material se homogenizó con 500 μ l de tampón de extracción (CTAB 2 %, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8.0, 0.2 % β -mercaptoetanol) precalentado a 65°C y se incubó durante 1 hora a esta misma temperatura. El CTAB (bromuro de hexadecil-trimetil-amonio) causa la precipitación de proteínas y polisacáridos, que fueron extraídos con 600 μ l de cloroformo-isoamílico (24:1) y una centrifugación de 10 min a 13000 rpm. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó con 350 μ l de isopropanol frío y una posterior centrifugación de 5 min a 10.000 rpm. El ADN precipitado se lavó con 500 μ l de tampón de lavado (etanol 76%, acetato amónico 10 mM) y se dejó reposar un mínimo de 20 min a -20°C. Tras una centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min el precipitado de ADN se dejó secar un mínimo de 30 min y finalmente, el ADN se resuspendió en 50 μ l de TE 10.1 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) o en agua estéril. Este tipo de extracción proporciona la cantidad de ADN necesaria para realizar de 50 a 100 amplificaciones de PCR.

3.5.2. Extracción en placa de 96 pocillos

Este método rápido de extracción permite realizar un gran número de extracciones en poco tiempo, aproximadamente 8 placas de 96 pocillos por día y persona. Por este motivo fue utilizado en la población BC1 de 2727 individuos que requería ser cribada rápidamente con los marcadores moleculares flanqueantes.

La extracción del ADN genómico se realizó en placa de 96 pocillos (Costar, Corning, NY, USA) de 2 mL cada uno que contenía 3 bolas de vidrio de 3 mm de diámetro (PolyLabo, Strasbourg, Francia). En cada pocillo se depositó una hoja joven o un trocito de 1 cm², y las muestras fueron liofilizadas siguiendo un programa de 21

horas (6 horas a -34°C , 5 horas a -17°C , 4 horas a 0°C , 3 horas a 12°C y 2 horas a 25°C con $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de velocidad de cambio entre cada paso). Las placas fueron selladas con una hoja de aluminio Easy-Abgene (Abgene, Epsom, UK) y las hojas liofilizadas fueron trituradas gracias a la agitación de las bolas durante 6 min en un agitador.

En cada muestra triturada se añadió 600 μl de tampón 1 (0.5 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 20 mM metabisulfito de sodio). Se incubaron una hora a 95°C en el baño maría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugaron durante 30 min a 4000 rpm y se recuperaron 300 μl de sobrenadante en una nueva placa de 96 pocillos de 650 μl cada uno (ABgene, Epsom, UK). El ADN se precipitó con 250 μl de isopropanol y 40 μl de acetato de amonio 10 M durante 30 min y a continuación, mediante una centrifugación a 3500 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue decantado mediante inversión de la placa y el precipitado se lavó con 400 μl de etanol 70%, se centrifugó 10 min a 4000 rpm y se dejó secar a 60°C unos 15 min o hasta que el etanol se evaporó totalmente. El precipitado se resuspendió en 100 μl TE 10.1 pH 8.0 y se trató con ARNasa A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 hora a 37°C en agitación suave.

3.5.3. Extracción de tubo de 50 mL

La extracción en tubos falcon de 50 mL se limitó a aquellas líneas que fueron identificadas como plantas recombinantes entre los marcadores flanqueantes al gen *nsv* y por lo tanto, interesaba tener mayor cantidad de ADN. Esta extracción permite obtener mayor cantidad de ADN que las realizadas en tubos eppendorf o en placa, ya que inicialmente se parte de mayor cantidad de material vegetal.

Se recogieron de 3 a 4 gramos de tejido joven en tubos de 50 mL y se mantuvo congelado a -80°C hasta su utilización. Se trituró en presencia de N_2 líquido y se añadió 7.5 mL de tampón de extracción (CTAB 2 %, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris pH 8, 0.2 % β -mercaptoetanol) por cada gramo de tejido utilizado. Los tubos se incubaron al baño maría a 65°C durante 30 min, agitándolos cada 5 min para homogenizar bien la mezcla. A continuación, se añadió entre 0.75-1 volúmenes de cloroformo-isoamílico (24:1) y mezclamos invirtiendo los tubos hasta conseguir una mezcla homogénea. Se centrifugó durante 20 min a temperatura ambiente. Si la fase acuosa era limpia se transfería a un tubo nuevo. Si en cambio, la fase era turbia se podía repetir la extracción con cloroformo-isoamílico. Añadimos 2/3 del volumen de isopropanol frío (-20°C) al tubo que contenía la fase acuosa limpia, evitando que se mezclaran las dos fases. Se dejó reposar unos minutos y a continuación, se mezclaron

suavemente invirtiendo los tubos hasta que se observó el ADN precipitado. Se puede dejar hasta un máximo de 2 horas para aumentar la cantidad de ADN precipitado. Éste fue recuperado con ayuda de una pipeta Pasteur con la punta doblada y sellada por calor, y se transfirió a un tubo de 10 mL que contenían tampón de lavado (76% etanol, acetato amónico 10 mM). Se dejó reposar un mínimo de 2 horas o durante toda la noche a 4°C. A continuación, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado invirtiendo los tubos sobre papel absorbente durante 30-45 min. El ADN se resuspendió en TE 10.1 pH 8.0 en un volumen entre 0.5-2 mL, dependiendo del volumen del precipitado.

3.6. Extracción del ARN

3.6.1. Extracción del ARN total

Aproximadamente 1 gramo de hojas frescas fueron recolectadas y congeladas en presencia de N₂ líquido. El tejido fue molido en un mortero hasta obtener un polvo fino que fue transferido a tubos falcon de 50 mL que contenían 20 mL de tampón de homogenización (0.1 M NaCl, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 10 mM EDTA pH 8.0). La mezcla fue extraída dos veces con 20 mL de fenol/cloroformo (50:50) y una vez con cloroformo. Los pasos de centrifugaciones entre extracciones se realizaron a 4000 rpm durante 10 min. Los ácidos nucleicos recuperados en la fase acuosa se precipitaron durante toda la noche con 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a -20°C. A día siguiente, los ácidos nucleicos se recuperaron con una centrifugación de 15 min a 4000 rpm. El precipitado se dejó secar en hielo, se resuspendió con agua desionizada libre de ribonucleasas en un volumen variable (entre 0.3 – 1 mL dependiendo del precipitado) durante 1 h en hielo, y fue transferido a un tubo eppendorf. El ARN se precipitó en presencia de LiCl 2 M de concentración final en hielo durante al menos 2 horas (normalmente toda la noche). Centrifugamos durante 30 min a 14.000 rpm y el precipitado fue resuspendido en el mínimo volumen posible. El ARN total fue cuantificado en el espectrofotómetro y en geles de agarosa al 1 %.

3.6.2. Purificación del ARN poliA⁺

La purificación a gran escala del ARN poliA⁺ a partir del ARN total (1-5 mg de ARN total) se realizó con el kit PolyAtract® mRNA Isolation Systems (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este sistema utiliza la tecnología de las partículas magnéticas Promega MagneSphere® que permite una purificación del mARN sin contaminaciones con otros ácidos nucleicos. El sistema utiliza un cebador

oligo(T) biotinilado para hibridar con mucha eficacia en una solución con la región 3' poli(A), presente en la mayoría de los ARNm eucarióticos maduros. Los híbridos son capturados y lavados con astringencia alta usando estreptavidina acoplada a partículas paramagnéticas, que permiten la separación magnética de los ARNm. Éste se resuspendió añadiendo simplemente 30 μ l agua desionizada libre de ribonucleasas y fue cuantificado en el espectrofotómetro.

3.7. Electroforesis del ADN

3.7.1. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR o el ADN genómico se separaron mediante electroforesis horizontal en cubetas a 5 V/cm. Los geles contenían entre 0.8 y 2.5 % de agarosa (tipo low EEO de Pronadisa) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, TBE 1x (TBE 10x: Tris-borato 0.9 M, EDTA 20 mM) o NEB 0.25x (NEB 10x: Tris 1 M, EDTA 10 mM, NaAc 0.12 M) y 0.1 μ g/mL de bromuro de etidio. Para la resolución de fragmentos de bajo peso molecular (menores de 200 bp) se utilizó geles de 3-4 % mezclando esta agarosa con la agarosa Nusieve GTG en una proporción 1:1. El tampón de electroforesis fue TBE 1x o NEB 0.25x dependiendo del tampón utilizado en la preparación del gel. Las bandas se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV.

Para la separación de ADN de alto peso molecular se utilizó la electroforesis en campo pulsante (PFGE) con el sistema CHEF-DR II (BioRad). Los fragmentos de ADN en el sistema CHEF (Contour clamped Homogeneous Electric Fields) están sometidos a campos eléctricos alternados donde el ángulo entre los dos campos es de 120°. El principio de separación está basado en la velocidad diferencial de reorientación de las moléculas en el momento de la alternancia de los dos campos eléctricos. Esta velocidad de reorientación es proporcional al tamaño de las moléculas de ADN. Las condiciones de electroforesis para visualizar fragmentos de alto peso molecular en un gel de agarosa al 1% fueron tampón TBE 0.5x, 12°C, 120° de ángulo, voltaje de 6 V/cm, 0.8 s de tiempo inicial del pulso, 25 s de tiempo final del pulso durante 14 h. El ADN fue teñido con bromuro de etidio, desteñido con agua durante 30 min y fotografiado. El tamaño de las bandas fue comparado con el marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs, Inc).

3.7.2. Geles desnaturalizantes de acrilamida

La electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de acrilamida fue utilizada en la separación de los fragmentos de los marcadores AFLP CTA/AGC-115 y ACC/ACC-110 y del marcador SSR 5A6U-SSR.

Una vez finalizada la reacción de PCR correspondiente al AFLP o SSR, se añadió en cada muestra 10 μ l del tampón de carga (95% de formamida desionizada, EDTA 10 mM pH 8.0, 0.01 % xilencianol, 0.01 % azul de bromofenol) y fueron desnaturalizadas durante 10 min a 100°C. Se cargaron 4 μ l de los productos de amplificación en el gel desnaturalizante de acrilamida. El contenido de acrilamida utilizado es variable: un 4.5 % de acrilamida en los AFLPs y un 6 % en los SSRs. Así pues, el gel contenía: la acrilamida correspondiente (19:1 acrilamida/bisacrilamida), tampón TBE 1x, urea 7.5 M, 0.05% APS (persulfato de amonio) y 0.1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenediamina). Antes de cargar las muestras, el gel polimerizado fue precalentado hasta alcanzar la temperatura de 50°C. La electroforesis tuvo lugar a una intensidad constante: para los AFLPs fue a 100 W durante 90 min y para los SSRs fue a 60 W durante 2-3h.

3.8. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR

3.8.1. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores se realizó de forma rutinaria con el programa Primer3: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.

3.8.2. Reacción de amplificación de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR ("Polymerase Chain Reaction") utilizó de forma estándar entre 10-50 ng de ADN como molde, tampón Lab 1x (MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, gelatina 0.001 %), 0.4 μ M de cada cebador, 0.4 mM de cada uno de los nucleótidos, entre 1.5 mM a 3.5 mM MgCl₂ según la optimización de la amplificación y 2 U de DNA polimerasa *Ampli Taq* (Perkin-Elmer) o *Pfu* (Stratagene). El volumen de la reacción varió entre 25-50 μ l. Los termocicladores utilizados fueron los modelos PE9600 y PE9700 (Perkin-Elmer). Las condiciones de amplificación se tuvieron que optimizar para cada muestra de ADN, los cebadores y la longitud del fragmento que se deseaba amplificar. Las condiciones estándar fueron: un ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 20 s a 94°C, 20 s X°C y Z segundos a 72°C. Una extensión final de 5 min a 72°C se incluye para permitir la total extensión de los fragmentos. La temperatura de hibridación (X°C)

depende de la temperatura del punto de fusión (T_m) de los cebadores utilizados y el tiempo de elongación (Z) depende del tamaño estimado del producto de PCR (aproximadamente 40-60 s por cada Kb de ADN). Las condiciones de amplificación específicas para cada par de cebadores utilizados en este trabajo se especifican en los apéndices A y B.

3.8.3. PCR inversa o iPCR

La PCR inversa se utilizó para clonar secuencias flanqueantes a una región de interés, y así aumentar el tamaño del fragmento original. Un ejemplo concreto fue su utilización para clonar las regiones flanqueantes del marcador AFLP CTA/ACG-115 y aumentar su tamaño original de 115 pb a un fragmento de 439 pb (sección 5.2.1.1). Al aumentar el tamaño del fragmento, la probabilidad de encontrar un polimorfismo aumenta, siendo en este caso nuestro objetivo, que nos permitirá cartografiar este marcador en la población F_2 .

Para llevar a cabo la iPCR, el ADN de melón (3 μ g) fue digerido con 20 unidades de un enzima de restricción, en un volumen final de 60 μ l, durante toda la noche a la temperatura específica para cada enzima. Los enzimas usados rutinariamente fueron *AluI*, *DraI*, *EcoRI*, *HindIII*, *MvaI*, *RsaI*, *TaqI* y *XhoI*. El ADN digerido fue extraído con fenol/cloroformo-isoamílico (25:24:1) seguido de otra extracción con cloroformo-isoamílico (24:1) y precipitado con 2 volúmenes de etanol y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M pH 4.8. El precipitado fue lavado con etanol 70 % y resuspendido en 80 μ l de agua destilada.

La mitad del ADN digerido (40 μ l) se utilizó para su autoligación con 5 U de T4 ADN ligasa y el tampón que contenía: 66 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTE y 1 mM ATP pH 7.5, en un volumen total de 400 μ l. La ligación se realizó a 12°C durante toda la noche. La ligasa se inactivó a 65°C durante 15 min. A continuación, se realizó una extracción con fenol/cloroformo-isoamílico, otra con cloroformo-isoamílico y precipitación con etanol y acetato de sodio, tal y como se describe en el párrafo anterior. El precipitado se resuspendió en 40 μ l de agua destilada y se utilizó 1 μ l (aprox. 40 ng) en reacciones de PCR de 50 μ l con cebadores específicos. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T y secuenciado en el secuenciador automático ABI PRISM 377, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias fueron analizadas con el software apropiado, se reordenaron gracias a la diana de restricción del enzima utilizado en cada caso y así se obtuvieron las secuencias que flanqueaban una región de interés.

3.8.4. PCR específica de alelo

La PCR específica de alelo es un método no radiactivo que permite estudiar la heredabilidad de alelos en una población segregante. Este tipo de PCR permite amplificar específicamente uno de los dos alelos de un determinado locus. En nuestro caso, desarrollamos marcadores específicos de alelos, denominados ns1 y ns2, que fueron desarrollados a partir de los marcadores CAPS M29 y 5A6sp6, respectivamente (sección 6.2.1). Para ello, fue necesario diseñar cebadores alelo específicos (de unos 22 nucleótidos) en una región de la secuencia del marcador que presentaba una mutación puntual entre el genotipo resistente (PI) y susceptible (Ved) de la población BC1, de manera que se amplificara específicamente uno de los dos genotipos, en nuestro caso el susceptible. La mutación fue incorporada en el extremo 3' de este cebador y su secuencia era complementaria a la secuencia de Ved. De esta manera, se obtuvieron los marcadores específicos de alelo que fueron utilizados para genotipar la población BC1. El diseño de estos cebadores y sus secuencias se detallan en el apéndice **A.5.1** y las condiciones de PCR de estos en el apéndice **A.5.2**.

3.9. Secuenciación automática del ADN

3.9.1. Reacción de PCR de secuencia

La secuenciación de los productos de PCR clonados o de los productos de PCR directamente, se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 377. La reacción de secuencia estándar que utilizamos de volumen final 10 µl contenía: 2 µl de Big Dye™ Terminator Cycle DNA Sequencing Kit 1.1 (Applied Biosystems), 3.2 pmol del cebador M13Forward (F) o M13Reverse (R) (TIB Molbiol) o del cebador específico, tampón Rxn 0.5x (40 mM Tris-HCl pH 9.0, 1 mM MgCl₂), de 20-100 ng ADN (para productos de PCR de tamaño entre 500-2000 pb) o de 200-500 ng de ADN (para productos de PCR clonados en vector). El termociclador PE 9700 (Pelkin-Elmer) fue utilizado para las reacciones de PCR de secuencia y las condiciones fueron: 25 ciclos de 96°C 10 s, 50°C 5 s y 60°C 4 min.

3.9.2. Precipitación de las reacciones de secuencia en placa

Una vez finalizada la reacción de secuencia de PCR se realizó la precipitación de la reacción en la misma placa de PCR. A los 10 µL de la reacción de secuencia se añadieron 10 µL de agua y a continuación, 2 µL de EDTA 125 mM, 2 µL de AcNa 3 M pH 4.6 y 50 µL de etanol absoluto. Se mezcló bien utilizando un vortex y se dejó reposar un mínimo 15 min. La precipitación del ADN fue seguida con una

centrifugación a 3000 rpm durante 45 min a 4°C. Seguidamente, la placa se invirtió sobre papel secante para eliminar el sobrenadante, se centrifugó a 1000 rpm unos segundos más y de nuevo la placa se invirtió para eliminar todo el volumen posible. A continuación, se lavó el precipitado con 70 µL de etanol 70% invirtiendo la placa cerrada un par de veces y se centrifugó a 3000 rpm 15 min a 4°C. Inmediatamente, la placa se invirtió sobre papel secante y se centrifugó de nuevo unos segundos para eliminar el exceso de volumen. Las muestras se guardaron a 4°C o -20°C sin luz hasta el momento de separarlas en gel. El servicio de secuenciación del que dispone el laboratorio se encarga de resuspender las muestras precipitadas con 3 µL de tampón de carga 377 (500 µL formamida, 100 µL de Loading Buffer (Applied Biosystems)), de desnaturalizarlas 2 min a 94°C y por último, de depositar un volumen de 1.5 µl de las muestras en un gel de acrilamida al 5%.

3.10. Manipulación del ARN

3.10.1. Síntesis del ADNc

La síntesis de ADNc de secuencia completa se realizó a partir de ARNpoliA+ purificado (sección 3.6.2) (Clepet y col., 2004). Los ARNs son defosforilados con fosfatasa alcalina, la estructura cap del extremo 5' (m^7G^5pppNp) es eliminada con la pirofosfatasa ácida del tabaco y en este extremo se liga un adaptador de ADN, gracias a la T4 ADN ligasa. Este enzima puede catalizar la unión de oligonucleótidos de ADN (el adaptador de ADN de estructura de doble cadena) con fragmentos de ARN y es más eficaz que la T4 ARN ligasa, utilizada habitualmente por otros autores (Sekine y Kato, 1993; Maruyama y Sugano, 1994). Este complejo ARN-adaptador, puede ser transcrito por la transcriptasa reversa y un cebador oligo(dT) y este producto fue utilizado para los experimentos de RACE-PCR (“Rapid Amplification of the cDNA Ends”) (**Fig. 3.4**).

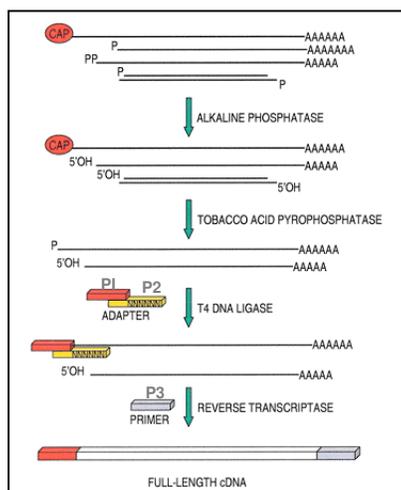


Fig. 3.4. Síntesis de ADNc (Clepet y col., 2004). El adaptador del extremo 5' está formado por una mezcla de P1 y P2. El cebador P3 es complementario a la cola poliA y fue utilizado para la reacción RT-PCR.

Así pues, dos microgramos de ARN poliA+ purificado se trataron con 2 U de fosfatasa alcalina (Roche) en 20 μ l de tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM $MgCl_2$ y 40 U de inhibidor de ribonucleasa (Rnasin, Promega) durante 1 hora a 37°C. La reacción fue calentada a 65°C durante 10 min y se añadió H_2O hasta un volumen de 100 μ l. A continuación, se realizó una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación con 300 mM de acetato de sodio, 20 μ g de glicógeno y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 20 min a -20°C. Se centrifugó a 14000 rpm 20 min y el precipitado fue lavado con 200 μ l de etanol 75%. Se dejó secar al aire durante 5 min. A continuación, el ARN fue digerido con 2 U de pirofosfatasa ácida de tabaco (Epicentre) durante 1 hora a 37°C en 20 μ l con el tampón correspondiente y 40 U de Rnasin. La reacción fue completada hasta 100 μ l de H_2O , después se realizó una extracción de fenol:cloroformo, precipitación con etanol y lavado con etanol 75 % y secado, tal como se ha descrito en el párrafo anterior.

El siguiente paso fue la ligación con el adaptador en el extremo 5' (adaptador de la región cap). Este adaptador fue preparado mezclando 40 μ M de ambos nucleótidos P1 y P2 (secuencia detallada en el apéndice **B.4**) en un tampón que contenía 10 mM NaCl y 10 mM Tris-HCl pH 7.5, calentado a 70°C en un baño de agua, y dejando enfriar a temperatura ambiente para conseguir la hibridación. El adaptador fue dispensado en pequeñas alícuotas y mantenido a -20°C.

El precipitado del ARN, al que se le ha eliminado la estructura cap 5', se resuspendió en 6.5 μ l de H_2O , fue calentado a 65°C, equilibrado a 25°C y mezclado en un volumen final de 10 μ l con 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM ditriotretitol (DTT), 1 mM ATP, 25 μ g/mL de albúmina de suero bovino (BSA), 5 % polietilenglicol 8000, 20 U de Rnasin, 4 μ M de cadena doble del adaptador cap y 1000 U T4 DNA ligasa de alta concentración (New England Biolabs). La reacción se incubó 3 horas a 25°C y a continuación se completó hasta un volumen de 100 μ l. Se hizo una extracción con fenol:cloroformo y se precipitó con 300 mM de acetato de sodio, 2 volúmenes de etanol y 20 μ g de glicógeno durante toda la noche a -20°C. El precipitado fue lavado en etanol 75% y secado al aire durante 5 min.

A continuación, se llevó a cabo la reacción de la transcriptasa reversa (RT-PCR): el ARN fue resuspendido con 8 μ l de H_2O , mezclado con 50 pmoles del cebador P3, que presenta una estructura que permite su unión a la cola de poliadenilación (apéndice **B.4**) y 10 nmoles de cada dNTPs en un volumen final de 12 μ l, y calentado a 65°C 5 min. La solución fue equilibrada a 48°C y completada con 40 U de RNasin, 10 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$ y 200 U de la transcriptasa

reversa M-MLV Superscript III (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo durante 50 min a 48°C y fue desactivada por calor a 70°C 15 min. El ADNc obtenido se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

3.10.2. Amplificación de los extremos del ADNc mediante RACE-PCR

La amplificación de los extremos del ADNc se realizó mediante RACE-PCR. La reacción de PCR se amplificó en un volumen final de 20 μ l con 0.4 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP, 1.5 U AmpliTaq Gold (Roche), tampón 1x (15 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂). Los cebadores utilizados en el extremo 3' fueron P3-PCR/GSP2rev y P3-PCR/GSP5rev. Los cebadores del extremo 5' fueron P1-PCR/GSP6for. El producto de PCR obtenido con estos dos cebadores se diluyó 50 veces y se utilizó para amplificar con los cebadores P1-PCR/GSP5for. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta reacción se detallan en el apéndice **B.4** y **B.5**. Las condiciones de PCR de estos pares de cebadores se detallan en el apéndice **B.6**.

3.10.3. Análisis por Northern

3.10.3.1. Electroforesis del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído

Antes de empezar a trabajar con el ARN, se limpiaron todos los utensilios con NaOH 0.5 M para evitar la degradación del ARN por ribonucleasas.

El ARN se mezcló con 3 volúmenes de tampón de carga (1 mL formamida, 0.35 mL de formaldehído 37%, 0.1 mL tampón MOPS/EDTA 10x (50 mM acetato de sodio, 0.2 M MOPS pH 7.0 y 10 mM EDTA) y 3.5 mg azul de bromofenol) y se incubaron durante 10 min a 70°C. Las muestras se cargaron en un gel 1% de agarosa que contenía 1.9 % formaldehído y MOPS/EDTA 1x. El gel se corrió a un voltaje de 5 V/cm en tampón MOPS/EDTA 1x.

3.10.3.2. Transferencia del ARN a un soporte sólido

A continuación, el ARN se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham) por capilaridad durante toda la noche con 20x SSC (3 M NaCl, 0.5 M citrato de sodio pH 7.0) como tampón de transferencia. Después de la transferencia, la membrana fue lavada con 2x SSC y el ARN se fijó con radiación UV usando un Stratalinker 2400 (Stratagene).

3.10.3.3. Hibridación y lavados

La prehibridación, hibridación y los lavados se realizaron en tubos de vidrio en un horno comercial de hibridación (Techne). Los filtros se prehibridaron 2 horas antes

de la hibridación, que se realizó durante la noche, con la sonda radioactiva en una solución que contenía 50 % formamida, 4x SSC, 5x Denhardts (50x Denhardts: 1% ficoll (400), 1 % PVP (360), 1 % BSA, 5% sulfato de dextrano, 0.5 % SDS) y 0.1 mg/mL ADN esperma de salmón. El marcaje de la sonda se realizó mediante la incorporación al azar (“random priming”) de nucleótidos radioactivos (αP^{32} -dCTP). La temperatura de hibridación fue de 42°C. Los filtros se lavaron dos veces en 2x SSC, 0.1% SDS a 42°C, una vez en 0.5x SSC, 0.1 % SDS a 55°C y tres en 0.2x SSC, 0.1 % SDS a 65°C, 10 min por cada lavado. Las membranas se cubrieron con un plástico y se expusieron en un film fotográfico o en una placa de “phosphoimager”.

3.11. Marcadores moleculares

En este trabajo hemos utilizado diferentes tipos de marcadores moleculares que han sido usados para buscar marcadores ligados al gen *nsv* y para saturar de marcadores esta región del genoma. A continuación, se describen estos tipos de marcadores moleculares.

3.11.1. RAPDs (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

Los marcadores RAPD se obtienen mediante amplificación por PCR del ADN genómico usando un único cebador, normalmente de 10 nucleótidos. Esta técnica permite amplificar de manera aleatoria el genoma de un individuo en aquellas zonas en las que los cebadores hibridan con el ADN molde en ambas cadenas y en direcciones opuestas. La amplificación se producirá si los cebadores están situados entre sí a una distancia corta, entre 200 y 2000 pb, el rango de tamaños amplificables por la *Taq* polimerasa.

Las reacciones RAPD se realizaron según el método descrito original (Williams y col., 1990) pero con algunas modificaciones. El volumen final de la reacción de PCR de 25 μl contenía: tampón Lab 1x (tampón Lab 10x: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.3, MgCl_2 15 mM, gelatina 0.01 %), 0.44 mM de MgCl_2 , 0.1 mM de cada uno de los nucleótidos, 20 ng de cebador decámero, 1 U de *AmpliTaq* polimerasa y 10-20 ng de ADN molde. La concentración final del MgCl_2 es de 1.94 mM. Un total de 168 cebadores RAPD que pertenecían a las series Operón A, B, C, D, E, F, J, T, U, X y Z (Operon Technologies, Inc., Alameda, California) se probaron en las mezclas de ADN del BSA (“Bulked Segregant Analysis” sección 3.12).

El programa de amplificación utilizado consistió en una etapa inicial de desnaturalización del ADN a 94°C durante 1 min, seguida de 45 ciclos de 10 s a 94°C, 10 s a 35°C de unión del cebador con el ADN y 1 min a 72°C de elongación, seguido

de una extensión final de 72°C durante 2 min, para acabar de sintetizar los productos de amplificación. Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis horizontal, en gel de agarosa al 2.5 % en tampón NEB 0.25x a 120 V durante 3 horas, y posteriormente visualizados con un transiluminador UV. El ADN de λ digerido con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* fue utilizado como marcador de peso molecular.

Aquellas combinaciones de cebadores que presentaron polimorfismos entre las dos mezclas de ADN, se repitieron 2 veces y sólo las combinaciones reproducibles se probaron en las líneas diploides individuales y en los padres para confirmar que estaban ligados al gen. La nomenclatura utilizada para los marcadores RAPD consiste en las letras OP (por Operon Technologies) seguidas por la referencia del cebador y el tamaño de la banda en kilobases (ejemplo: el marcador OPX15-1.06 se describe como el marcador de serie X, cebador 15 que amplificada una banda de 1.06 Kb).

3.11.2. AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”)

Los AFLPs se desarrollaron a mediados de la década de los noventa (Vos y col., 1995) y se basan en la combinación de dos técnicas usadas para la generación de marcadores moleculares: la digestión con enzimas de restricción y la amplificación por PCR. Los AFLPs consisten en la amplificación vía PCR de fragmentos de ADN previamente digeridos por dos enzimas de restricción y ligados a los adaptadores específicos a los enzimas utilizados. Dos cebadores complementarios a los adaptadores permitirán una amplificación consistente sin necesidad de un conocimiento previo de secuencias del genoma. Para visualizar los fragmentos de forma individualizada, se realiza la amplificación de una parte de estos fragmentos, utilizando cebadores a los que se les ha añadido en el extremo 3' una o más bases al azar (llamadas bases selectivas) que reducen a la cuarta parte el número de fragmentos amplificados por base selectiva añadida. Así, una combinación de cebadores con tres bases selectivas en cada cebador, amplificaría 1/4096 fragmentos totales. En genomas vegetales pequeños, como el del melón, se obtiene una amplificación de 30-60 fragmentos por combinación de cebadores que pueden visualizarse e interpretarse usando geles de secuenciación o secuenciadores automáticos.

Los AFLPs son marcadores dominantes y se interpretan como ausencia/presencia de banda o pico amplificado. Esta técnica proporciona un elevado número de polimorfismos reproducibles en relativamente poco tiempo y en nuestro caso fue utilizada para obtener marcadores moleculares ligados al gen *nsv*.

Inicialmente, los marcadores AFLPs se realizaron sobre las mezclas de ADN de los “bulks” de ADN, y una vez identificadas las combinaciones que presentaban polimorfismos, tras dos repeticiones, se amplificaron sobre las líneas individuales y sobre las líneas parentales para confirmar que el marcador estaba ligado al gen *nsv*. Los AFLPs fueron anotados haciendo referencia a las 3 bases selectivas de los cebadores *MseI/EcoRI* y un guión seguido del tamaño del fragmento en pares de bases, por ejemplo CTA/ACG-115. A continuación, se describen las cuatro etapas principales del proceso de obtención de los marcadores AFLP.

3.11.2.1. Digestión del ADN

El ADN genómico (500 ng) se digirió con dos enzimas de restricción: uno de corte frecuente, *MseI* (diana de restricción: T↓TAA) y otro de corte menos frecuente, *EcoRI* (diana de restricción: G↓AATTC). El volumen final de la digestión de 35 µl contenía: 8 U de *MseI*, 12 U de *EcoRI*, tampón 1x RL (Tris-acetato 10 mM pH 7.5, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 50 mM, DTT 5 mM). Se dejó incubar 3 horas a 37°C.

3.11.2.2. Ligación de adaptadores específicos

Una vez digerido el ADN, éste se liga a unos adaptadores específicos a los sitios creados por los enzimas de restricción. La estructura y la secuencia de los adaptadores habitualmente utilizados se detalla en el apéndice **A.1.1**. A los 35 µl de la digestión se les añadió 5 µl de una solución que contenía: 5 pmol del adaptador *EcoRI*, 5 pmol del adaptador *MseI*, 1.6 mM ATP, 1.4 U de T4 ADN ligasa y tampón 1x RL. Se dejó incubar 3 h más a 37°C y una vez finalizada la ligación se diluyó hasta un volumen final de 200 µl. Este producto se guardó a -20°C hasta su posterior utilización en la amplificación preselectiva.

3.11.2.3. Amplificación del ADN

Los cebadores que se utilizaron en la amplificación de los fragmentos digeridos y ligados son de secuencia complementaria a la de los dos adaptadores. La amplificación se realizó en dos etapas: primero se realizó la amplificación preselectiva seguida de la amplificación selectiva.

3.11.2.3.1 Amplificación preselectiva

En este paso se lleva a cabo la primera selección del total de los fragmentos generados tras la digestión y la ligación de los adaptadores. En nuestro caso, se

utilizaron cebadores con un nucleótido selectivo en la posición 3' (cebadores +1), citosina y adenina en el cebador complementario al adaptador *MseI* y adenina al de *EcoRI* (apéndice **A.1.2.**). El volumen final de la reacción fue de 20 μ l que contenía: 30 ng de cada cebador, 0.2 mM de cada uno de los nucleótidos, 2.5 mM $MgCl_2$ concentración final, 0.45 U de *Taq* polimerasa en tampón de Lab 1x y 5 μ l de la reacción de ligación diluida. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9700 y el programa utilizado fue el siguiente: 1 min inicial de desnaturalización a 94°C, seguido de 28 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min de hibridación a 60°C y 1 min de extensión a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C.

Para verificar que la amplificación ha sido correcta se pueden separar 3 μ l del producto de PCR en un gel de agarosa al 1 %, 0.25x NEB durante 15-30 min a 80 V. La posterior tinción con bromuro de etidio nos mostró una zona difusa de bandas de tamaño próximo a los 500 pb (**Fig. 3.5**). En función de la intensidad de la amplificación observada, el producto se diluye entre 10 y 15 veces con H_2O estéril.

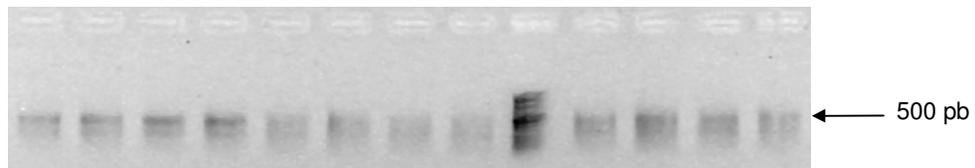


Fig. 3.5. Gel de agarosa al 1% donde se observa la amplificación de la reacción preselectiva de los AFLPs con fragmentos de unos 500 pb de promedio en 13 muestras de melón.

3.11.2.3.2. Marcaje de los cebadores

Uno de los cebadores, generalmente el *EcoRI*+3, está marcado con el fin de detectar el producto amplificado. El marcaje puede ser radiactivo o no radiactivo en función del método de detección utilizado. En nuestro caso, utilizamos el marcaje no radiactivo para la identificación inicial de los polimorfismos en los “bulks” de ADN con todas las combinaciones de cebadores y en las líneas individuales para las combinaciones polimórficas. Los cebadores *EcoRI*+3 fueron marcados con los fluorocromos: FAM (que emite en la longitud de onda del azul), JOE (verde), NEB (amarillo) (Perkin Elmer-Applied Biosystem). En cambio, el marcaje radiactivo fue únicamente utilizado para clonar la banda polimórfica de la combinación de cebadores correspondiente. El cebador fue marcado utilizando el método de marcaje terminal con T4 protein quinasa con nucleótidos radiactivos (γP^{33} -dATP) (Sambrook y col., 1989). La reacción de marcaje se mantuvo durante 45 min a 37°C, la reacción se inactivó a 90°C durante 3 min y se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.11.2.3.3. Amplificación selectiva

La segunda ronda de amplificación utiliza los mismos cebadores que para la amplificación preselectiva, pero con dos nucleótidos selectivos más en el extremo 3' (denominados cebadores +3). Un total de 184 combinaciones de cebadores AFLPs fueron utilizadas con 23 cebadores selectivos *MseI*+3 y 8 *EcoRI*+3. La secuencia de los mismos se detalla en el apéndice **A.1.2**. La amplificación se llevó a cabo con 2.5 µl del producto de la amplificación preselectiva diluida, tampón Lab 1x, 2.5 mM concentración final de MgCl₂, 0.225 U de *AmpliTaQ* polimerasa, 0.1 mM de cada nucleótido, 15 ng del cebador *MseI*+3, 2.5 ng del cebador *EcoRI*+3. El volumen final de la reacción es de 10 µl.

Las condiciones de PCR fueron 32 ciclos con: 1 ciclo inicial de 2 min a 94°C, 30 s a 65°C y 2 min a 72°C, seguido de 8 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s de hibridación a 64°C que disminuye 1°C en cada uno de los siguientes ciclos restantes hasta llegar a 57°C, y una extensión de 2 min a 72°C. A continuación, siguieron 23 ciclos de 10 s a 94°C, 30 s a 56°C y 2 min a 72°C, por último, un ciclo de 60°C durante 30 min.

3.11.2.4. Visualización de los fragmentos AFLP

3.11.2.4.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida

Los fragmentos de PCR amplificados con cebadores *EcoRI*+3 marcados radiactivamente fueron separados mediante electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de acrilamida, tal y como se describe en la sección 3.7.2. Después de la electroforesis, el gel fue transferido a un papel Whatman 3MM, secado al vacío y expuesto a un film fotográfico AGFA Curix RP2 durante 2 o 3 días. Pasado este periodo, el film fue revelado y se analizaron los patrones de bandas.

3.11.2.4.2. Electroforesis en secuenciador automático

Los productos amplificados con los cebadores *EcoRI*+3 marcados con los fluorocromos, se separaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI-Prism 310 (Pelkin Elmer-Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. En tubos de 0.5 mL mezclamos 12 µl de formamida desionizada, 0.25 µl del marcador de peso molecular (marcado con fluorocromo de color rojo: ROX) y 2.5 µl del producto amplificado. Las muestras se desnaturalizaron a 94°C durante 3 min, se colocaron inmediatamente en hielo y a continuación, se cargaron en el secuenciador.

Los fragmentos amplificados se visualizaron en forma de un gráfico de picos en lugar de bandas, correspondiendo cada pico a un fragmento de ADN amplificado. La interpretación es la misma que la de las bandas en un gel de acrilamida. Los datos se analizaron usando el programa Genescan Analysis Software 2.0.

3.11.3. RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”)

Los marcadores RFLP detectan polimorfismos producidos al digerir el ADN genómico con enzimas de restricción. La digestión con un enzima en particular producirá fragmentos de ADN de diferente tamaño, que pueden ser detectados con sondas específicas que hibriden con una parte de estos fragmentos. El polimorfismo a nivel de dianas de restricción será observado como un polimorfismo en la longitud de los fragmentos detectados. Son marcadores extraordinariamente robustos una vez que se han establecido las condiciones experimentales. El protocolo se divide en 4 fases principales: 1) Digestión del ADN genómico, 2) Electroforesis, 3) Transferencia del ADN digerido a un soporte sólido, 4) Hibridación y exposición de las muestras.

La sonda MC320 que hemos usado en el mapa genético, corresponde a un ADNc que había sido mapeado anteriormente en el mapa genético de melón elaborado por Oliver y col. (2001). Este marcador cosegregaba con el gen *nsv* en la población F₂ de 93 individuos, por este motivo se cartografió en el mapa elaborado con las LDHs.

3.11.3.1. Digestión del ADN genómico

Las digestiones del ADN genómico de los parentales y de las LDHs fueron realizadas en un volumen de 25 µl con 5 µg de ADN, 10 U del enzima de restricción *EcoRV*, tampón 1x (específico del enzima) y espermidina 40 mM. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante un mínimo de 3 h.

3.11.3.2. Electroforesis

El ADN digerido con el enzima de restricción se separó en gel de agarosa al 0,9 % en tampón NEB 1x a 30 V durante 16 h. El marcador de peso molecular utilizado fue el ADN del fago λ previamente digerido con *EcoRI* y *HindIII*. Para comprobar el resultado de la digestión, se tiñó el gel con bromuro de etidio durante 10 min, se lavó con agua destilada 15 min y se visualizó a través de la luz UV.

3.11.3.3. Transferencia a un soporte sólido

Los fragmentos de restricción separados por electroforesis fueron transferidos a un soporte sólido (membrana del tipo Hybond N+) mediante el proceso de transferencia alcalina (Memelink y col., 1994).

El gel se trató con HCl 0.25 N durante 10 min en agitación (despurinización). Este tiempo de incubación ha de ser exacto para evitar la degradación de la muestra. A continuación, el gel se sumergió en agua destilada para quitar el exceso del HCl y posteriormente, se incubó en NaOH 0.4 N un tiempo no inferior a 10 min para desnaturalizar el ADN. Todos los elementos de la transferencia se empaparon en esta solución. En este momento el gel está listo para la transferencia propiamente dicha, el "Southern Blot" (Sambrook y col., 1989). La transferencia por capilaridad tiene lugar en NaOH 0.4 N entre 6 y 12 horas. Después se desmontó la transferencia y se lavó la membrana con SSC 2x durante 5 min para quitar los restos del NaOH. La membrana se dejó secar y a continuación, el ADN se fijó a la membrana en un horno a 80°C durante 2 horas.

3.11.3.4. Hibridación y exposición de las muestras

La prehibridación de la membrana se realizó en una bandeja con 40 mL de tampón de hibridación (tampón fosfato 0.5 M, 7% SDS, 1% BSA) previamente calentado a 65°C al que se le añade 100 µl de ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado (5 g/L), durante 3 horas o más a 65°C.

La sonda fue marcada utilizando el método de marcaje al azar ("random priming") con nucleótidos radiactivos (α P³²-dCTP) (Sambrook y col., 1989). La reacción de marcaje se mantuvo durante 3 horas a 37°C. Esta reacción se paró añadiendo un volumen de NaOH 0.4 N y se dejó desnaturalizar a temperatura ambiente de 5 a 10 min.

Una vez finalizada la prehibridación, se añadió la sonda marcada (100 ng) desnaturalizada y se dejó hibridando a 65°C durante toda la noche. Los lavados de la membrana se realizaron en 2x SSC, 0.1 % SDS y 1x SSC, 0.1 % SDS a 65°C durante 20 min cada uno. La membrana se envolvió en papel de plástico (tipo Glad) y se expuso en film fotográfico AGFA Curix RP2 a -80°C, para ser revelado al cabo de 2 o 3 días.

3.11.4. SCAR ("Sequence Characterised Amplified Region")

En general, los marcadores tipo AFLP, RAPD, RFLP pueden ser convertidos en marcadores específicos de PCR (marcador tipo SCAR) de más fácil utilización,

sobretudo cuando se ha de hacer un cribado en una población de gran tamaño, como es en nuestro caso. Los marcadores SCAR (Paran y Michemore, 1993) fueron desarrollados inicialmente a partir de RAPDs, pero también se denomina SCAR la conversión en marcadores de PCR de un marcador AFLP o RFLP. En el caso de los RAPD, el fragmento de ADN procedente del marcador RAPD que presenta el polimorfismo es clonado y secuenciado. El diseño de nuevos cebadores específicos de esta secuencia permite la detección de un único locus. Para ello, una vez visualizado el fragmento de ADN en electroforesis, se procedió a recortar con un bisturí el trocito de agarosa que contenía la banda polimórfica. El ADN se eluyó de la agarosa mediante el kit QIAEX II (QIAGEN) y a continuación el fragmento de ADN fue clonado en el vector pGEM-T, siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento clonado fue secuenciado. A partir de esta secuencia, se localizó el cebador RAPD en ambos extremos y se diseñaron nuevos cebadores específicos de 20-23 bases, que contenían el cebador original en el extremo 5'. El marcador SCAR fue amplificado en una reacción de PCR en condiciones estándar en las dos líneas parentales y el producto de amplificación fue separado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 %.

El marcador SCAR suele ser dominante, como el marcador del que procede, aunque a veces el polimorfismo se puede perder por que la mayor longitud de los cebadores hace que el fragmento de ADN se amplifique a partir de los dos alelos. En este caso, es necesario encontrar un nuevo polimorfismo, siendo uno de los métodos más usados la digestión con enzimas de restricción del producto de PCR del SCAR, obteniendo así un marcador tipo CAPS, que será descrito en el apartado siguiente.

3.11.5. CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”)

Los marcadores CAPS (Konieczny y Ausubel, 1993) se caracterizan por la detección del polimorfismo mediante digestión con un enzima de restricción. Este tipo de marcador es ampliamente usado, sobretudo tras la conversión de otros tipos de marcadores en marcadores de PCR (AFLPs, RFLPs, RAPDs) que no presentan ningún polimorfismo tras la amplificación. En todos los casos, el producto de PCR fue clonado, secuenciado y las secuencias analizadas para la detección de alguna diana de restricción polimórfica entre las líneas utilizadas.

En el caso de los AFLPs, la amplificación se realizó con marcaje radiactivo (sección 3.11.2.3.2). La banda polimórfica presente en el gel de acrilamida fue recortada con un bisturí, hidratada con 50 μ l de agua estéril y reamplificada. Este producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T y secuenciado. Se diseñaron

cebadores específicos de las secuencias del AFLP, con estos se amplificaron las dos líneas parentales y el producto amplificado fue secuenciado. Las secuencias fueron analizadas para la detección de algún polimorfismo entre las líneas utilizadas digerible por algún enzima de restricción.

La digestión con el enzima de restricción se realizó normalmente en un volumen de 20 μ l que contenía: 2 μ l del tampón del enzima 10x, 2.5 U del enzima, 10 μ l producto de PCR, durante 1-2 h a la temperatura específica del enzima. El producto de la digestión fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

3.11.6. Microsatélites o SSR (“Simple Sequence Repeats”)

La amplificación del 5A6U-SSR, su separación y detección se realizó utilizando el método radiactivo y separación en geles de secuenciación (katzir y col., 1996). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 μ l que contenía: tampón de SSR 1x (Tris-HCl 75 mM pH 8.8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, Tween-20 0.01 %), MgCl_2 3.5 mM, 0.6 μ M de cada cebador (5A6U-F y 5A6U-R-SSR), 166 μ M de los nucleótidos dATP, dTTP, dGTP, 2 μ M dCTP, 0.1 μ l de α^{33} P-dCTP (3000 Ci/mmol), 2 U de *Taq* polimerasa y 60 ng de ADN molde. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de amplificación de 30 s a 94°C, 30 s de hibridación a 59°C, 30 s de elongación a 72°C, y por último, una extensión final de 5 min a 72°C.

Una vez finalizada la reacción, se añadieron 10 μ l de tampón de carga (95% formamida, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0.01 %, xilencianol 0.01 %) y las muestras fueron desnaturalizadas durante 10 min a 100°C. La separación se realizó mediante electroforesis vertical en condiciones desnaturalizantes en geles de acrilamida durante 2-3 horas, tal como se describe en la sección 3.7.2. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue transferido a un papel Whatman 3MM, secado al vacío y expuesto en un film fotográfico AGFA Curix RP2 hasta el día siguiente.

3.11.7. Detección de SNPs mediante SNaPshot

La detección de SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism”) mediante la técnica del SNaPshot (ABI Prism SNaPshot ddNTP Primer Extensión Kit, Applied Biosystems) fue utilizada básicamente en aquellos casos en los que no se encontraron enzimas de restricción capaces de diferenciar entre el polimorfismo de los dos alelos. Esta técnica fue utilizada para cartografiar los extremos de los BACs 52K20sp6 y el 1L3 (capítulos 5 y 6), y el EST CM1.11 (capítulo 8).

En primer lugar, se amplifica el producto de PCR con cada par de cebadores específicos, se verifica la cantidad y calidad del ADN en un gel de agarosa. A continuación, en 50 ng del producto amplificado se añadieron 2 μ L de Exo-SAP-IT (USB, Cleveland, Ohio) y se dejó a 37°C durante 15 min, seguido de la inactivación del enzima a 80°C durante 15 min. Este enzima es una mezcla de dos enzimas hidrolíticas (exonucleasa I y la fosfatasa alcalina de gamba) que se utilizaron para eliminar los dNTPs y los cebadores de la reacción de PCR que podría interferir en la reacción de extensión. La mitad del ADN tratado se utilizó como molde de la reacción de extensión de 10 μ L de volumen final, usando 2 pmol del cebador interno y 5 μ L de la mezcla de reacción de SNaPshot Ready mix en 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C y 30 s a 60°C. La reacción fue tratada con 1 U de fosfatasa intestinal de ternero (Roche) a 37°C durante 1 h, seguido de la inactivación del enzima durante 15 min a 75°C. El primer extendido fue visualizado en un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) con las condiciones recomendadas por el fabricante para realizar SNaPshot. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta técnica se detallan en el apéndice **A.6.2.**

3.12. Análisis de segregación en mezclas de ADN (“Bulked Segregant Analysis” o BSA)

La estrategia del BSA permite la identificación rápida y eficaz de marcadores ligados a genes de interés (Michelmore y col., 1991). El método consiste en construir dos grupos de ADN de individuos de una población segregante, un grupo que presenta el carácter a estudiar y el otro que no lo presenta (suelen tratarse caracteres de tipo monogénico). Dentro de cada grupo o “bulk” de ADN, los individuos serán idénticos para la región genómica alrededor del gen de interés, pero heterocigotos para el resto de genes del genoma. Por este motivo, los marcadores que sean polimórficos entre los dos grupos estarán, generalmente, ligados al gen responsable del carácter para el que se construyeron los “bulks”. Finalmente, se debe confirmar en la población segregante que existe ligamiento entre el marcador obtenido por esta técnica y el gen estudiado.

En nuestro trabajo, utilizamos la técnica BSA para buscar marcadores ligados al gen *nsv* utilizando marcadores AFLPs y RAPDs. El análisis de los AFLPs se realizó con la mezcla de ADN de 8 LDHs resistentes y 8 susceptibles a MNSV, mezcladas en cantidades equimolares, (50 ng de ADN de cada individuo). Para los RAPDs se utilizó el ADN mezclado de otros individuos diferentes, 10 LDHs resistentes y 10 susceptibles a MNSV, mezclados también cantidades equimolares (50 ng de ADN de cada individuo).

3.13. Genotecas de BACs

3.13.1. Organización y cribado de las genotecas de BACs

Para la construcción del mapa físico de la región del gen *nsv*, se trabajó con dos genotecas de BACs, una generada a partir de un genotipo resistente y otra a partir de uno susceptible. La genoteca elaborada por el Dr. Hans van Leeuwen (van Leeuwen y col., 2003) del laboratorio del Dr. Pere Puigdomènech del IBMB-CSIC de Barcelona, fue generada a partir de la línea LDH PIT92 resistente a MNSV. Esta genoteca consta de 23040 clones. El tamaño medio del inserto es de 141 Kb, cubre el genoma de melón (454 Mb) 6 veces (6x) y está organizada en 60 microplacas de 384 clones cada una.

El sistema de cribado para la identificación de clones positivos mediante marcadores de PCR consistió en la mezcla del ADN de clones, de manera que permitiera la identificación rápida de un único clon positivo. Así pues, el ADN de todos los clones de cada placa se aisló en grupo, obteniendo un total de 60 "pools" de ADN, cada uno correspondiente a una placa. A su vez, se mezcló el ADN de 6 placas, formando 10 "superpools" de ADN. El cribado de esta librería se realizó en el IBMB-CSIC, utilizando 1 µl de minipreparación de los "superpools" o "pools" de ADN por PCR. Una vez identificado el "superpool" positivo, se realiza una segunda ronda de PCR para identificar el "pool" positivo. La identificación del clon único se consigue con la tercera y cuarta ronda de PCR realizada con los "pools" de ADN de las columnas y filas de la placa identificada como positiva. El clon positivo se aisló de la microplaca y se dejó crecer en una placa de LB complementada con cloranfenicol (12.5 µg/mL) a 37°C durante toda la noche. El ADN del plásmido de los clones positivos fue aislado mediante minipreparaciones de los clones BAC (van Leeuwen, comunicación personal).

La segunda genoteca de BACs que utilizamos fue generada a partir de la línea WMR-29 susceptible a MNSV y pertenece al grupo de clonaje posicional del Dr. Abdelhafid Bendahmane (URGV-INRA, Evry, Francia). Esta genoteca consta de 32632 clones, está organizada en 86 placas (de 384 pocillos cada una), tiene una cobertura del genoma de 7 veces (7x) y el tamaño medio del inserto es de 100 Kb. Las mezclas de ADN para la identificación de clones positivos se realizaron sólo a nivel de placas, obteniendo 86 "pools" de ADN (Dr. A. Bendahmane, comunicación personal). La identificación de los clones positivos se realizó mediante PCR sobre 1 µl de ADN de los "pools" de las 86 placas. Una vez identificada la placa positiva, se hicieron dos

réplicas en placa de LB con cloranfenicol (12 µg/mL) a 37°C durante toda la noche. Una placa fue utilizada para identificar la columna positiva y para ello, se mezclaron los cultivos bacterianos directamente de cada columna con 500 µl de agua. Así pues, obtuvimos los 24 "pools" correspondientes a cada columna de la misma placa positiva, sobre los cuales se realizaron las PCRs utilizando 1 µl del ADN de cada "pool". Una vez identificada la columna positiva, la segunda réplica de la placa de LB se utilizó para identificar el clon individual positivo, realizando la PCR directamente sobre los 16 clones que componen la columna positiva. De esta manera rápida, se identificaron los clones positivos para los marcadores utilizados para el cribado de las dos genotecas, descritos en los resultados de los capítulos 5 y 6. Un ejemplo detallado del cribado de la genoteca WMR-29 se muestra en la **fig. 3.6**.

3.13.2. Minipreparación de ADN de BACs

Los cultivos bacterianos fueron crecidos en 1.5 mL de LB/cloranfenicol (12.5 µl/mL) durante toda la noche, a partir de un único clon BAC positivo de la genoteca WMR-29. Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min y se decantó el sobrenadante. Los precipitados bacterianos se resuspendieron en 300 µl de la solución I (Tris-HCl 5 mM, EDTA 10 mM, ARNasa 100 µg/mL) y se lisaron con 300 µl de la solución II (SDS 1 %, NaOH 0.2M) durante 5 min a temperatura ambiente. La reacción fue neutralizada al añadir 300 µl de la solución III (potasio 3M/acetato 5M pH 5.5, 0.11 volúmenes de ácido acético). La mezcla se incubó 10 min en hielo. Una centrifugación a 13.000 rpm precipitó las proteínas y permitió recuperar el sobrenadante. Una precipitación con 0.6 volúmenes de isopropanol durante 1 hora a -20°C permitió recuperar los ácidos nucleicos después de una centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min y los precipitados se secaron a 60°C durante unos minutos. El ADN fue resuspendido en 20 µl de agua estéril.

3.13.3. Secuenciación de los extremos de los BACs

La secuenciación de los extremos de los BACs la realizamos utilizando el siguiente protocolo: en un tubo de PCR añadimos 6 µL de H₂O a un volumen de 15 µL del ADN de la minipreparación del BAC. El volumen final debe ser de 21 µL. La muestra fue homogeneizada con una pipeta de 200 µL, arriba y abajo unas 10 veces utilizando una punta cortada a la que se le acopla una aguja de 0.8 mm (Terumo 0.8

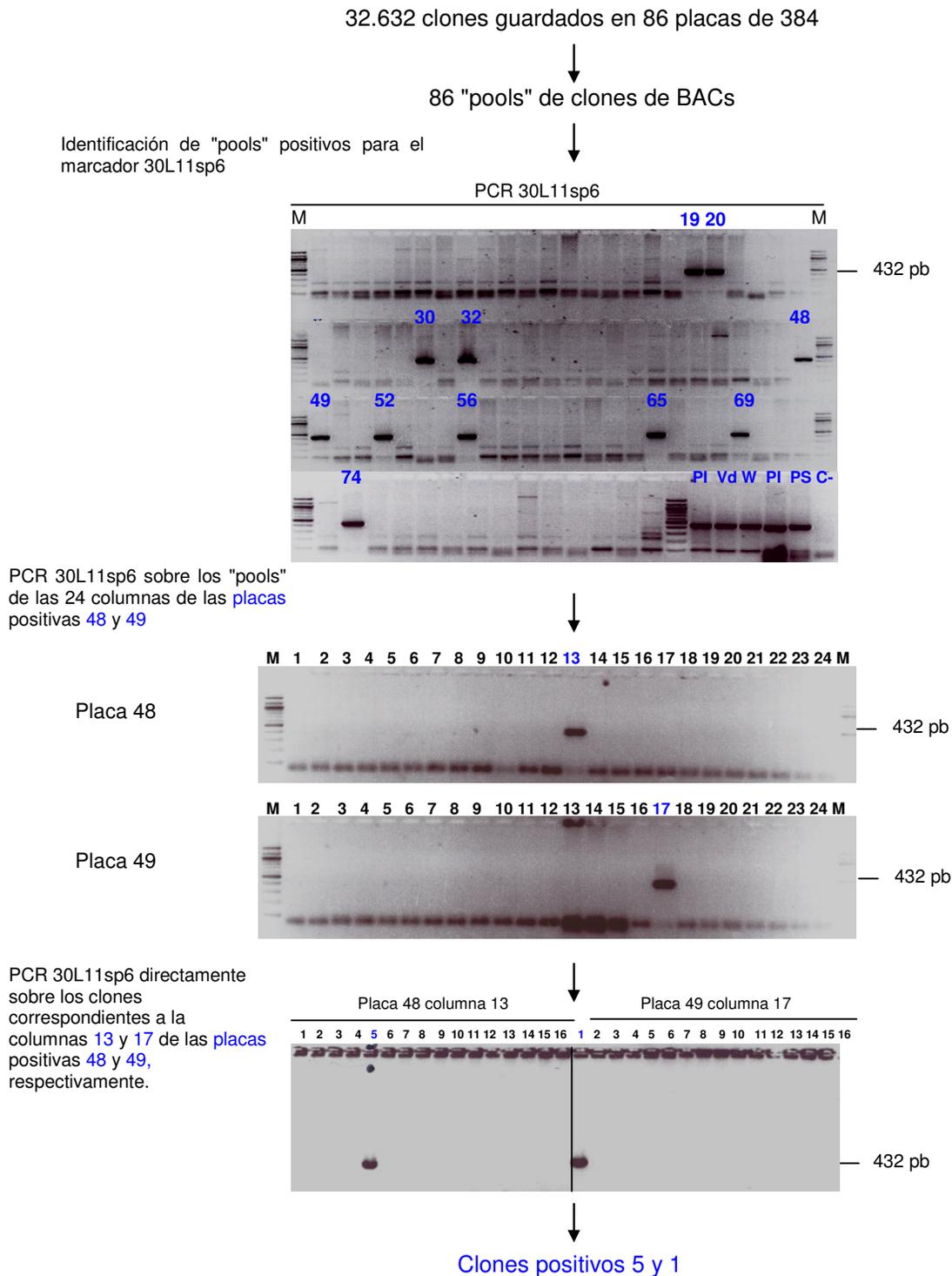


Fig 3.6. Ejemplo del sistema de cribado de la genoteca de BACs de la línea susceptible WMR-29 con el marcador 30L11sp6. La genoteca está organizada en 86 "pools" que corresponden con las 86 placas de 384 clones. Primero se identifica la placa positiva, después la columna y finalmente el clon individual positivo. En color azul se indican los "pools" positivos que presentan la amplificación de la banda de 432 pb: 19, 20, 30, 32, 48, 49, 52, 56, 65, 69 y 74. Se muestran las columnas positivas 13 y 17 de las placas 48 y 49 respectivamente. La PCR sobre los clones individuales muestra la amplificación en los clones 5 y 1. Como controles de PCR se incluyen las amplificaciones sobre las líneas PI, Ved, W y PS. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder.

Neolus 21G) la cual también fue cortada dejando una longitud de 0.5 cm. Las muestras fueron incubadas 30 min a 65°C. A continuación, se mezclaron con 8 µL de Big Dye™ Terminator Cycle DNA Sequencing Kit 1.1 (Applied Biosystems), 8 µL del tampón Rxn 0.5x (40 mM Tris-HCl pH 9.0, 1 mM MgCl₂), 3.2 pmol del cebador y 10 % DMSO (v/v) . Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 60 ciclos de 1 min 95°C, 50 s a 50°C y 4 min a 60°C. Las secuencias fueron analizadas en un secuenciador automático ABI 377.

3.13.4. Desarrollo y cartografiado de marcadores moleculares a partir de los extremos de BACs

El ADN de los clones positivos fue aislado mediante minipreparación del BAC (sección 3.13.2) y los extremos de estos BACs fueron secuenciados como se describe en la sección 3.13.3. Se diseñaron cebadores específicos en los extremos de estas secuencias (apéndice A.6.1) y se usaron para amplificar las líneas parentales, PI 161375, PS, Ved y WMR-29. Los polimorfismos fueron detectados y mapeados en los individuos recombinantes de la región del gen *nsv* usando marcadores tipo CAPS (sección 3.11.5), SSR (sección 3.11.6) o SNPs (sección 3.11.7). Los nuevos marcadores se utilizaron para cribar de nuevo las genotecas de BACs, para la identificación de nuevos clones positivos más cercanos al gen y así de esta manera, obtener un “contig” de la región hasta llegar al gen *nsv*.

3.13.5. Construcción del mapa físico

El tamaño de los insertos de los clones BACs positivos fue determinado mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). La digestión con el enzima de restricción *NotI* (New England Bio Labs) liberó el inserto y éstos fueron analizados mediante electroforesis PFGE (sección 3.7.1). El marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) fue utilizado para determinar el tamaño de los insertos.

La orientación de los clones BACs en el mapa físico se determinó mediante amplificación de PCR con los cebadores específicos de los extremos de los BACs y usando el ADN de éstos como molde. Las condiciones de PCR y las secuencias de los cebadores están descritas en el apéndice **A.6.1**.

3.14. Cartografiado genético y físico

El programa MAPMAKER v. 3.0 (Lander y col., 1987) fue utilizado para cartografiar el gen *nsv* en el mapa genético de la población F₂ de 93 individuos, con un LOD \geq 5.0.

Los marcadores moleculares desarrollados en las poblaciones de LDHs, F₂ de 408 individuos y BC1 fueron cartografiados en los mapas genéticos utilizando los eventos de recombinación respecto al gen *nsv*. Las distancias genéticas estimadas fueron calculadas de la siguiente manera: (nº recombinantes/nº gametos)x100. Hemos considerado que el % de recombinación es equivalente a la distancia en cM (centimorgans), ya que al tratarse de distancias pequeñas, no hemos tenido en cuenta las correcciones debidas a los dobles recombinantes.

Los BAC identificados con los marcadores moleculares del mapa genético formaron el mapa físico de esta región. El desarrollo de marcadores a partir de los extremos de los BACs permitió la orientación de éstos en el mapa físico. Las condiciones de PCR y las secuencias de los cebadores específicos de los extremos de los BACs están descritas en el apéndice **A.6.1**.

3.15. Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas utilizando el paquete de programas GCG (Genetics Computer Group, Madison, WI) para elaborar mapas de restricción y comparación de secuencias. Para la comparación de secuencias se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa Clustal X (Thompson y col., 1997). La ordenación de secuencias obtenidas a partir de los extremos de los ADNc se realizó con programas pregap y gap4 del paquete STADEN 99 (Staden, 1996). El programa BLASTX fue utilizado para buscar homologías con las secuencias de los extremos de los BACs y con las secuencias clonadas. El servidor INFOBIOGEN (www.infobiogen.fr/services/analyse/) presenta varios programas de comparación de secuencias, mapas de restricción y traducción a proteínas que también utilizamos.

4. Saturación con marcadores moleculares de la región flanqueante al gen *nsv* que confiere resistencia al virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en melón

4. SATURACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES DE LA REGIÓN FLANQUEANTE AL GEN *nsv* QUE CONFIERE RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV) EN MELÓN

El contenido de este capítulo ha sido publicado en la revista **Journal of the American Society for Horticultural Science**.

Morales, M., Luis-Artega ML, Dolcet-Sanjuan R, Monfort A, Arús P, Garcia-Mas J. (2002). "Marker saturation of the region flanking the gene *Nsv* conferring resistance to the melon necrotic spot *Carmovirus* (MNSV) in melon." JASHS 127(4): 540-544.

4.1. INTRODUCCIÓN

El virus de las manchas necróticas del melón ("*Melon Necrotic Spot Virus*": MNSV) es un *Carmovirus* de cadena simple de ARN que pertenece a la familia *Tombusviridae*. MNSV infecta a especies cucurbitáceas, como el melón, pepino y sandía que crecen en condiciones de invernadero, causando importantes pérdidas en la producción.

El virus fue descrito por primera vez en Japón (Kishi, 1966) y posteriormente fue detectado en invernaderos de melón en regiones occidentales (Gonzales-Garza y col., 1979). MNSV se transmite mecánicamente, a través de zoosporas del hongo *Olipidium bornovanus*, por mordeduras de insectos o a través de semillas infectadas (Lecoq y col., 1998). Los síntomas producidos por el virus en melón incluyen: lesiones necróticas locales en los cotiledones inoculados o grandes lesiones necróticas en hojas sistémicas o necrosis en tallos y peciolo. La severidad de los síntomas depende de las condiciones de crecimiento y de la variedad. Por ejemplo, aislados europeos de MNSV inducen lesiones sistémicas en melón y pepino de manera variable. Los cotiledones infectados mecánicamente muestran manchas necróticas de 2 o 3 mm de diámetro después de 3-5 días de la inoculación y mueren entre los 15-21 días después de la inoculación.

La propagación del MNSV en el melón cultivado puede ser controlada con el uso de semillas libres de virus o de variedades resistentes. Existen, al menos, dos fuentes de resistencia al MNSV en melón: el cultivar "Gulfstream" y la accesión coreana PI 161375. La resistencia está controlada por el alelo recesivo del gen *nsv* (Coudriet y col., 1981), y es efectiva contra todas las cepas del virus conocidas,

excepto una cepa que ha sido descrita recientemente (Díaz y col., 2000). En el mercado existen variedades comerciales que presentan el alelo de resistencia *nsv* en homocigosis. El gen *nsv* fue cartografiado en el grupo de ligamiento 7 del primer mapa genético del melón (Baudracco-Arnas y Pitrat, 1996) con marcadores flanqueantes a 13.5 y 10.7 cM de distancia.

A pesar de que el test patológico usado en los programas de selección para detectar el MNSV (basado en la inoculación del MNSV) es barato y fácil de utilizar, la disponibilidad de marcadores moleculares estrechamente ligados al alelo *nsv* podría acelerar su selección, como se ha demostrado para otros caracteres (Tanksley y col., 1989). En melón, se han desarrollado marcadores moleculares ligados al gen de resistencia *Fom-2*, que confiere resistencia a las razas 0 y 1 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Zheng y col., 1999; Wang y col., 2000). Otros importantes genes de resistencia como *Fom-1* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razas 0 y 2, *Pm-1* contra mildiu provocado por *Sphaeroteca fuliginea* raza 1, y *nsv* no están asociados con ningún marcador molecular.

En este artículo describimos el desarrollo de marcadores moleculares ligados al gen *nsv*. La localización cromosómica de este gen fue determinada en primer lugar en una población F_2 . A continuación, se desarrollaron marcadores moleculares adicionales estrechamente ligados al gen usando AFLPs y RAPDs y la estrategia del BSA ("Bulked segregant analysis") (Michelmore y col., 1991) en una población de LDHs. Con todos estos marcadores se construyó un mapa genético detallado de la región flanqueante al gen *nsv* con 10 marcadores en un intervalo de 17.7 cM.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Cartografiado del locus *nsv* en el mapa genético de melón

Los datos de la segregación de la resistencia al MNSV basados en el test de progenie de las familias F_3 , permitió la identificación del genotipo correspondiente de los individuos de la F_2 , y el cartografiado de este carácter como un marcador codominante. De las 91 familias F_3 analizadas, 22 fueron resistentes (*nsv/nsv*) (ausencia de síntomas en todos los individuos de la familia), 49 dieron una reacción heterogénea de individuos resistentes y susceptibles en una proporción esperada 3:1 (3 *Nsv/-*, 1 *nsv/nsv*) y 20 fueron susceptibles (*Nsv/Nsv*). Estos resultados se ajustan con la segregación esperada 1:2:1 en la población F_2 para un gen simple recesivo, siendo el valor de la $\chi^2 = 0.62$ n.s.

Estos datos se utilizaron para localizar el gen *nsv* en el grupo de ligamiento 11 (G11) en el mapa genético elaborado en nuestro laboratorio (Oliver y col., 2001), en la proximidad del carácter morfológico *P* (número de carpelos: trímero vs pentámero). Además, dos marcadores del G11 cosegregan con el gen *nsv*, MC320 y OPX15-1.06 (**Fig. 4.3**). El marcador RADP dominante OPX15-1.06 fue amplificado a partir de la línea resistente PI. Dos marcadores AFLP, CAT/AAC-296 y CCT/AAC-183, que cosegregaban con el carácter *P*, se localizaron a 9.2 cM del gen y fueron usados para orientar el mapa genético del locus *nsv*.

El test de resistencia al MNSV llevado a cabo en la población de las 69 LDHs, dio como resultado 32 individuos resistentes y 37 susceptibles, la segregación esperada 1:1 para este tipo de población ($\chi^2=0.36$ n.s) confirmando la posición en el mismo grupo de ligamiento (G11).

4.2.2. Marcadores moleculares ligados al gen *nsv* y BSA

Una vez realizadas y analizadas el total de las 184 combinaciones de cebadores AFLPs, identificamos 10 que presentaban polimorfismos entre los "pools" de ADN resistente y susceptible. Las combinaciones polimórficas fueron probadas 2 veces en estos "pools" de ADN, además también en las 16 líneas individuales que formaban los "pools" y en las líneas parentales. Cinco de las 10 combinaciones polimórficas iniciales, CTA/ACG-115, CTA/ACG-120, CGA/ACA-74, ACC/AAC-144, ACC/ACC-110, fueron seleccionadas como marcadores para ser cartografiados en el mapa genético de la región del gen *nsv*, por que fueron los que presentaban las bandas polimórficas más claras e intensas. Los marcadores CTA/ACG-115 y ACC/ACC-110 mostraron una banda tanto en el "pool" de ADN susceptible como en el parental PS (**Fig. 4.1**), mientras que CTA/ACG-120, CGA/ACA-74 y ACC/AAC-144 la presentaban en el grupo de ADN de individuos resistentes y en PI 161375.

La combinación de los cebadores CTA/ACG mostró dos fragmentos de ADN polimórficos de 115 y 120 pb de tamaño (CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120) (**Fig. 4.1**). Cuando fueron probadas las 16 líneas individuales de los "pools", CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120 estaban presentes sólo en los individuos susceptibles o resistentes, respectivamente.

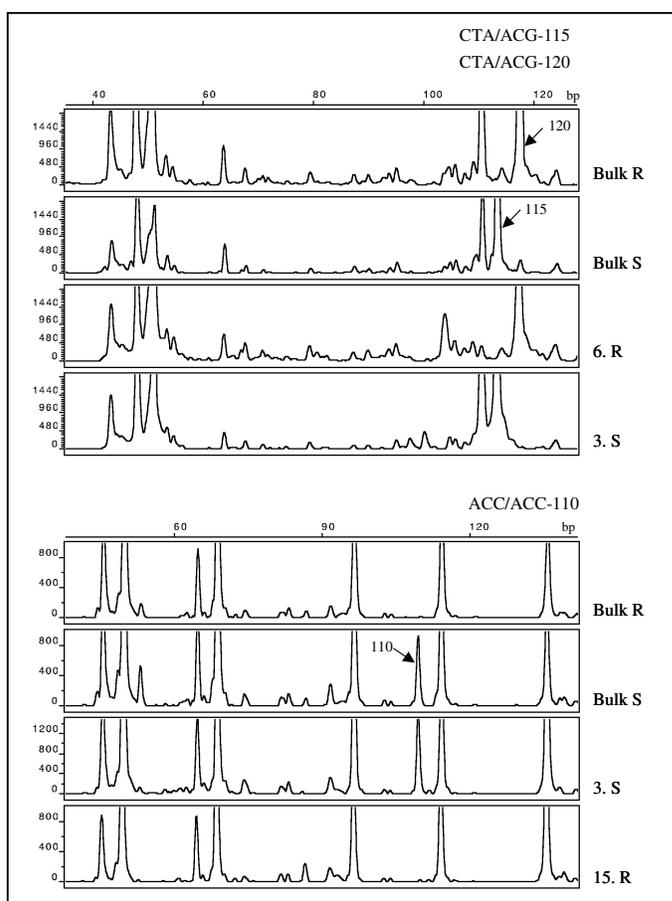


Fig. 4.1. Electroferograma de AFLPs obtenido con el software Genescan (ABI Prism 310). Se representa una fracción del patrón de AFLPs que incluye los marcadores CTA/ACG-115, CTA/ACG-120 y ACC/ACC-110 que fueron probados en las mezclas de ADN ("pools") resistente (R) y susceptible (S) a MNSV y en líneas LDHs individuales. Los fragmentos polimórficos se indican con una flecha y el número es el tamaño de la banda polimórfica (en pares de bases).

Tras probar un total 168 cebadores RAPD, se identificaron inicialmente 13 fragmentos polimórficos, pero después de dos repeticiones con el ADN de las líneas parentales y las 20 LDHs individuales que formaban los "pools", sólo el RADP OPD08-0.80 fue reproducible. El tamaño de la banda amplificada para este marcador era de 800 pb y estaba ligada a susceptibilidad, o sea, la banda estaba presente en el parental PS, en el "pool" susceptible y en las líneas individuales susceptibles a MNSV (**Fig. 4.2**). Los individuos resistentes no mostraban esta banda, en su lugar se presentaban un débil fragmento de 850 pb.

Marcador	Cebadores	Secuencia
OPD08-0.80	OPD08	GTGTGCCCCA
OPX15-1.06	OPX15	CAGACAAGCC
CTA/ACG-115	<i>EcoRI</i> - <i>MseI</i> -	GACTGCGTACCAATTC ACG GATGAGTCCTGAGTAA CTA
CTA/ACG-120	<i>EcoRI</i> - <i>MseI</i> -	GACTGCGTACCAATTC ACG GATGAGTCCTGAGTAA CTA
ACC/ACC-110	<i>EcoRI</i> - <i>MseI</i> -	GACTGCGTACCAATTC ACC GATGAGTCCTGAGTAA ACC
CGA/ACA-74	<i>EcoRI</i> - <i>MseI</i> -	GACTGCGTACCAATTC ACA GATGAGTCCTGAGTAA CGA
ACC/AAC-144	<i>EcoRI</i> - <i>MseI</i> -	GACTGCGTACCAATTC AAC GATGAGTCCTGAGTAA ACC
CAT/AAC-296	<i>EcoRI</i> - <i>MseI</i> -	GACTGCGTACCAATTC AAC GATGAGTCCTGAGTAA CAT
CCT/AAC-183	<i>EcoRI</i> - <i>MseI</i> -	GACTGCGTACCAATTC AAC GATGAGTCCTGAGTAA CCT

Tabla 4.1. Secuencias de los cebadores RADPs y AFLPs usados para los marcadores que están ligados al gen *nsv*. Los nucleótidos selectivos para los cebadores de los AFLPs están marcados en negrita.

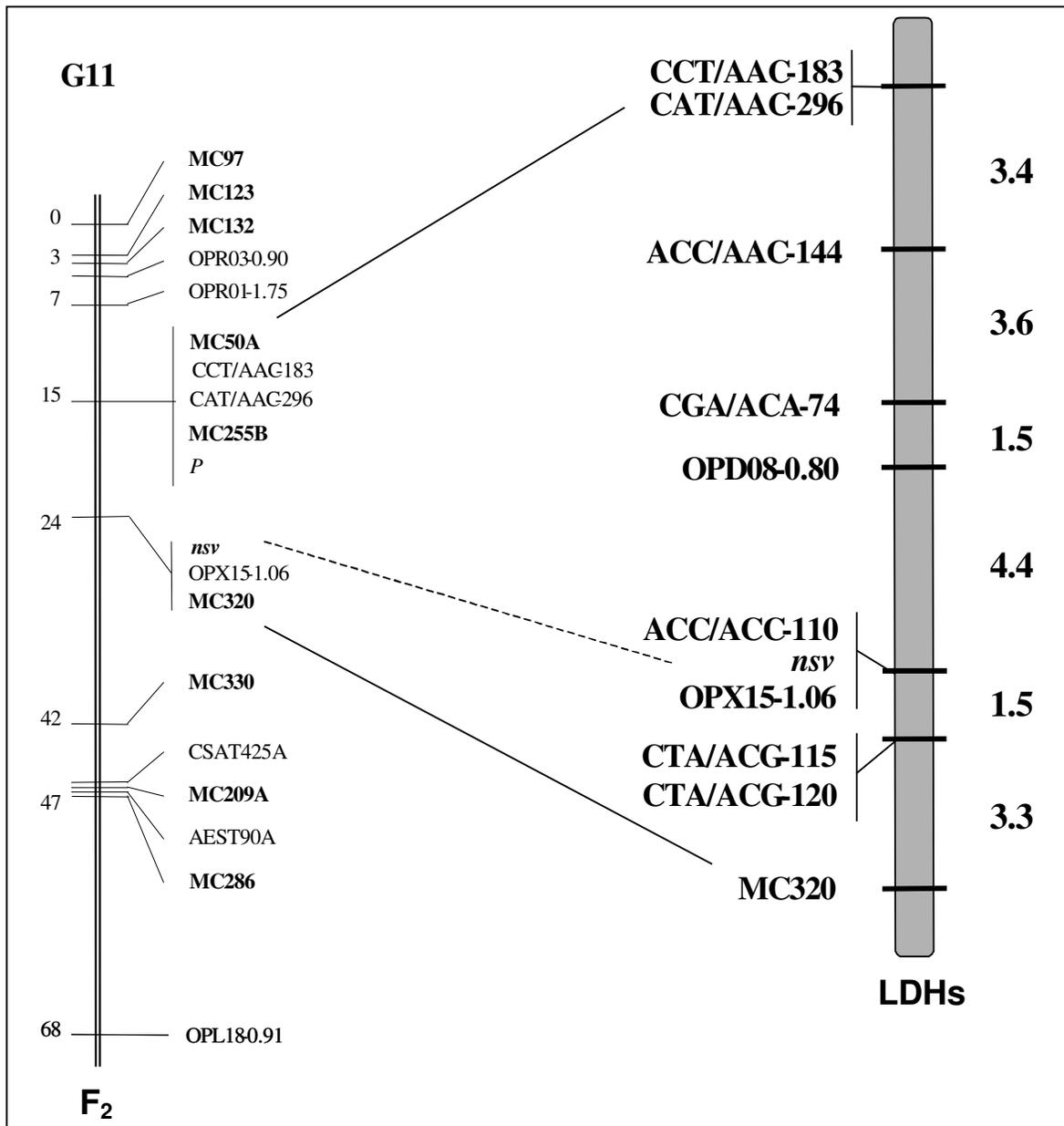


Fig. 4.3. A la izquierda, el grupo de ligamiento 11 (G11) muestra el gen *nsv* que se localiza en la misma posición que los marcadores OPX15-1.06 y MC320. A la derecha, un mapa detallado de la región del gen *nsv* obtenida con la población de LDHs. Los marcadores flanqueantes de esta región están alineados con sus posiciones en el G11. Los marcadores marcados en negrita en el mapa de la izquierda son marcadores RFLP. Las distancias genéticas están expresadas en centimorgans (cM).

4.3. DISCUSIÓN

El gen *nsv* ha sido cartografiado en el grupo de ligamiento G11 del mapa construido a partir de la población F₂ (Oliver y col., 2001), cosegregando con el RAPD OPX15-1.06 y con el RFLP MC320. El RAPD OPX15-1.06 es un marcador dominante y por tanto, su posición en el mapa es de menor precisión si se compara con los marcadores codominantes, como MC320. Esta región está flanqueada a un lado por

un grupo de marcadores a una distancia de 9.2 cM e incluye dos marcadores RFLPs codominantes (MC50A y MC255B), dos marcadores AFLPs dominantes (CTA/AAC-296 y CCT/AAC-183) y el gen *P* (número de carpelos). Al otro lado, se encuentra el marcador RFLP codominante MC330, a una distancia de 18 cM (**Fig. 4.3**).

Baudracco-Arnas y Pitrat (1996) localizaron el gen *nsv* en el grupo de ligamiento 7 de su mapa genético, (el primer mapa genético de melón publicado) también cercano al gen *P*, flanqueado por marcadores a 13.5 y 10.7 cM. Las poblaciones usadas para la construcción de ambos mapas comparten uno de los parentales (PI 161375) que es la fuente de la resistencia a MNSV. Una comparación entre estos mapas basado en marcadores RFLP y SSR comunes (Daning- Poleg y col., 2000) confirma que el G11 de nuestro mapa corresponde con el grupo de ligamiento 7 del mapa construido por el grupo francés (Baudracco-Arnas y Pitrat, 1996).

Una población de LDHs derivada del mismo cruce (PI 161375 x PS) fue utilizada para la saturación de marcadores de esta región utilizando la estrategia de BSA. Esta población es más adecuada para este propósito que una F_2 porque 1) debido a su naturaleza homocigota nos permite detectar los alelos dominantes de un marcador como si fueran codominantes, ya que no existen individuos heterocigotos teóricamente, haciendo el test más eficaz, 2) las LDHs presentan la ventaja en el test de resistencia al MNSV que se pueden realizar varias réplicas de cada línea, en cambio en la población F_2 , es necesario un análisis de la progenie F_3 para obtener el mismo nivel de información. De esta forma, mediante el uso de las LDHs hemos detectado seis marcadores adicionales en la región del gen *nsv*, y hemos localizado con mayor precisión los cuatro que ya estaban mapeados en la F_2 . Así, pudimos localizar un total de 10 marcadores en una región cromosómica corta (17.7 cM) que incluye el gen *nsv*. Además, cinco de los marcadores se encuentran localizados dentro del intervalo genético de 5.9 cM flanqueando al gen y dos de los marcadores (ACC/ACC-110 y OPX15-1.06) cosegregan con *nsv*.

Cinco de los marcadores obtenidos eran AFLPs y uno era un RAPD, indicando en nuestro caso que los AFLPs son más eficientes que los RAPDs para la detección de marcadores ligados a genes mediante BSA. Por otro lado, el método de amplificación de los RAPDs genera fragmentos de ADN de mayor tamaño que los AFLPs, y su conversión en marcadores polimórficos codominantes de PCR, como SCAR o CAPS, resulta más sencillo que en los AFLPs. Esta razón justifica el uso de los dos tipos de marcadores para la saturación con marcadores de una región específica del genoma.

El descubrimiento y mapeado de marcadores ligados al gen *nsv* facilitará la selección del alelo resistente en programas de mejora de melón. La conversión de dichos marcadores en marcadores codominantes específicos de PCR mejorará su eficiencia.

Dos de estos marcadores, CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120, localizados a una distancia de 1.5 cM del gen *nsv*, se obtuvieron a partir de la misma combinación de cebadores, uno ligado al alelo susceptible y el otro al alelo resistente con tamaños similares en sus productos de amplificación (115 y 120 pb). Es posible que estos dos marcadores sean alélicos y que los cebadores CTA/ACG produzcan un AFLP codominante, sin embargo el único modo de confirmar esto sería clonando y secuenciando ambos fragmentos de ADN.

La resolución del último mapa que hemos elaborado es todavía baja (1.5 cM/evento de recombinación) debido al pequeño tamaño de la población de LDHs. Dos de los marcadores, OPX15-1.06 y ACC/ACC-110, no fueron separados del gen *nsv* y por tanto, se localizan a menos de 1.5 cM. Actualmente, estamos convirtiendo los marcadores flanqueantes más cercanos al gen (OPD8-0.80, CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120) en marcadores codominantes de PCR, que permitirá el cribado de una población de gran tamaño F_2 para la búsqueda de individuos recombinantes. Estos recombinantes nos permitirán tener una posición más fina de todos los marcadores e iniciar una segunda ronda de BSA que permitirá la caracterización de marcadores adicionales más estrechamente ligados al gen *nsv*.

Si consideramos que el genoma de melón contiene 454 Mb de ADN (Arumuganathan y Earle, 1991) y una distancia genética de 1197 cM de media (Oliver y col., 2001), una distancia genética de 1 cM corresponde a una distancia física de 380 Kb. Para aislar el gen *nsv* mediante clonaje posicional, necesitaremos identificar marcadores flanqueantes estrechamente ligados al gen. Una librería de BACs acaba de ser descrita para melón (Luo y col., 2001) y además disponemos de otra que ha sido obtenida en el Institut de Biologia Molecular de Barcelona (P. Puigdomènech, comunicación personal). La disponibilidad de dichas genotecas facilitará el objetivo final de clonar el gen *nsv*.

5. Mapa genético de media resolución y mapa físico del locus *nsv* en la población F₂

5. MAPA GENÉTICO DE MEDIA RESOLUCIÓN Y MAPA FÍSICO DEL LOCUS *nsv* EN LA POBLACIÓN F_2

5.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo describimos la construcción de un mapa genético de media resolución de la región del locus *nsv*. Para ello hemos utilizado una población F_2 de 408 individuos (PI x PS) y los marcadores moleculares descritos en el capítulo 4, los cuales serán transformados en marcadores de PCR para su fácil manejo en una población de gran tamaño. También hemos construido el primer mapa físico de esta región gracias a que disponíamos de genotecas de BACs procedentes de un genotipo resistente y de otro susceptible. Además, algunos extremos de los clones BACs identificados en esta región se utilizaron para desarrollar nuevos marcadores adicionales que permitieron una mayor saturación de marcadores en el mapa genético. Finalmente, estos datos han permitido identificar un BAC que contiene físicamente el gen *nsv*.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Conversión de los marcadores AFLPs y RAPDs en marcadores específicos de PCR

El marcador AFLP CTA/ACG-115 cartografiado en la población F_2 y en la población de LDHs, y los marcadores AFLPs ACC/ACC-110 y CTA/ACG-120 y los RAPDs OPX15-1.06 y OPD08-0.80 cartografiados únicamente en la de LDHs, cosegregaban o flanqueaban al gen *nsv* (capítulo 4). Estos marcadores fueron convertidos en marcadores específicos de PCR, como los marcadores SCAR o CAPS, que son de fácil utilización, sobretodo cuando van a ser usados en poblaciones de gran tamaño.

5.2.1.1. Conversión de marcadores AFLPs en marcadores tipo CAPS

Las bandas polimórficas de interés de los marcadores AFLP ACC/ACC-110, CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120, de 100, 115 y 120 pb respectivamente, fueron recortadas del gel de acrilamida, tras la amplificación que había sido realizada con marcaje radiactivo con ^{33}P (**Fig. 5.1**), el ADN fue clonado y secuenciado. La comparación de las secuencias de los marcadores CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120, obtenidos a partir de la misma combinación de cebadores, reveló que se trataba de la misma secuencia, pero que presentaba varios polimorfismos. Los marcadores

originales presentaban un tamaño de 115 y 120 pb respectivamente. Por este motivo, sólo realizamos la PCR inversa (iPCR) (sección 3.8.3) para los marcadores ACC/ACC-110 y CTA/ACG-115, para clonar las regiones flanqueantes al fragmento original, y así aumentar el tamaño de estos marcadores y la probabilidad de detectar un polimorfismo.

Así pues, el ADN de la línea parental PS que había sido digerido y autoligado, fue amplificado con unos cebadores específicos de la secuencia (132-IPCR-F/132-IPCR-R, 29-IPCR-F/29-IPCR-R), pero que se habían diseñado en sentido inverso, para amplificar las regiones exteriores al fragmento de origen (la secuencia de los cebadores se detallada en el apéndice **A.2**). Para CTA/ACG-115, observamos amplificación de una banda de unos 400 pb (la banda original era de 115 pb) con los cebadores 29-IPCR-F y 29-IPCR-R a partir de ADN genómico que había sido digerido inicialmente con la endonucleasa *TaqI*. Esta banda se recortó del gel de agarosa, se purificó, se clonó en el vector pGEM-T y aislamos 14 clones, 8 de los cuales fueron secuenciados con los cebadores universales M13 (secuencia detallada en apéndice **A.4**). El análisis de estas secuencias y la ordenación de las mismas, gracias a la diana de restricción, nos permitió obtener la secuencia completa de 1 clon de 439 pb (**Fig. 5.2**). Sobre esta secuencia, se diseñaron nuevos cebadores específicos en los extremos (M29-F, M29-R) que serán utilizados para amplificar el marcador de PCR desarrollado a partir de este AFLP.

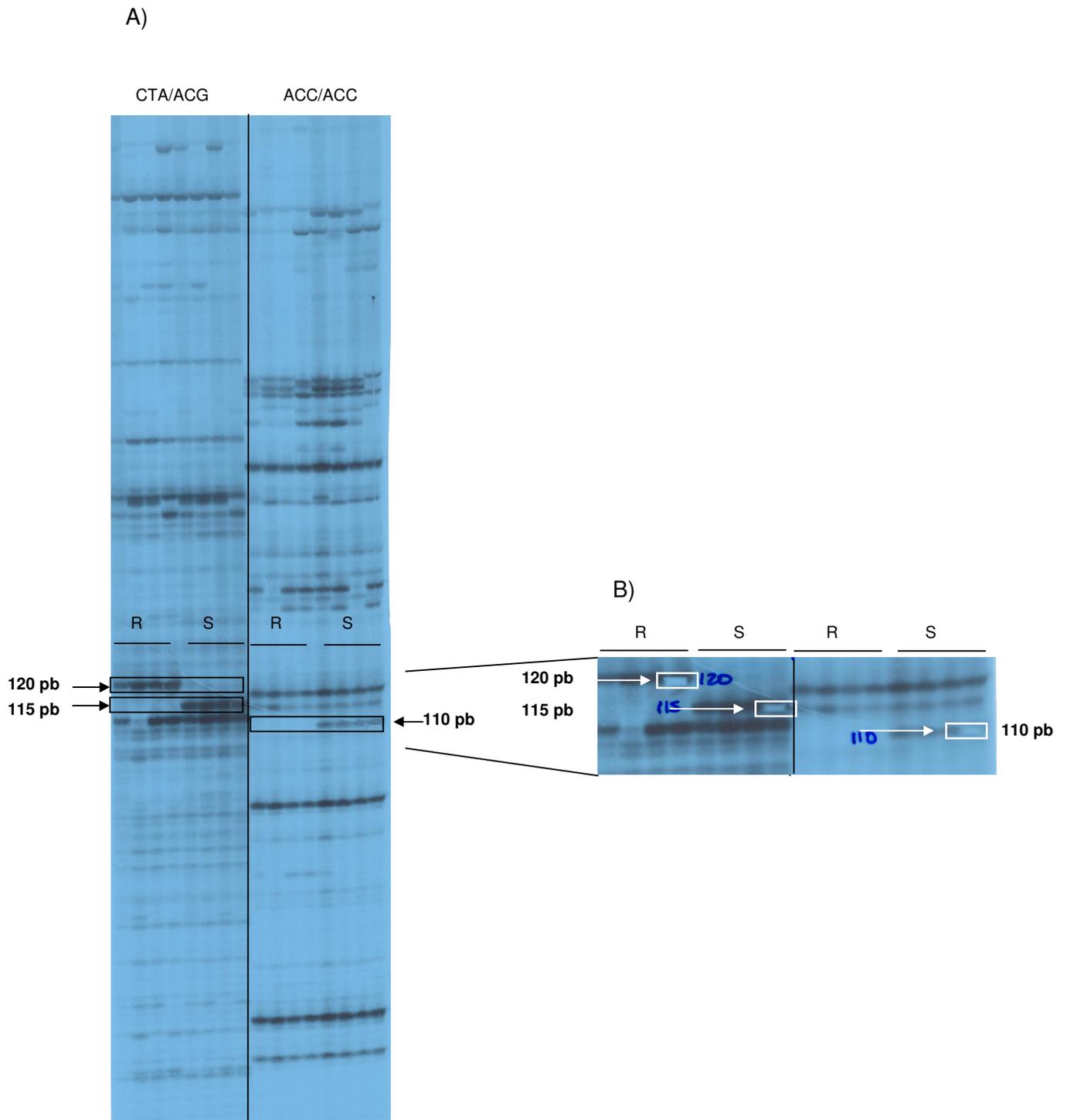


Fig. 5.1.A) gel de AFLPs con patrón de bandas generadas por las combinaciones de los cebadores CTA/ACG y ACC/ACC. Los recuadros enmarcan las bandas polimórficas entre 4 líneas resistentes (R) y 4 susceptibles (S). El tamaño de las bandas polimórficas para la combinación de cebadores CTA/ACG es de 120 pb y 115 pb, y para la combinación ACC/ACC es de 110 pb. B) detalle de las bandas polimórficas recortadas, indicadas con un rectángulo color blanco.

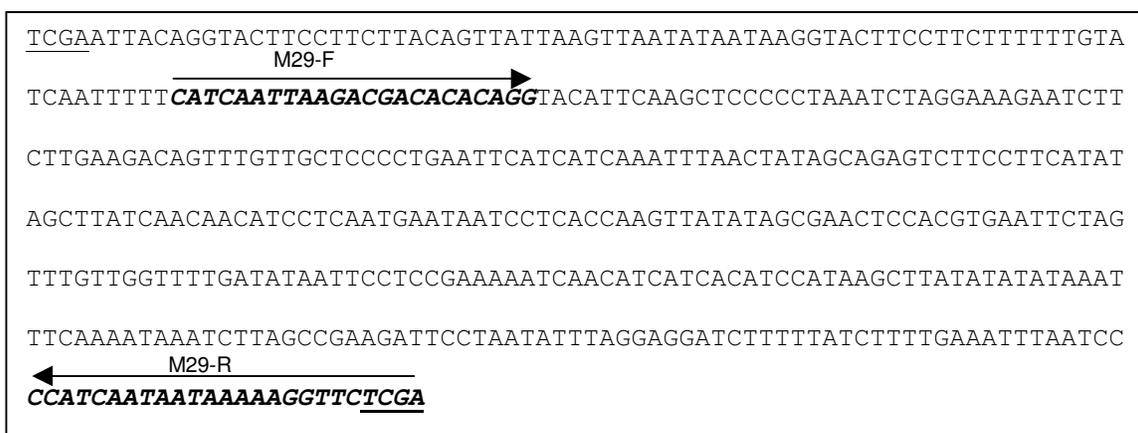


Fig. 5.2: Secuencia de un clon de 439 pb obtenida tras la iPCR sobre la línea PS, a partir del AFLP CTA/ACG-115. La diana de restricción del enzima *TaqI* está subrayada. Los nuevos cebadores, M29-F, M29-R, diseñados sobre esta secuencia, serán los utilizados para el marcador CAPS M29 para el genotipado de la población *F*₂. El producto de amplificación entre estos dos cebadores es de 360 pb en PS y 365 pb en PI.

El producto de la amplificación con estos cebadores M29-F y M29-R sobre las líneas parentales PI (365 pb) y PS (360 pb) fue secuenciado y la comparación entre ambas reveló un polimorfismo de restricción con el enzima *AflIII* (**Fig. 5.3**). La diferencia de tamaño entre el alelo PI y PS certifica el alelismo de los marcadores originales AFLPs CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120. Este polimorfismo fue fácilmente observable en gel de agarosa: PI presentaba dos bandas de 191 y 174 pb y PS una única banda de 360 pb, por no presentar la diana de restricción para el enzima *AflIII*. Este marcador fue denominado M29 y era de naturaleza codominante, permitía distinguir los individuos heterocigotos de los homocigotos (**Fig. 5.4**).

El marcador AFLP ACC/ACC-110 no resultó amplificado mediante la reacción de iPCR, por lo que utilizamos el kit Universal Genomewalker™ (Clontech), siguiendo las indicaciones del fabricante, para conseguir aumentar el tamaño de la banda original de 110 pb. Básicamente, este procedimiento consiste en la digestión del ADN genómico con varios enzimas de restricción (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y *StuI*), la ligación de unos adaptadores específicos y finalmente, la amplificación del fragmento con un cebador específico del marcador (GSP) y con otro específico del adaptador (AP2).

Tras la amplificación sobre la línea parental PI observamos claramente una banda de aproximadamente 1.2 Kb, correspondiente al ADN que había sido digerido con el enzima *PvuII*. Esta banda fue recortada del gel de agarosa, el producto fue purificado y secuenciado directamente. Se diseñaron cebadores específicos en esta secuencia (M132-F/M132-R), se amplificaron sobre las dos líneas parentales PI y PS y el producto de PCR de ambas fue secuenciado. El análisis de las secuencias desveló la existencia de un polimorfismo de restricción para el enzima *TaqI*, que permitió distinguir los dos genotipos. Tras la digestión con este enzima, se observaban dos bandas de 750 y 450 pb en el parental resistente PI y tres bandas de 750, 300 y 150 pb en el parental susceptible PS. Este marcador fue denominado M132, y como el marcador M29, también era de naturaleza codominante (**Fig. 5.5**). Las secuencias y las condiciones de PCR de los marcadores M29 y M132 se detallan en el apéndice **A.3**.

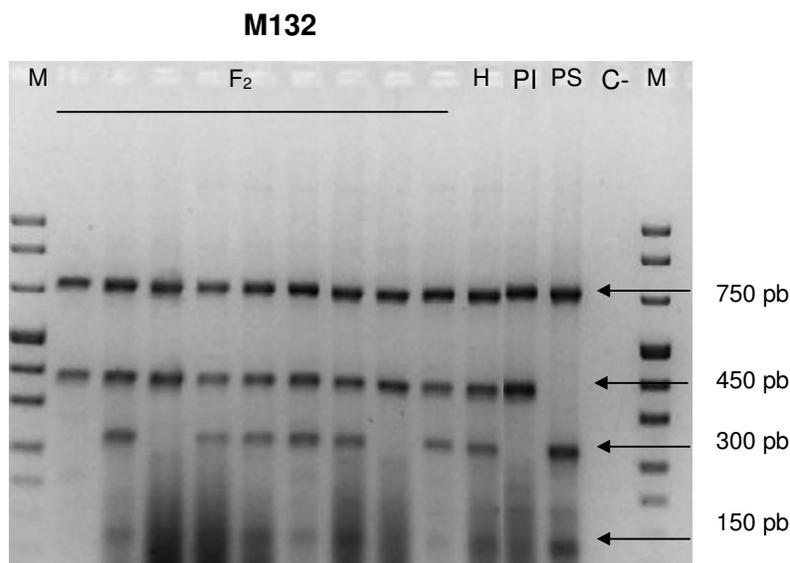


Fig. 5.5. Gel de agarosa mostrando el marcador M132. El tamaño de la banda original amplificada es de aproximadamente 1.2 Kb. La digestión con *TaqI* en PI origina dos bandas de 700 pb y 450 pb. La línea PS presenta otra diana de restricción en el fragmento de 450 pb dando lugar a dos bandas de 300 pb y 150 pb. El fragmento de 150 pb es casi inapreciable en el gel. El híbrido (H) presenta las bandas comunes a los dos parentales. M: marcador de peso molecular pUC mix. PI: parental resistente PI 161375. PS: parental susceptible Piel de Sapo, H: Híbrido, F_2 : individuos de la población F_2

5.2.1.2. Conversión de marcadores RAPD en marcadores de PCR

Los marcadores RAPD (OPX15-1.06, OPD08-0.80) que habían sido cartografiados en las poblaciones de LDHs y F_2 (capítulo 4), fueron convertidos en marcadores de PCR. Para ello, las bandas polimórficas fueron recortadas del gel de agarosa, purificadas, clonadas y secuenciadas. El análisis de las secuencias de estos

dos marcadores RAPD permitió el diseño de nuevos cebadores específicos (X15-F/X15-R en la secuencia del OPX15-1.06, D08-F/D08-R en la secuencia del OPD08-0.80) de mayor longitud que los cebadores RAPD originales de 10 pb. La amplificación con estos cebadores permitió su amplificación específica. El marcador derivado del RAPD OPX15-1.06 fue un marcador tipo SCAR, denominado X15, que sólo amplificaba una banda de 1.1 Kb. en PI (**Fig. 5.6**), por tanto era un marcador de naturaleza dominante. No se consiguió amplificar las dos líneas parentales con este marcador, a pesar de que se diseñaron varios pares de cebadores con este objetivo (datos no mostrados).

El marcador derivado del RAPD OPD08-0.80 fue transformado en un marcador codominante tipo CAPS, denominado D08, que amplificaba una banda de 750 pb en los dos parentales. La secuenciación del producto de PCR reveló un polimorfismo de restricción con el enzima *EcoRV* (**Fig. 5.7**). Las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR de los marcadores X15 y D08 se describen en el apéndice **A.3**.

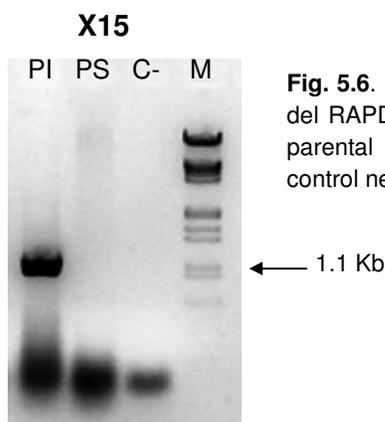
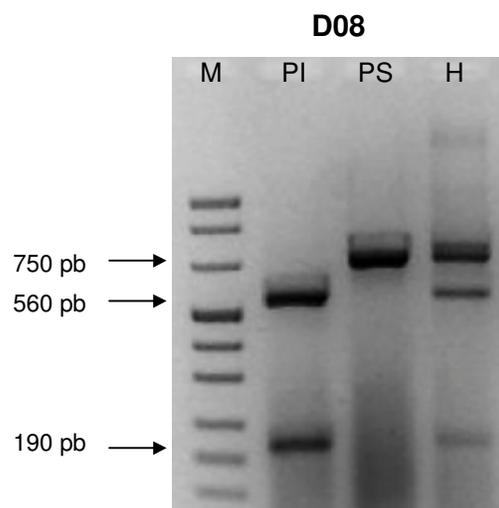


Fig. 5.6. Marcador SCAR X15 visualizado en gel de agarosa generado a partir del RAPD OPX15-1.06. La banda amplificada en la línea PI es de 1.1Kb. PI: parental resistente PI 161375, PS: parental susceptible Piel de Sapo, C-: control negativo, M: marcador DNA λ *EcoRI/HindIII*.

Fig. 5.7. Marcador CAPS D08. El tamaño de la banda original amplificada es de 750 pb. La digestión con el enzima *EcoRV* en el parental resistente PI origina dos bandas de 560 pb y 190 pb. El parental susceptible PS no presenta esta diana de restricción. En el híbrido se observan las bandas comunes a los dos parentales. PI: parental resistente PI 161375. PS: parental susceptible Piel de Sapo. H: Híbrido. M: marcador peso molecular pUC Mix



5.2.2. Búsqueda de recombinantes entre los marcadores M29, M132, X15 y D08

La población F_2 de 408 individuos fue genotipada con los marcadores M29, M132, X15 y D08. Se identificaron un total de 91 recombinantes entre los dos marcadores que flanquean la región del gen *nsv*, M29 y D08, de los cuales 26 se

localizaban entre los marcadores M29 y M132, y 65 entre los marcadores M132 y D08. Para el marcador X15, sólo se pudo conocer su localización aproximada entre los marcadores M29 y M132, debido a su carácter dominante (**Fig. 5.8**).

5.2.3. Cartografiado del locus *nsv* en el mapa genético de melón de la población F_2

Los 91 individuos recombinantes entre los marcadores M29 y D08, fueron transplantados a suelo y autofecundados. Únicamente 46 produjeron semillas, que utilizamos para realizar el test de progenie F_3 . El resto de individuos no produjo frutos o los frutos no se desarrollaron bien produciendo semillas vacías. Así pues, cabe remarcar que el gen *nsv* fue cartografiado en el mapa genético únicamente respecto a los 46 individuos recombinantes de los que se obtuvo semillas y en los que realizó el test de progenie.

Tras la inoculación mecánica con el virus MNSV de 20 individuos de cada familia F_2 (sección 3.2) se observaron los síntomas al cabo de unos 5 días. La segregación observada fue 3:1, con un total de 28 familias heterocigotas (*Nsv/nsv*), 8 familias que no presentaron ningún síntoma (resistentes) (*nsv/nsv*) y 10 que presentaban lesiones en todos ellas (susceptibles) (*Nsv/Nsv*). Estos resultados nos permitieron cartografiar el gen *nsv* en la población F_2 , entre el marcador M29 (7 recombinantes) y el marcador M132 (5 recombinantes) (**Fig. 5.8**).

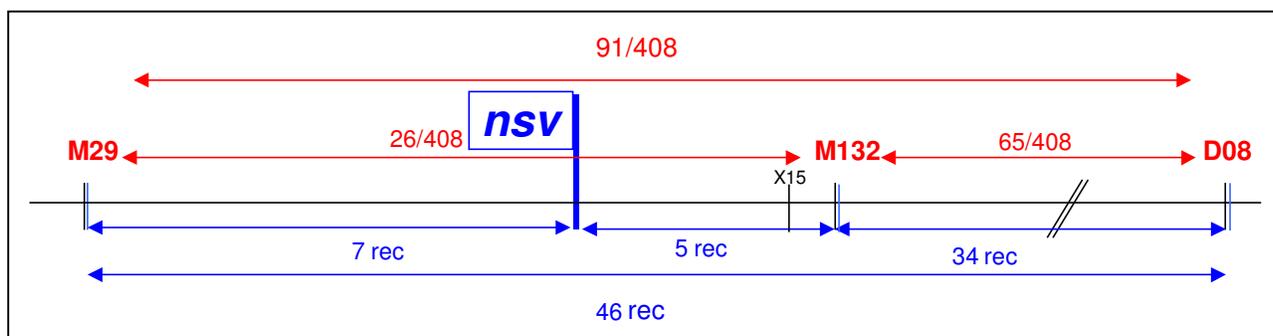


Fig. 5.8. Mapa genético de la región cercana al gen *nsv* en la población F_2 de 408 individuos, en el que se incluyen los marcadores flanqueantes M29, X15, M132 y D08. En la parte superior, en rojo, se indican los recombinantes totales entre los marcadores: 91 recombinantes entre los marcadores flanqueantes M29 y D08, distribuidos en 26 entre los marcadores M29 y M132 y 65 entre los marcadores M132 y D08. En la parte inferior del mapa, en azul, se indican los 46 recombinantes testados para la resistencia a MNSV. La posición del marcador X15 indicada es aproximada.

5.2.4. Identificación de BACs positivos para los marcadores, desarrollo de nuevos marcadores a partir de sus extremos y construcción del mapa físico

A continuación, se detalla la elaboración del mapa físico de la región del gen *nsv*. Todas las secuencias de los cebadores específicos de los extremos de los BAC, las condiciones de PCR y el tamaño de las bandas amplificadas se detallan en el apéndice **A.6.1**. Los polimorfismos detectados utilizados para cartografiar los marcadores desarrollados a partir de los extremos de los BACs (denominados extremos sp6 y U) se detallan en el apéndice **A.6.3**.

5.2.4.1. Identificación de los clones BAC 7K20, 5A6 y 38B12

La identificación de clones BAC positivos para los marcadores de la fig. 5.8 y la secuenciación de sus extremos fue realizada por el Dr. van Leeuwen del IBMB-CSIC de Barcelona. En cambio, el cartografiado de los extremos de los BACs en el mapa genético de la población F_2 como nuevos marcadores y la orientación de los BACs en el mapa físico fue realizado en nuestro laboratorio.

Los marcadores M29, X15 y M132 (marcadores flanqueantes más cercanos al gen *nsv*) se utilizaron inicialmente para cribar la genoteca de BACs de melón de la línea resistente PIT92, y se identificó al menos un clon BAC positivo para cada uno de ellos: 7K20, 5A6 y 38B12 respectivamente. Tras la secuenciación de los extremos de estos clones y el diseño de nuevos cebadores específicos de los mismos, la comparación de las secuencias del producto de PCR obtenido a partir de las dos líneas parentales reveló polimorfismos detectados con digestión mediante enzimas de restricción. Así pues, se cartografiaron el extremo U del BAC 7K20 mediante digestión con el enzima *EatI* (denominado marcador 7K20U), el extremo sp6 del BAC 5A6 mediante digestión con el enzima *TaqI* (denominado marcador 5A6sp6) y el extremo U del BAC 38B12 mediante digestión con el enzima *EcoRI* (denominado marcador 38B12U) como nuevos marcadores CAPS (**Fig. 5.9**).

La secuenciación del extremo U del BAC 5A6 reveló un polimorfismo tipo SSR, y tras diseñar nuevos cebadores (5A6U-F/5A6U-R-SSR) en la región flanqueante al SSR y detección en gel de acrilamida con marcaje radiactivo, se desarrolló el marcador 5A6U-SSR (**Fig. 5.10**).

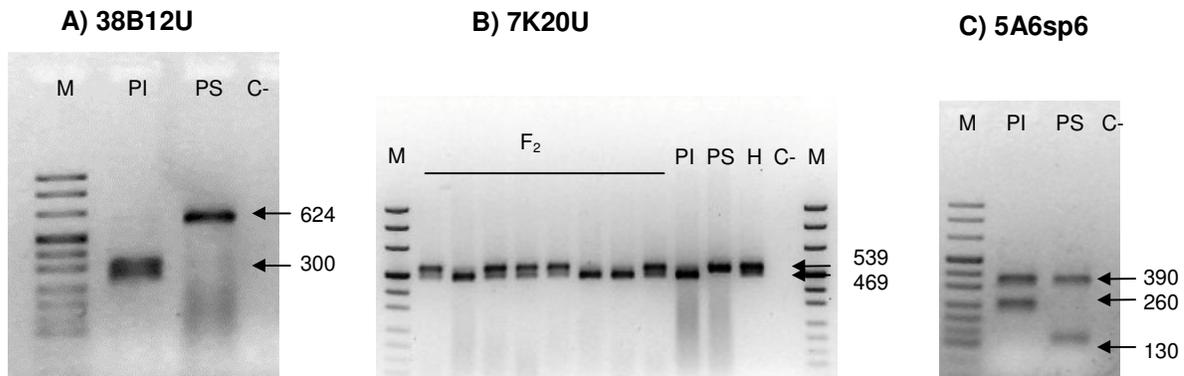


Fig. 5.9. A) Marcador 38B12U. El tamaño de la banda original amplificada es de 624 pb. La digestión con el enzima *EcoRI* en el parental resistente PI origina dos bandas de unos 300 pb. El parental susceptible PS no presenta esta diana de restricción. **B) Marcador 7K20U.** El tamaño de la banda original amplificada es de 539 pb. La digestión con *EatI* en el parental resistente PI origina una banda de 469 pb y otra de 70 pb, no es visible en el gel. El parental susceptible PS no presenta esta diana de restricción. En los individuos heterocigotos se pueden observar los dos fragmentos. **C) Marcador 5A6sp6.** El tamaño de la banda original amplificada es de 650 pb. La digestión con *TaqI* en el parental resistente PI origina una banda de 390 pb y otra de 260 pb. El parental susceptible PS presenta otra diana de restricción en la banda de 260 pb originando dos bandas de unos 130 pb. Las bandas polimórficas entre los dos parentales son las de 260 y 130 pb, la banda de 390 pb aparece en ambos. PI: parental resistente PI 191375. PS: parental susceptible Piel de Sapo. F₂: individuos de la F₂. H: híbrido. M: marcador peso molecular pUC Mix. C-: control negativo.

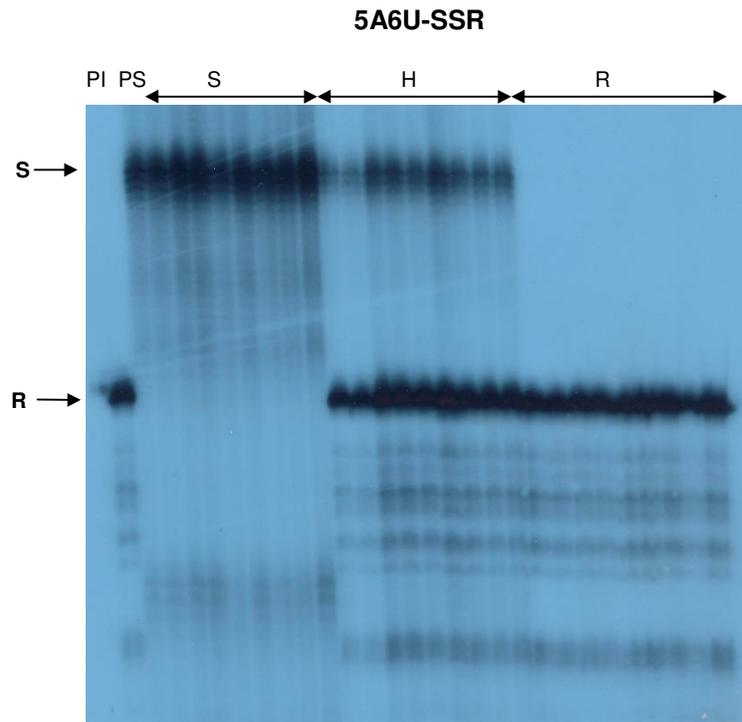


Fig. 5.10. Gel de acrilamida que muestra el marcador microsatélite 5A6U-SSR. Se muestran algunos individuos de la población F₂: S son individuos que presentan genotipo susceptible, como PS; R son individuos que presentan el genotipo resistente, como PI; H son los individuos heterocigotos. Las flechas indican las bandas polimórficas. La banda de mayor tamaño está ligada al alelo de susceptibilidad y la de menor tamaño está ligada al alelo de resistencia. PI: línea resistente PI 161375, PS: línea susceptible Piel de Sapo.

No se observaron polimorfismos entre las secuencias de los extremos sp6 de los BACs 7K20 y 38B12, incluso tras haber secuenciado regiones interiores adicionales del extremo del BAC (van Leeuwen, comunicación personal), por este motivo no pudieron ser mapeados.

Los nuevos marcadores que se desarrollaron a partir de los extremos de los BACs se cartografiaron en la población F_2 . Como hemos comentado en el apartado 5.2.3, el gen de resistencia *nsv* fue cartografiado en la población F_2 utilizando una subpoblación de los individuos recombinantes (ver **Fig. 5.15**, distancias de la parte inferior del mapa). En cambio, los marcadores fueron cartografiados respecto al total de los recombinantes (en **Fig. 5.15**, distancias de la parte superior del mapa). Por esta razón a partir de ahora hablaremos de dos distancias a las que se encuentran los marcadores: la distancia respecto al gen *nsv* y la distancia entre marcadores.

El marcador que se encontraba más cercano al gen *nsv* fue el 5A6sp6, a sólo 1 recombinante del gen (y a 20 recombinantes del marcador M29). El marcador 5A6U-SSR, desarrollado a partir del otro extremo del mismo BAC (5A6), se localizaba a 5 recombinantes del gen *nsv* (y a 25 recombinantes del marcador M29). El marcador 38B12U cosegregaba con el 5A6U-SSR. En el lado del marcador M29 se localizaba el 7K20U en la dirección contraria al gen de resistencia (**Fig. 5.15**).

5.2.4.2. Identificación del BAC 30L11

El segundo cribado de la genoteca de BACs se realizó con el marcador más cercano al gen *nsv*, 5A6sp6, y se identificaron varios clones positivos, entre ellos el BAC 30L11. Sus extremos fueron secuenciados y se diseñaron nuevos cebadores específicos en el extremo sp6 (30L11sp6-F y 30L11sp6-R) y en el extremo U (30L11U-F y 30L11U-R). La orientación del BAC 30L11 mediante amplificación por PCR con estos cebadores y el ADN del BAC 5A6 nos indicó que el extremo 30L11sp6 era el más cercano al gen *nsv*, por que no amplificaba el BAC 5A6 (datos no mostrados), y por tanto, sólo buscamos polimorfismos en este extremo para proceder a su mapeado.

El producto de PCR con los cebadores del extremo 30L11sp6 era una banda de 432 pb. Este producto de amplificación sobre PI y PS fue clonado y secuenciado y su análisis reveló un único polimorfismo: la línea resistente PI presentaba una inserción de una adenina (A) en la posición 130. En este caso, se procedió a la secuenciación directa del producto de PCR de los individuos recombinantes entre el gen *nsv* y el marcador 5A6sp6 para cartografiar el extremo 30L11sp6 y éste fue también mapeado a 1 recombinante del gen *nsv*, pero, sin embargo, a 19

recombinantes del marcador M29, uno menos que el marcador 5A6sp6. Por tanto, el marcador 30L11sp6 era el más cercano al gen *nsv* hasta el momento (**Fig. 5.15**).

5.2.4.3. Identificación del BAC 5B3

Este nuevo marcador, el 30L11sp6, fue utilizado para cribar de nuevo la genoteca de BACs en busca de clones más cercanos al gen. Se identificaron varios BACs positivos, uno de ellos era el 5B3 (van Leeuwen, comunicación personal), cuyos extremos fueron secuenciados. Como en los casos anteriores, se diseñaron cebadores específicos en las secuencias de los extremos, orientamos el BAC y buscamos polimorfismos en el extremo más cercano al gen, en este caso el extremo sp6. La secuenciación del producto de PCR de las dos líneas parentales obtenido con los cebadores 5B3sp6-F/5B3sp6-R reveló un polimorfismo detectado tras la digestión con el enzima de restricción *TaqI*. La banda original amplificada era de 150 pb y tras la digestión la línea PI presentaba bandas de 130 y 20 pb. La línea PS no contiene esta diana de restricción (**Fig. 5.11**). Este nuevo marcador CAPS 5B3sp6 fue cartografiado en la población F_2 también a 1 recombinante del gen *nsv*, y sin embargo 18 recombinantes del marcador M29, uno menos que el anterior marcador 30L11sp6, convirtiéndose el marcador 5B3sp6 en el más cercano al gen *nsv* en este momento (**Fig. 5.15**).

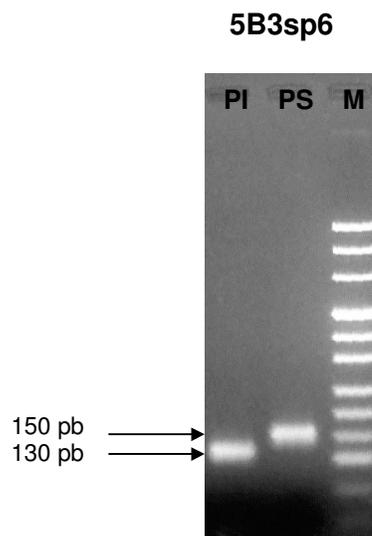


Fig. 5.11. Marcador 5B3sp6. La banda amplificada es de 150 pb. La digestión con *TaqI* genera dos bandas de 130 y 20 pb en PI, ésta última no es visible en el gel de agarosa. No hay digestión en PS. PI: línea parental resistente. PS: línea parental susceptible Piel de Sapo. M: marcador de peso molecular pUC Mix.

Así pues, se obtuvieron 3 marcadores, 5A6sp6, 30L11sp6 y 5B3sp6, que cosegregaban a 1 recombinante del gen *nsv* y que a su vez, se cartografiaron a 20, 19 y 18 recombinantes del marcador M29, respectivamente (ver **Fig. 5.15**).

5.2.4.4. Identificación del BAC 52K20

Con el marcador 5B3sp6 se identificó un nuevo BAC, el 52K20. Tras la secuenciación de sus extremos y el diseño de cebadores específicos en estas regiones, el BAC 52K20 fue orientado, siendo el extremo sp6 el más cercano al gen, y por tanto, el candidato a cartografiar en el mapa genético. El único polimorfismo observado, tras la secuenciación de regiones interiores adicionales del extremo sp6 del BAC 52K20 entre las dos líneas parentales, era un SNP localizado en la posición 743. La línea PI y el BAC 52K20 presentaban una guanina (G), mientras que en PS presentaba una adenina (A) (**Fig. 5.12**). Este SNP fue cartografiado en la población F_2 de 408 individuos como un nuevo marcador, 52K20sp6, mediante la técnica SNaPshot (sección 3.11.7) (H. van Leeuwen, comunicación personal) con el cebador interno 52k20sp6-SNP (secuencia detallada en apéndice **A.6.2**). No se detectó ningún evento de recombinación entre este marcador y el gen *nsv*. Por lo tanto, el marcador 52K20sp6 cosegregaba con el gen *nsv* (**Fig. 5.15**).

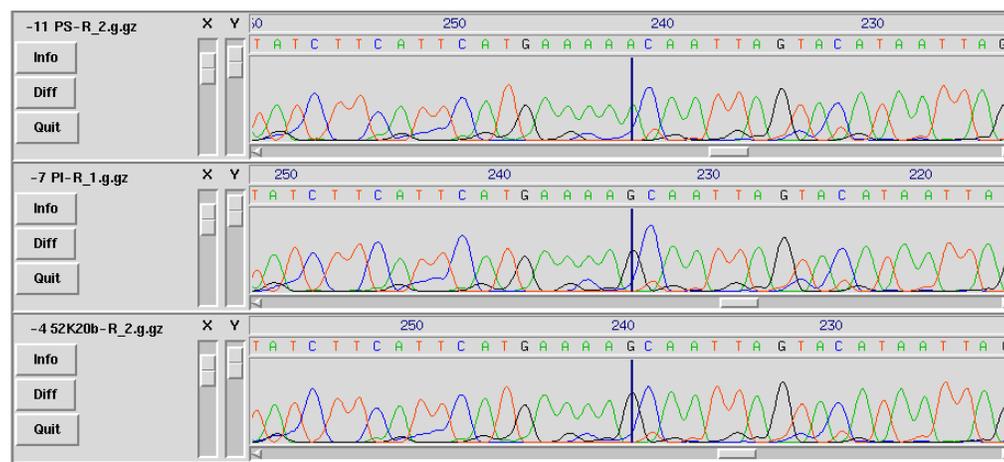


Fig. 5.12. SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”) detectado en la secuencia del extremo del BAC 52K20sp6. La posición del SNP está indicada por una línea azul vertical. La secuencia superior pertenece a PS, (donde observamos una A), la del medio a PI y la inferior al BAC 52K20 (ambos presentan una G). Este SNP es el único polimorfismo entre PS y PI en el extremo del BAC 52K20. (Figura cortesía del Dr. van Leeuwen).

5.2.4.5. Identificación del BAC 1-21-10

Por otro lado, el cribado de la genoteca generada a partir de la línea parental susceptible WMR-29 (URGV-INRA) (sección 3.13.1) con el marcador 5B3sp6 nos permitió identificar varios BACs positivos, entre ellos el BAC 1-21-10. La identificación del clon 1-21-10 se describe detalladamente en el capítulo 6 (secciones 6.2.4. y 6.2.5). Sus extremos fueron secuenciados y diseñamos cebadores específicos, tanto en el extremo L (1L3-F/1L3-R) como en el extremo R (1R3-F/1R3-R). La amplificación de estos cebadores con el ADN de los BACs 5B3, 52K20, 30L11, 5A6 y 10G6 nos permitió orientar el clon 1-21-10, siendo el extremo L el más lejano del "contig". Esto se dedujo por que el extremo L (marcador 1L3) no amplificaba ninguno de los clones del "contig", mientras que el extremo R (marcador 1R3) amplificaba el ADN de dos BACs, el 52K20 y 5B3 (**Fig. 5.13**). Por tanto, el extremo L debía ser cartografiado.

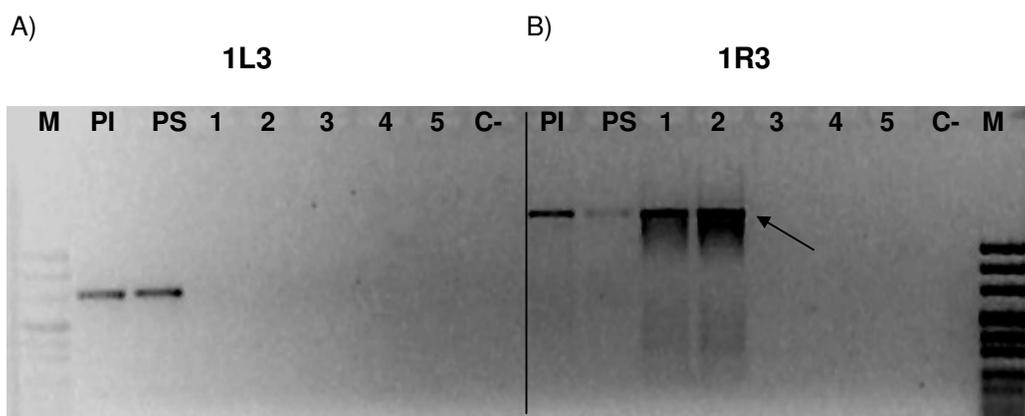


Fig. 5.13. Ejemplo de amplificaciones de PCR para orientar un BAC, en este caso el clon 1-21-10. A) Gel de agarosa donde se observa la amplificación con los cebadores del extremo L, el marcador 1L3 sólo amplifica las dos líneas parentales. B) La amplificación con los cebadores del extremo R del BAC 1-21-10, marcador 1R3, amplifica dos de los clones BAC: 52K20 y 5B3, por tanto el extremo L era el más lejano del "contig". PI: PI 1613765, PS: "Piel de Sapo", 1: BAC 52K20, 2: BAC 5B3, 3: BAC 30L11, 4: BAC 5A6, 5: BAC 10G6, C-: control negativo. M: marcador de peso molecular pUC Mix.

Una vez secuenciado el producto de PCR del extremo L del BAC 1-21-10, se identificó un SNP entre las secuencias de las dos líneas parentales: en la posición 219 de la secuencia PI presentaba una A mientras que en PS había una G. Al igual que un SNP anterior, éste fue identificado en los individuos recombinantes de la población F_2 de 408 individuos mediante la técnica de SNaPshot, con el cebador interno 1L3-SNP (secuencia detallada en el apéndice **A.6.2**) (**Fig. 5.14**). El nuevo marcador 1L3 fue cartografiado a 2 recombinantes del gen *nsv* y también a 2 recombinantes respecto al marcador 52K20sp6, en el lado del marcador M29. En este caso el número de recombinantes entre el marcador 1L3 y el gen *nsv* coincide con los recombinantes

entre 1L3 y 52K20, a diferencia de lo que ocurre con el resto de marcadores. La localización del marcador 1L3 en el lado del marcador M29 nos indicaba que el BAC 1-21-10 contenía físicamente el gen *nsv* (Fig. 5.15).

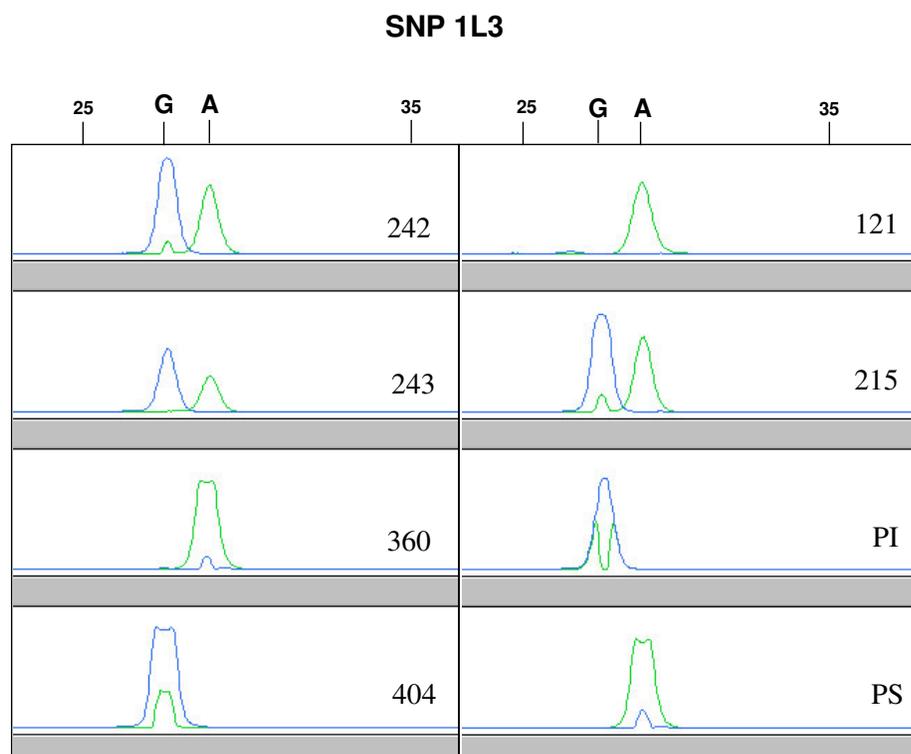


Fig. 5.14. Detección del SNP 1L3 con la técnica de SNaPshot en las líneas parentales PI y PS y en algunos individuos recombinantes de la población F_2 . Se muestra el producto de extensión de cebador único. El pico de menor peso molecular corresponde con el alelo G, presente en la línea resistente PI y el pico de mayor peso molecular corresponde con el alelo A, presente en la línea susceptible PS. Los individuos heterocigotos presentan los dos picos correspondientes a los dos alelos (individuos 242, 243 y 215). Los números de la parte superior de la figura indican el tamaño del producto de extensión en pb.

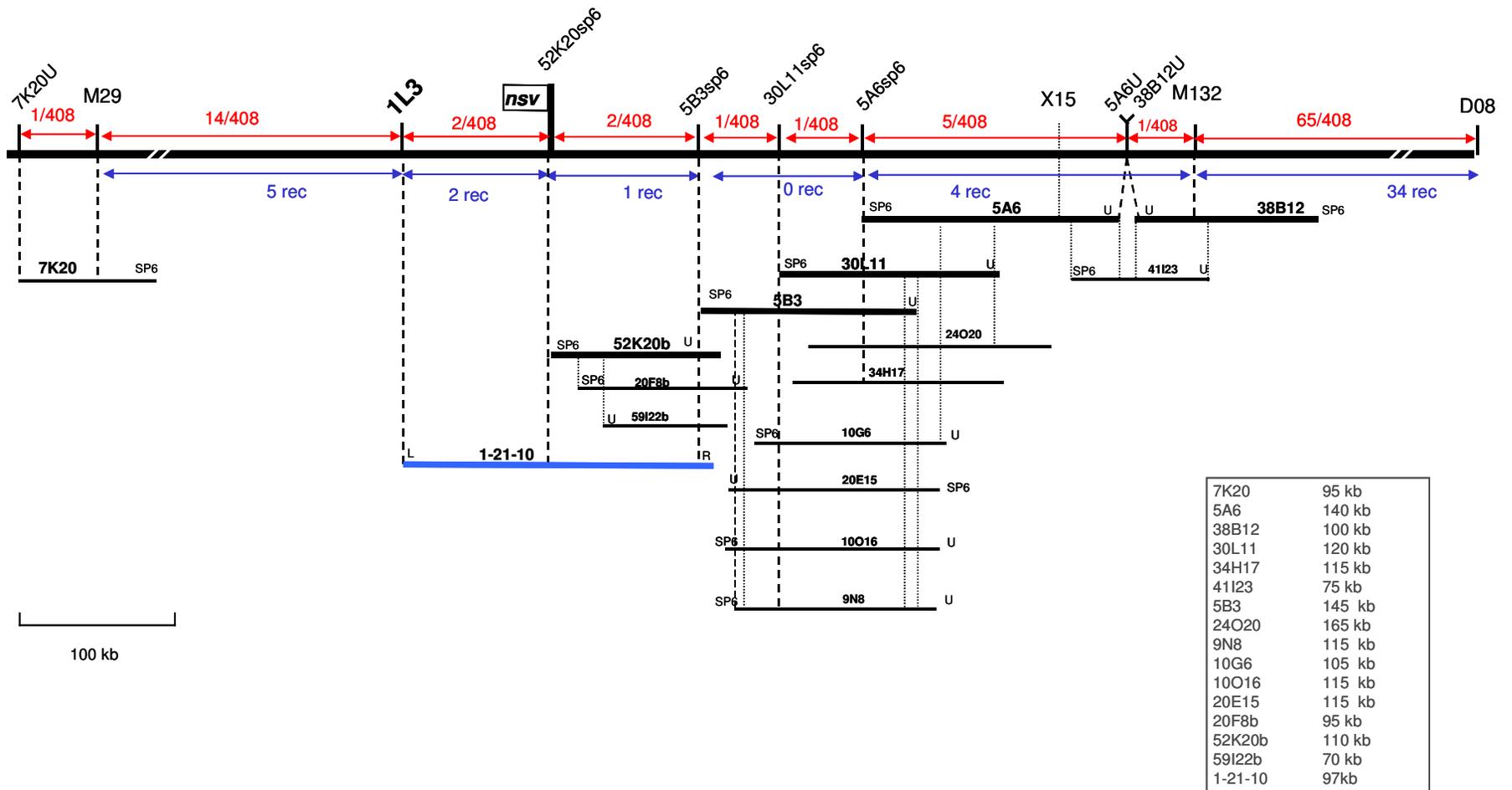


Fig. 5.15. Mapa genético de media resolución y mapa físico de la región del gen *nsv* en el grupo 11 de ligamiento de melón, generado en la población F_2 de 408 individuos. Las distancias genéticas están expresadas como eventos de recombinación. En rojo se indican las distancias y las posiciones únicamente entre los marcadores de la población completa F_2 , sin el gen de resistencia *nsv*. En azul se indican los eventos de recombinación entre los marcadores M29 y D08 de los 46 individuos recombinantes de la población F_2 , en los que se realizó el test de resistencia a MNSV y que sirvió para cartografiar el gen *nsv*. El mapa físico muestra los BACs que forman el "contig" como líneas horizontales mas gruesas, además de otros BACs (líneas de menor grosor) que se han ido hallando durante el cribado de la genoteca, pero cuyos extremos no fueron mapeados. Los BACs de color negro provienen de la genoteca de la línea resistente PIT92, y el BAC de color azul de la genoteca del parental susceptible WMR-29. Las líneas verticales discontinuas indican que existe amplificación del extremo de un BAC sobre el resto de BACs y las de mayor grosor además indican que esos extremos han sido cartografiados en el mapa genético. Las líneas blancas diagonales, dibujadas sobre el eje del mapa genético, indican que las distancias genéticas no son proporcionales. La representación de los BACs no es exactamente proporcional al tamaño real. En el recuadro de la derecha se muestran los tamaños de los BACs obtenidos mediante PFGE.

5.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se describe la construcción de un mapa genético de mediana resolución en una población F_2 (PI x PS) de 408 individuos y un mapa físico de BACs de la región del gen *nsv*.

El mapa genético que hemos desarrollado presenta una resolución del 0.12 cM, un valor mayor que el obtenido en el mapa de la población de LDHs de 69 individuos (1.5 cM). Este aumento de resolución se debe al mayor tamaño de la población F_2 y ha permitido la separación de dos marcadores, OPX15-1.06 y ACC/ACC-110, que cosegregaban con el gen en la población de LDHs (capítulo 4). El hecho de que estos dos marcadores cosegregaban con el gen indicaba que se localizaban a una distancia menor de 1.5 cM en la población de LDH. Concretamente, el marcador ACC/ACC-110 (convertido en el marcador M132 en la población F_2) se localiza aproximadamente a 10 recombinantes del gen en la población F_2 , o sea, a una distancia aproximada de 1.22 cM, confirmando así los datos obtenidos en la población de LDHs. Por otro lado, el intervalo genético entre los marcadores que inicialmente flanqueaban al gen en la población F_2 (M29 y M132) es de 3.18 cM (26 recombinantes).

Una de las herramientas útiles para cribar poblaciones de gran tamaño es la utilización de marcadores moleculares de PCR, que permiten genotipar grandes poblaciones de una manera más rápida y eficaz que los marcadores originales de los que provienen. En nuestro caso, los marcadores AFLPs CTA/ACG-115 y ACC/ACC-110 y el RAPD OPD08-0.80, fueron convertidos en los marcadores codominantes CAPS M29, M132 y D08, respectivamente. Este tipo de marcador es de fácil utilización y es más versátil que los AFLPs o RAPDs. Se pueden utilizar en poblaciones F_2 y BC1 sin pérdida de información, distinguiendo entre individuos heterocigotos y

homocigotos. Por otro lado, el marcador RAPD OPX15-1.06 sólo pudo ser transformado en un marcador de PCR dominante, X-15, por lo que su localización en el mapa genético fue aproximada, aunque fue muy útil en la identificación de clones BAC.

A pesar de la naturaleza dominante de los marcadores AFLPs, la secuenciación de los marcadores AFLPs CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120 ha demostrado que son las formas alélicas del mismo locus, y por tanto, en este caso, se trataría de un AFLP codominante.

Para la construcción del mapa físico, se utilizaron inicialmente los marcadores flanqueantes y ligados al gen *nsv* de la población F_2 (M29, X15 y M132). Estos fueron utilizados para identificar los primeros BACs que cubrieran el intervalo físico del gen diana y las secuencias de sus extremos fueron utilizadas para desarrollar marcadores de PCR usados para analizar las plantas recombinantes entre los marcadores flanqueantes. De esta forma, tras 5 rondas de identificación de BACs se obtuvo un "contig" de la región y finalmente, un BAC que contenía físicamente el gen *nsv*, el clon 1-21-10 que pertenecía a la genoteca de BACs de la línea susceptible WMR-29. De esta manera, se identificaron nuevos marcadores estrechamente ligados al gen desarrollados a partir de los extremos de los BACs, entre ellos los nuevos marcadores flanqueantes, 1L3 y 5B3sp6, que definen un intervalo de 0.49 cM, a 0.245 cM del gen *nsv* cada uno, y el marcador 52K20sp6 que cosegrega con el mismo.

Un alto grado de polimorfismo entre las especies facilita la identificación de marcadores polimórficos esenciales para la construcción de mapas. En nuestro caso, el alto grado de polimorfismo entre la línea parental resistente PI y las susceptibles PS y Ved (ésta última es una línea parental susceptible a MNSV de la población BC1) ha permitido la identificación y el mapeado de marcadores polimórficos en los mapas genéticos de las poblaciones F_2 y BC1. Estos tres genotipos pertenecen a grupos genéticamente muy distantes: PI pertenece al grupo *conomon* mientras que PS y Ved se incluyen en los grupos *inodorus* y *cantalupensis*, respectivamente (Monforte y col., 2003).

El éxito del clonaje posicional a menudo depende de la existencia de eventos de recombinación entre los cromosomas de los dos parentales utilizados para obtener la población segregante, y por tanto, de la relación distancia física/genética (Kb/cM) en la región de interés. Se ha sugerido que la falta de recombinación puede estar relacionada con la divergencia entre los genotipos, y por tanto, la presencia de secuencias no homólogas en la región cercana al gen podría contribuir a la supresión de la recombinación. Los eventos de recombinación pueden variar entre especies

distintas, siempre que sea posible la fecundación entre ellas, e incluso dentro de la misma especie. Se conocen casos donde la recombinación está suprimida, sobretudo en regiones cercanas al centrómero y en algunas regiones teloméricas, en las que la relación Kb/cM aumenta mucho. En tomate se ha descrito una región que presenta la recombinación muy suprimida con una relación 6800 Kb/cM, mientras que la relación teórica es de 750 Kb/cM. Ésta se encuentra en el cromosoma 9 en la región donde se localiza el gen *Tm2a* que confiere resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) (Pillen y col., 1996). Sin embargo, se han encontrado otras regiones donde esta relación es muy pequeña, como ocurre en la región del cromosoma 11 cercana al gen *I2* de resistencia a *Fusarium oxysporum* con 43 Kb/cM (Simons y col., 1998). En melón, la relación media encontrada en el cromosoma 5 es de 227 Kb/cM, en la región donde se localiza el gen *Fom-2* que confiere resistencia al hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razas 0 y 1, aunque se han descrito variaciones dentro de esta misma región, que pueden ir desde 150 Kb/cM hasta 630 Kb/cM (Joobeur y col., 2004). En la región del gen *nsv*, la relación encontrada en la población F_2 fue de 228 Kb/cM, obtenida gracias al mapeado de los dos extremos del BAC 5A6 (140 Kb) que estaban separados por 5 eventos de recombinación. Esta relación coincide con la obtenida en la región del *Fom-2* y es del mismo orden del promedio teórico calculado para la especie (380 Kb/cM) (capítulo 4), lo que sugiere que en esta región no existe una gran inhibición o supresión de la recombinación, lo que facilitará el clonaje del gen *nsv*.

Esto hecho es realmente importante, ya que se han dado casos, en que la existencia de la supresión de recombinación ha dificultado el clonaje del gen de interés, como fue el caso del gen *Mi* de tomate que confiere resistencia al áfido *Macrosiphum euphorbiae* y al nemátodo *Meloidogyne incognita* (Rossi y col., 1998). La utilización de una población segregante obtenida tras el cruzamiento de *Lycopersicon peruvianum*, que contiene el gen *Mi*, y de *L. esculentum* fue un problema debido a que la recombinación estaba totalmente suprimida en esta región y no se observaron eventos de recombinación entre los marcadores y el gen (Kaloshian y col., 1995; Kaloshian y col., 1998).

La construcción del mapa genético en la población F_2 es un paso crucial para el éxito del proyecto del clonaje posicional del gen *nsv* en melón, ya que permite conocer la posición precisa del gen de interés y el análisis de los ratios de recombinación de la región. Además, también será muy útil para seleccionar los marcadores más apropiados para ser utilizados en programas de mejora genética mediante selección asistida por marcadores (MAS), para la introducción del alelo *nsv* en líneas comerciales. Los marcadores más adecuados para MAS serían aquellos que se

localizan más cerca del gen, por tanto, los marcadores 1L3 y 5B3sp6, que se encuentran a 0.25 cM y 52K20sp6 que cosegrega con el gen. Pero antes, los marcadores 1L3 y 52K20sp6 deberían ser transformados en marcadores de PCR, más adecuados para ser utilizados en programas de mejora genética. Además, estos marcadores no han sido probados en otro germoplasma de melón diferente de las líneas parentales, por lo que todavía no se conoce su eficacia. Pero sin duda, el mejor marcador para MAS será aquel marcador que sea desarrollado directamente sobre el gen de resistencia, una vez que éste haya sido identificado.

En este capítulo hemos desarrollado un mapa genético de media resolución en una población F_2 de 408 individuos y un mapa físico de la región del gen *nsv*, identificando el BAC 1-21-10 que lo contiene físicamente. Llegado a este punto, la construcción de un mapa genético de alta resolución no hubiera sido necesaria. Sin embargo, la justificación del desarrollo de un mapa genético de alta resolución se debe a que su construcción se inició antes de obtener el mapa genético de la F_2 completo, antes de identificar el clon BAC que contiene al gen, y se pensó que probablemente sería necesario tener un mapa de mayor resolución para conseguir nuestros objetivos. Además, la construcción del mapa genético de alta resolución nos permitió trabajar en colaboración con el grupo de clonaje posicional de URGV-INRA. Por estas razones, se desarrolló un mapa genético de alta resolución en una población BC1 de 2727 individuos, que será descrito en el capítulo siguiente.

6. Mapa genético de alta resolución y mapa físico del locus *nsv* en una población BC1

6. MAPA GENÉTICO DE ALTA RESOLUCIÓN Y MAPA FÍSICO DEL LOCUS *nsv* EN UNA POBLACIÓN BC1

6.1. INTRODUCCIÓN

Mientras se cartografiaron los últimos marcadores en el mapa genético de la población F_2 de 408 individuos en nuestro laboratorio (capítulo 5), iniciamos la elaboración de un mapa genético en una población BC1 [(Ved x PI) x PI] de 2727 individuos, en colaboración con el grupo de clonaje posicional del Dr. Bendahmane (URGV-INRA, Evry), con el objetivo de aumentar la resolución del primer mapa genético obtenido. Para ello, utilizamos los marcadores moleculares generados a partir de la población F_2 , concretamente los marcadores de PCR que flanqueaban el gen *nsv* en el momento de iniciar el nuevo mapa, M29 y 5A6sp6 (**Fig. 5.15**). La conversión de estos marcadores CAPS en marcadores específicos de alelo nos permitió genotipar la población de gran tamaño de manera rápida y económica, ya que una única reacción de PCR por marcador permitió genotipar los 2727 individuos de la población BC1. El cribado de la genoteca de BACs de la línea de melón susceptible WMR-29 con algunos marcadores descritos en el capítulo anterior nos permitió identificar un clon que contenía físicamente el gen *nsv*.

Por otro lado, antes de empezar a trabajar con la población BC1 fue necesario confirmar que los marcadores M29 y 5A6sp6 flanqueaban al gen *nsv* en la nueva población. Para ello se utilizó una población de 100 líneas RILs, generada a partir de las mismas líneas parentales que la población BC1 (PI y Ved) (Périn y col., 2002).

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Desarrollo de los marcadores específicos de alelo

En primer lugar, los productos de amplificación de los dos marcadores M29 (sección 5.2.1.1) y 5A6sp6 (sección 5.2.4.1) en las líneas parentales PI y Ved fueron secuenciados. Se diseñaron varios cebadores, todos ellos en regiones que presentan mutaciones puntuales entre los dos genotipos, PI (*nsv/nsv*) y Ved (*Nsv/Nsv*), de manera que incorporaban en el extremo 3' del cebador la mutación presente en la línea susceptible, para así obtener sólo amplificación en aquellas líneas que presentan el alelo susceptible (*Nsv*).

Para el marcador M29, diseñamos 5 cebadores diferentes en la región 5' (cebadores F) y 3 en la región 3' (cebadores R). En el caso del marcador 5A6sp6,

diseñamos 2 cebadores en la región 5' y 2 en la región 3'. El diseño y la secuencia de todos estos cebadores se detalla en el apéndice **A.5.1**. Los cebadores varían en la longitud y en la/s mutación/es puntual/es incorporada/s en el extremo 3'. Se probaron todas las posibles combinaciones de PCRs con estos cebadores (datos no mostrados) y escogimos aquella combinación que amplificó intensamente una única banda del tamaño esperado en la línea Ved y que no amplificaba en PI.

En el caso del marcador M29, la combinación óptima de cebadores fue ns1-F2c/ns1-R2b (Fig. 6.1) que amplificó únicamente una banda de 237 pb en la línea Ved. Este marcador fue denominado ns1.

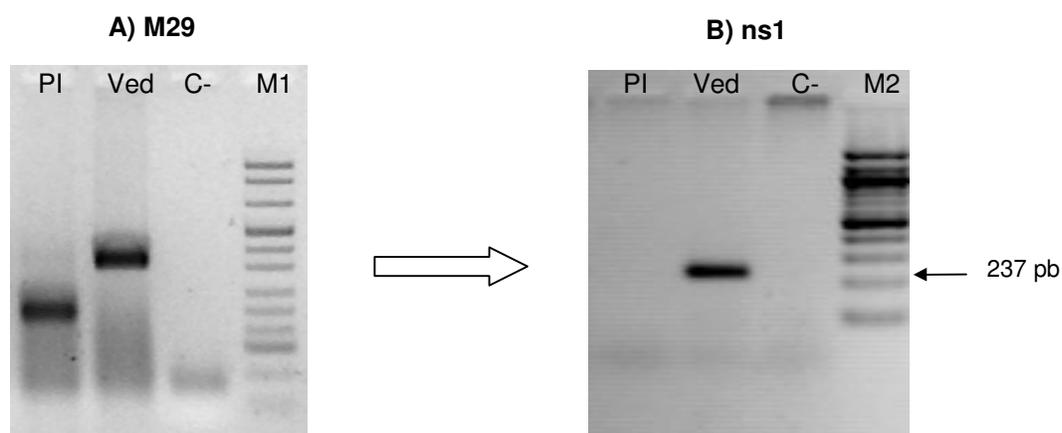


Fig. 6.1. A) Gel de agarosa donde se observa el marcador CAPS M29. B) El marcador específico de alelo ns1, desarrollado a partir de M29, amplifica sólo en el genotipo susceptible Ved (banda de 237 pb). PI: PI 161375. Ved: Vedrantaís. C-: control negativo. M1: marcador peso molecular pUC Mix. M2: marcador peso molecular 100pb DNA ladder .

En el caso del marcador 5A6sp6, la combinación de cebadores ns2-F1b/ns2-R1b amplificó una intensa banda de 492 pb (**Fig. 6.2**) y el marcador desarrollado a partir de 5A6sp6 se denominó ns2. El resto de combinaciones de cebadores no amplificaron de manera tan óptima y fueron descartados (datos no mostrados). Las condiciones de PCR de los marcadores específicos de alelo ns1 y ns2 se detallan en el apéndice **A.5.2**.

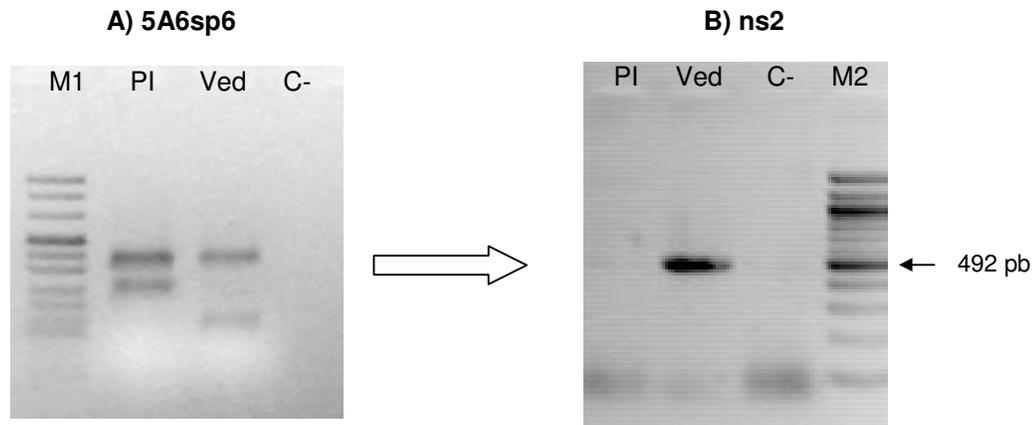


Fig. 6.2. A) Gel de agarosa donde se muestra el marcador CAPS 5A6sp6. B) Marcador específico de alelo ns2 desarrollado a partir del anterior, amplifica sólo en el genotipo susceptible Ved una banda de 492 pb. PI: PI 161375, Ved: Vedrantais, C-: control negativo, M1: marcador peso molecular pUC Mix. M2: marcador peso molecular 100pb DNA ladder.

6.2.2. Test de resistencia al MNSV en la población BC1

Una semana después de la inoculación con el virus MNSV en la población BC1 de 2727 individuos, realizada en el INRA de Montfavet, se evaluó el genotipo de cada individuo. La segregación observada fue 1:1 con 1355 individuos resistentes y 1372 individuos susceptibles y un valor para la $\chi^2 = 0.10$ n.s. Esta es la segregación esperada para una población BC1. También se realizó la recolección de material vegetal de toda la población en placas de 96 pocillos para llevar a cabo las amplificaciones de PCR con los marcadores flanqueantes ns1 y ns2.

6.2.3. Búsqueda de individuos recombinantes entre los marcadores flanqueantes ns1 y ns2 y cartografiado del gen *nsv* en la población BC1

La amplificación con los marcadores ns1 y ns2 sobre las líneas RILs confirmó que éstos flanqueaban al gen *nsv* en esta población (Bendahmane, comunicación personal) y que podían ser utilizados para genotipar los individuos de la población BC1. Descartamos así, posibles errores de posición de los marcadores en el mapa genético de la población F_2 (capítulo 5).

Una vez realizada la extracción del ADN en placas de 96 pocillos de la población BC1, llevamos a cabo las amplificaciones con los marcadores específicos de alelo ns1 y ns2 sobre el total de individuos. Aquellos que presentaban amplificación con los dos marcadores ns1 y ns2 (+/+) (**Fig. 6.3**, **Fig. 6.4**) o los que no presentaban amplificación con ninguno de los dos (-/-) fueron descartados, y seleccionamos aquellos individuos que presentaban eventos de recombinación entre estos marcadores [(+/-) o (-/+)] indicados en las fig. 6.3 y 6.4 con el número del individuo]. Se

identificaron un total de 187 recombinantes entre los marcadores *ns1* y *ns2*. Además, el gen *nsv* fue cartografiado a 115 recombinantes del marcador *ns1* y a 72 del marcador *ns2* (Fig. 6.7).

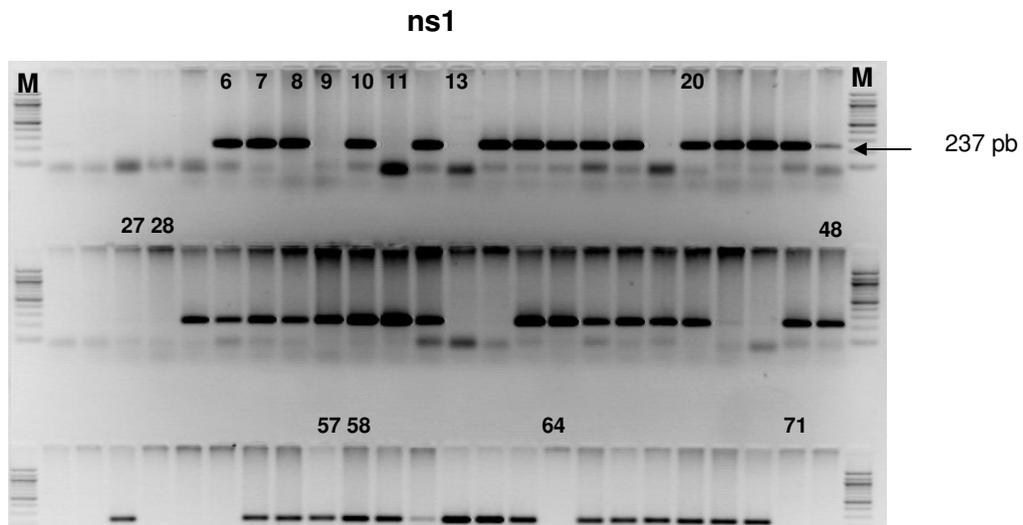


Fig. 6.3. Gel de agarosa donde se muestran 72 individuos de la población BC1 amplificados con el marcador *ns1*. La banda amplificada es de 237 pb y está ligada al alelo susceptible, y por tanto, presente en los individuos heterocigotos susceptibles (*Nsv/nsv*) y en los individuos resistentes (*nsv/nsv*) recombinantes entre *ns1* y *ns2*. Los individuos recombinantes entre *ns1* y *ns2* se indican con el número correspondiente. M: marcador peso molecular 100pb DNA ladder.

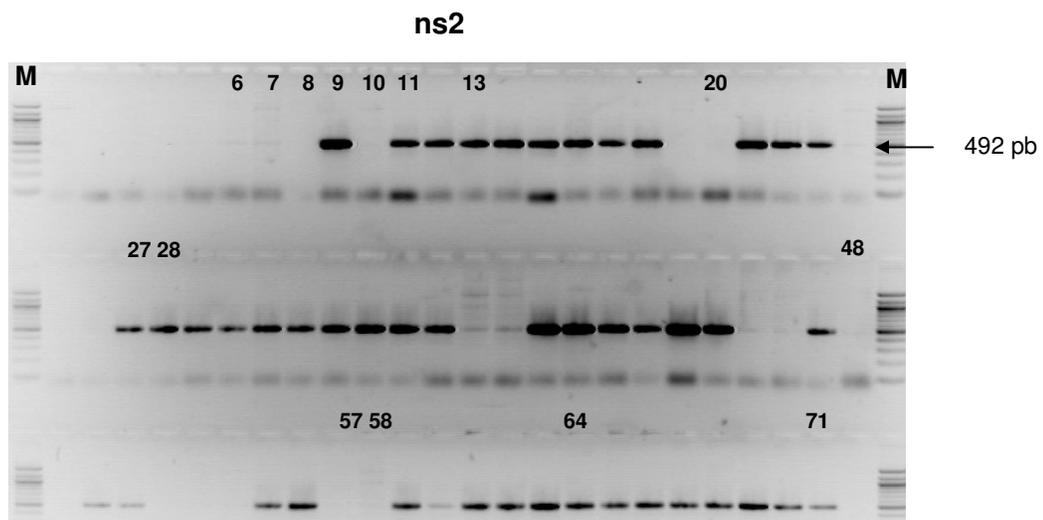


Fig. 6.4. Gel de agarosa donde se muestran los mismos 72 individuos de la población BC1 que en la fig. 6.3, amplificados con el marcador *ns2*. La banda amplificada es de 492 pb y está ligada al alelo susceptible, y por tanto, presente en los individuos heterocigotos susceptibles (*Nsv/nsv*) y en los individuos resistentes (*nsv/nsv*) recombinantes entre *ns1* y *ns2*. Los individuos recombinantes entre *ns1* y *ns2* se indican con el número del individuo. M: marcador peso molecular 100pb DNA ladder.

6.2.4. Cribado de la genoteca de BACs del parental WMR-29 e identificación de BACs positivos para los marcadores

La genoteca de BACs del parental susceptible WMR-29 (URGV-INRA, Evry) fue cribada con algunos marcadores moleculares desarrollados a partir de extremos de BACs de la genoteca de la línea resistente PIT92. Concretamente con los marcadores descritos en el capítulo anterior: 5B3sp6, 30L11sp6 y 5A6sp6, y por otros marcadores que no fueron cartografiados en la población F₂, pero que corresponden a otros extremos de BACs secuenciados (van Leeuwen, comunicación personal), denominados 20E15U, 10O16sp6, 9N8U y 10O16U (**Fig. 5.15**). Las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR de estos marcadores se detallan en el apéndice **A.6.1**.

En primer lugar, identificamos los “pools” de ADN positivos para cada marcador de la tabla 6.1 mediante amplificación de PCR sobre los 86 “pools”, en los que se organiza esta genoteca (que correspondían a cada una de las placas de 384 clones). Del total de “pools” positivos para cada marcador, seleccionamos 7 para identificar los BACs individuales. Los “pools” PWMR-1, 4, 31, 48 y 69 se seleccionaron como clones más cercanos al gen *nsv* y los “pools” PWMR-49 y 74 como controles negativos, ya que no amplificaban los marcadores más cercanos al gen, sino marcadores cercanos a 5A6sp6 (**Tabla 6.1**). La fig. 3.6 muestra un ejemplo del cribado de la genoteca WMR-29 con el marcador 30L11sp6.

Los clones positivos individuales para los marcadores fueron aislados de las placas y amplificados de nuevo con los marcadores anteriores para confirmar su posición respecto al mapa del capítulo 5 (**Tabla 6.1**).

marcador Clon	5B3sp6	20E15U	10O16sp6	30L11sp6	9N8U	10O16U	5A6sp6
1-21-10	+	+	+				
4-6-8		+	+				
31-19-12	+	+	+				
48-13-5	+	+	+	+			
49-17-1				+	+	+	+
69-20-10		+	+	+			
74-24-7				+	+	+	+

Tabla 6.1. Clones aislados de la genoteca de BACs WMR-29. +: indica amplificación del marcador. Los marcadores están ordenados respecto a la fig. 5.15 y se alejan del gen *nsv* de izquierda a derecha.

El clon 1-21-10 fue seleccionado para clonar sus extremos, por ser uno de los BACs más cercanos al gen. Este BAC era amplificado por el marcador 5B3sp6, el más cercano al gen en ese momento, según la población F_2 , y no lo era con el marcador 30L11sp6 (**Tabla 6.1**), lo que hacía pensar que uno de sus extremos se localizaría aún más cerca del gen *nsv*. El desarrollo de marcadores a partir de los extremos del BAC 1-21-10 (1L3 y 1R3) descrito en el capítulo 5 (sección 5.2.4.5), permitió orientar el BAC, siendo el extremo 1L3 el más cercano al gen, tal como se muestra en la fig. 5.13.

Al igual que el BAC 1-21-10, el 31-19-12 era amplificado por los tres marcadores más cercanos al gen (**Tabla 6.1**), pero problemas en la secuenciación de sus extremos impidieron que éstos fueran cartografiados y por tanto, nos limitamos a trabajar únicamente con el BAC 1-21-10.

6.2.5. Mapa físico y genético desarrollado en la población BC1

Los marcadores cartografiados en el mapa genético de la población BC1 fueron inicialmente los marcadores específicos de alelo: ns1 se localizada a 115 recombinantes del gen *nsv* y ns2 a 72 recombinantes. Además, mientras realizábamos el cribado de la genoteca WMR-29 con los marcadores que disponíamos, uno de ellos, el marcador 10O16sp6, que no había sido polimórfico en la población F_2 (PI x PS), presentó un polimorfismo entre las líneas parentales del BC1 (Ved y PI). La comparación de las secuencias de este marcador entre las dos líneas, reveló un polimorfismo detectado mediante digestión con el enzima de restricción *HaeIII*, sobre el producto de amplificación de la línea susceptible Ved. La banda amplificada con los cebadores de éste marcador (10O16sp6-F/10O16sp6-R) era de 423 pb y la digestión con dicho enzima generó dos bandas de 273 y 150 pb en la línea susceptible Ved, mientras que en PI se observó la banda sin digerir (**Fig. 6.5**). Este marcador se cartografió en los individuos recombinantes entre el gen *nsv* y el marcador ns2, a 13 recombinantes del gen. Por tanto, el marcador 10O16sp6 era el más cercano al gen en esta población, situado en el mismo lado que el marcador ns2 (**Fig. 6.7**). Las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR de este marcador se detallan en el apéndice **A.6.1**.

Al igual que en el mapa genético de la población F_2 , el marcador 52K20sp6 fue cartografiado en el mapa genético de la población BC1 mediante la técnica del SNaPshot (Applied Biosystems) (sección 3.11.7), y en este caso tampoco se observaron individuos recombinantes entre este marcador y el gen *nsv*. El SNP entre PI y Ved correspondía a un cambio de una G por una A. El marcador 52K20sp6 también cosegregaba con el gen *nsv* en la población BC1 (**Fig. 6.7**).

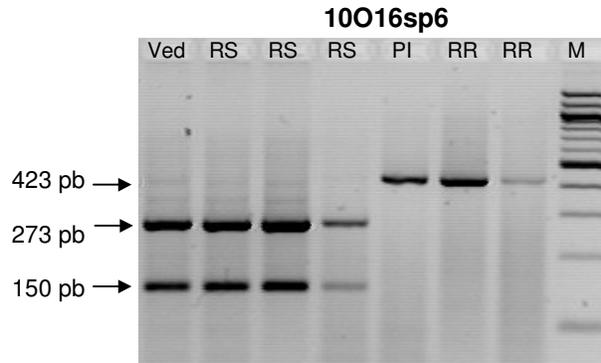


Fig. 6.5. Marcador 10O16sp6 en gel de agarosa. Tras la digestión con el enzima de restricción *HaeIII*, tanto la línea susceptible Ved, como las líneas RILs susceptibles (RS) presentan las bandas de 273 pb y 150 pb, mientras que en la línea resistente PI y en las RILs resistentes (RR) no se observa digestión de la banda original de 423 pb. PI: PI 161375, Ved: Vendrantais, RR: RIL resistente, RS: RIL susceptible, M: marcador peso molecular 100pb DNA ladder.

El marcador 1L3, que había sido desarrollado a partir del extremo L del BAC 1-21-10, fue también cartografiado en la población BC1. Un polimorfismo entre las secuencias de PI y Ved, detectado mediante digestión con el enzima de restricción *HinfI*, permitió cartografiar el marcador. Se diseñó un nuevo cebador, 1L3-*HinfI*-R, en la secuencia del extremo de este BAC, para amplificar el marcador 1L3 en la población BC1. La banda original amplificada con los cebadores 1L3-F y 1L3-*HinfI*-R era de 270 pb y tras la digestión se observaban dos bandas, una de 250 pb y otra de 20 pb en Ved (**Fig. 6.6**). Así pues, el marcador 1L3 fue mapeado a 7 recombinantes del gen *nsv*, y en este caso, en el lado del marcador ns1 (**Fig. 6.7**). Esto confirmaba que el BAC 1-21-10 contenía físicamente el gen de resistencia *nsv*, igual que ocurría en la población F₂. En la fig. 6.7 se detalla el mapa genético y físico en la población BC1. Las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR del marcador 1L3 se detallan en el apéndice **A.6.1**.

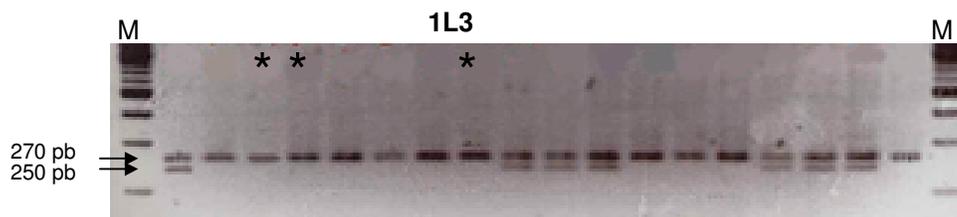


Fig. 6.6. Marcador 1L3 tras la digestión con *HinfI* en algunos individuos de la población BC1. Los individuos resistentes (*nsv/nsv*) presentan una banda sin digerir de 270 pb, los susceptibles (*Nsv/nsv*) presentan ambas bandas, la digerida de 250 pb y la no digerida de 270 pb. La banda de 20 pb no es visible en el gel. *: indica algunos de los individuos recombinantes entre 1L3 y gen *nsv*. M: marcador de peso molecular 100pb DNA ladder.

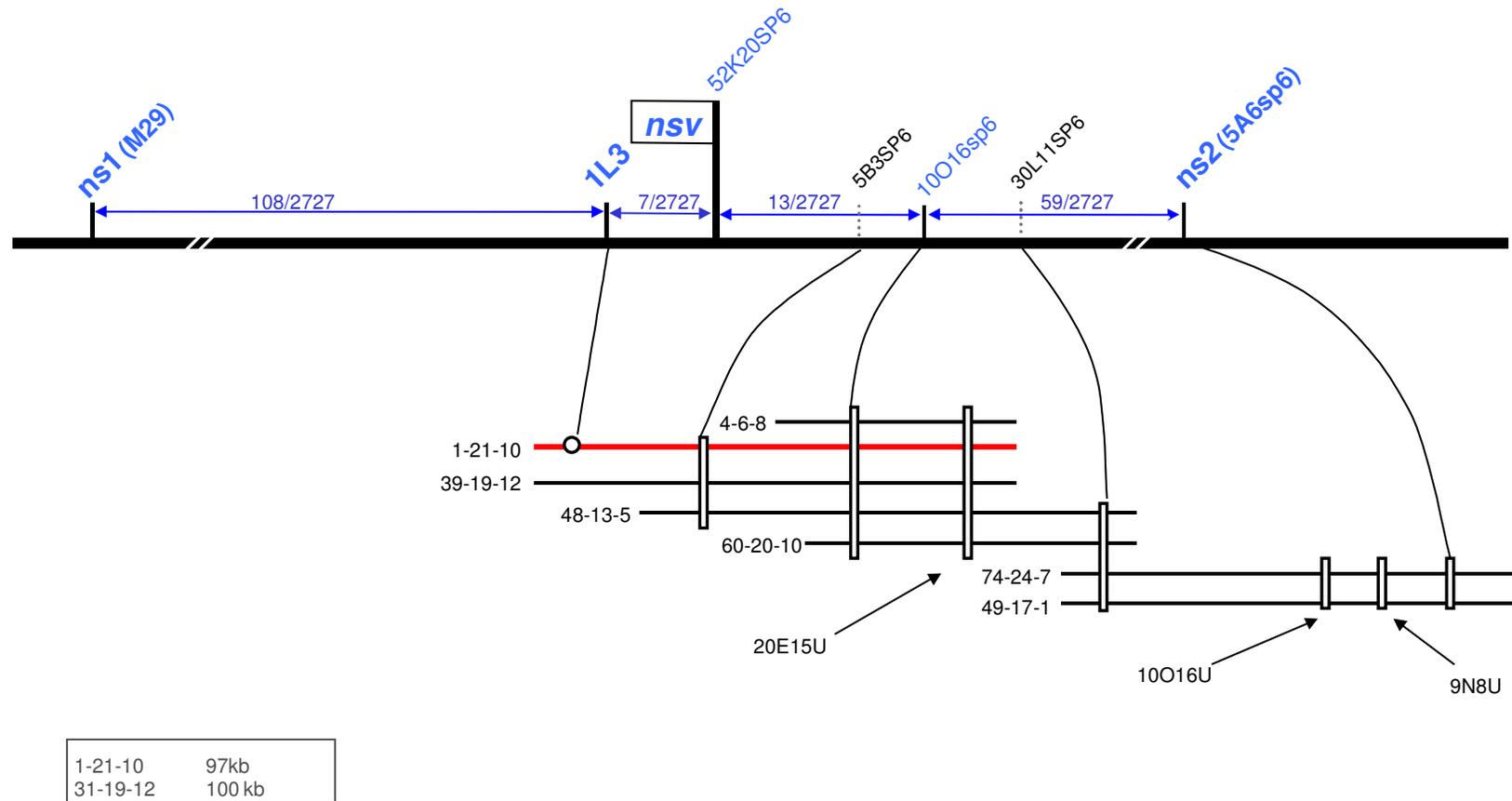


Fig. 6.7. Mapa genético de alta resolución y mapa físico de la región del gen *nsv* en el grupo 11 de ligamiento de *Cucumis melo* L., generado en la población BC1 de 2727 individuos. Las distancias genéticas están expresadas como eventos de recombinación entre los marcadores y el gen *nsv*. Los marcadores moleculares en color azul están cartografiados en la población BC1 y los de color negro están localizados respecto a la población F₂, pero no fueron cartografiados en la población BC1. El marcador 52K20sp6 cosegrega con el gen *nsv*. Los marcadores 1L3 y 10016sp6 flanquean al gen a 7 y 13 recombinantes respectivamente. Los BACs identificados pertenecen a la genoteca de la línea susceptible de melón WMR-29. El BAC 1-21-10 (barra roja) contiene físicamente el gen *nsv*. Las líneas verticales que unen los BACs indican que existe amplificación entre ellos y el correspondiente marcador. Las líneas blancas diagonales, dibujadas sobre el eje del mapa genético, indican que la distancia representada no es proporcional. En el recuadro de la derecha se muestran los tamaños de los BACs 1-21-10 y 31-19-12, obtenidos mediante PFGE.

La comparación de los dos mapas genéticos obtenidos a partir de las poblaciones F_2 y BC1 en dos poblaciones diferentes (**Fig. 6.8**), nos muestra que existen diferencias en las distancias genéticas entre los marcadores. En general, en la población BC1 las distancias han aumentado respecto a la F_2 , excepto en el intervalo entre el marcador 1L3 y el gen *nsv* donde la distancia es la misma, 0.25 cM.

Fig. 6.8. Comparación de los mapas genéticos de la región *nsv* en las poblaciones F_2 y BC1. En color rojo se muestran los marcadores comunes entre ambas poblaciones. Las distancias entre los marcadores se indican en cM (% de recombinación) (en pág. siguiente)

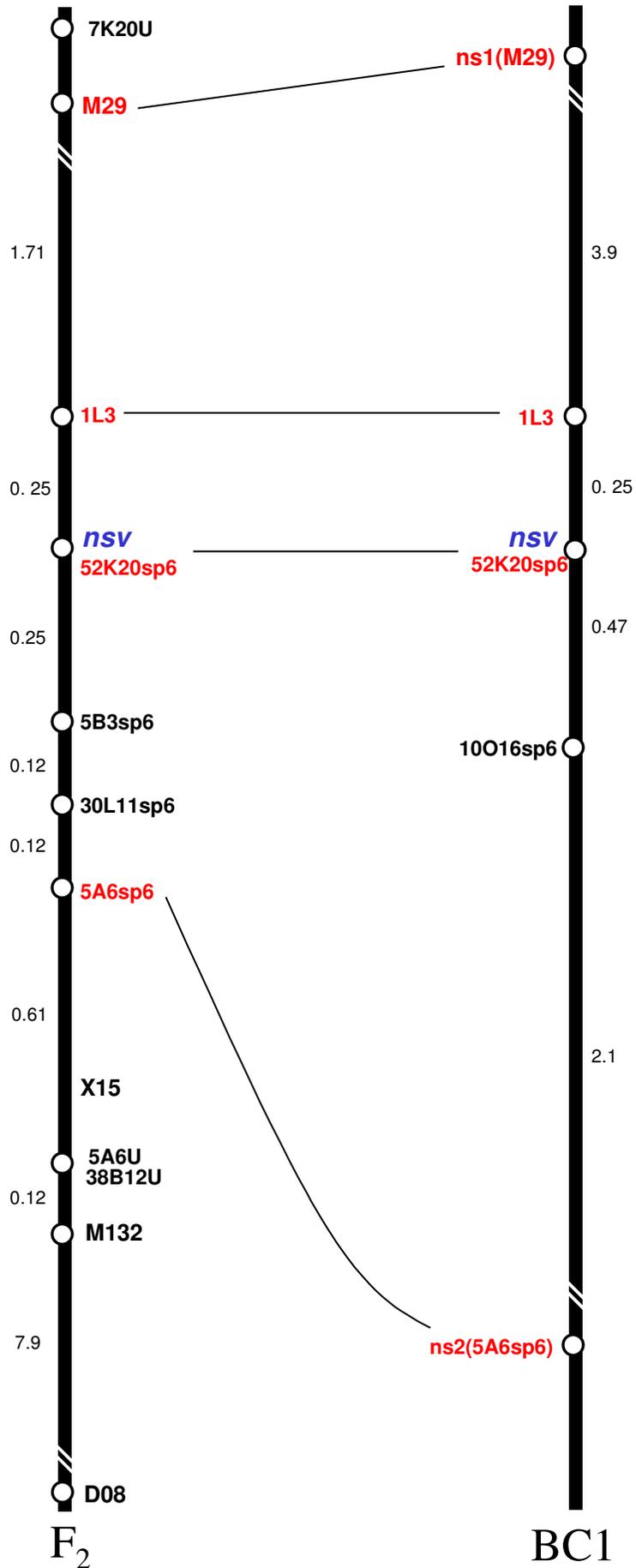


Fig. 6.8. Pie de figura en página anterior

6.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se ha descrito la construcción de un mapa genético de alta resolución en una población BC1 [(Ved x PI) x PI] de 2727 individuos y un mapa físico de la región del gen *nsv* utilizando una genoteca de BACs de la línea susceptible WMR-29. La resolución del mapa genético aumentó considerablemente respecto al elaborado en la población F₂ (0.12 %), obteniendo un valor de 0.036 %.

El orden de los marcadores moleculares en los mapas genéticos obtenidos en las poblaciones F₂ y BC1 se conserva totalmente, como puede observarse en la fig. 6.8, a pesar de haber sido obtenidos en dos poblaciones independientes y con una de las líneas parentales distinta. Esto indica la consistencia de dicho mapa genético. A pesar del aumento de la resolución del mapa genético de la población BC1, el nivel de información obtenido ha sido el mismo que en la población F₂: en ambos mapas genéticos se ha identificado el BAC 1-21-10 que contiene físicamente al gen *nsv*; se ha cartografiado el extremo 1L3 del BAC separado genéticamente del mismo, a 2 y 7 recombinantes en las poblaciones F₂ y BC1, respectivamente (**Fig. 5.15, Fig. 6.7**); y por último, el marcador 52K20sp6 cosegrega con el gen de resistencia. Además, en la población BC1 se ha identificado un nuevo marcador, 10O6sp6, localizado a 13 recombinantes del gen, que no había resultado ser polimórfico en la población F₂. No obstante, la mayor resolución de mapa del BC1 nos permitiría la identificación del ORF correcto, si tras la secuenciación completa del BAC 1-21-10 se identificara más de un posible gen candidato para *nsv*, gracias a que entre los marcadores flanqueantes 1L3 y 10O6sp6 se han identificado 20 recombinantes. Además, el número de gametos teórico necesario para identificar el gen diana mediante la técnica del clonaje posición con una probabilidad del 0.9889 es de 2000, si consideramos un intervalo genético de 100 Kb y una relación de 228 Kb/cM (Durrett y col., 2002). El número de gametos en la población F₂ ascendía a 816 gametos. Por tanto, la construcción de mapa genético de alta resolución en la población BC1 queda totalmente justificada.

La comparación de los dos mapas genéticos nos muestra la existencia de diferencias en las distancias genéticas estimadas entre algunos de los marcadores. Por ejemplo, el intervalo entre los marcadores M29/1L3 varía de 1.71 a 3.9 cM en las poblaciones F₂ y BC1, respectivamente, y el intervalo entre los marcadores 52K20sp6/5A6sp6 varía de 0.5 a 2.6 cM, siempre se observa un aumento de las distancias estimadas en la población BC1. Por el contrario, la distancia del marcador 1L3 al gen *nsv* se mantiene constante en ambas poblaciones con un valor de 0.25 cM. Estas diferencias en las distancias pueden ser debidas a variaciones de frecuencia de recombinación existentes entre ambas poblaciones e incluso entre regiones de un

mismo locus, como se ha descrito también en la región del gen *Fom-2* del cromosoma 5 de melón (Joobeur y col., 2004).

Respecto a los tipos de poblaciones que hemos utilizado para generar los dos mapas genéticos, podemos afirmar que un tipo de población BC1 es una población más adecuada que una población F_2 para este tipo de trabajo. Una población BC1 permite realizar el test de resistencia al virus directamente sobre los individuos de la población, sin necesidad de realizar el test de progenie como ocurre en la F_2 para cartografiar el gen *nsv*. La utilización de una población BC1 supone un importante ahorro en el trabajo de campo, como por ejemplo en la autofecundación de los individuos de la población F_2 , la siembra de las semillas F_3 o la inoculación con el virus en las familias F_2 .

Los marcadores específicos de alelo, utilizados en la población BC1, han sido de gran utilidad, por que permiten genotipar la población de una manera rápida y económica con una única reacción de PCR, sin necesidad de realizar digestiones con enzimas de restricción, necesarias en los marcadores CAPS.

Cabe remarcar que el desarrollo de dos mapas genéticos y físicos generados en dos poblaciones diferentes, una F_2 y un BC1, nos confirma el hecho de que el clon BAC 1-21-10 contiene físicamente a *nsv*.

7. Análisis de microsintenia y clonaje de un gen candidato para *nsv*

7. ANÁLISIS DE MICROSINTENIA Y CLONAJE DE UN GEN CANDIDATO PARA *nsv*

7.1. INTRODUCCIÓN

Una vez identificado el clon BAC que contenía físicamente el gen *nsv*, el siguiente paso a seguir es la secuenciación completa de este BAC y la identificación del gen candidato para *nsv* mediante programas de predicción de genes. Pero antes de iniciar la secuenciación del BAC de unos 100 Kb de longitud, un trabajo tedioso y caro, nos fijamos detalladamente en las secuencias de los extremos de los BACs del "contig" que habían sido secuenciados. Se buscaron homologías mediante BLASTX en las bases de secuencias de *Arabidopsis* y se identificó una región de *Arabidopsis* donde las secuencias de los extremos de algunos de los BACs de melón presentaban homología. El análisis de los BACs de *Arabidopsis* que pertenecían a esta región permitió identificar un gen candidato para *nsv*. Así pues, gracias a la microsintenia existente entre las dos especies en esta región del genoma, la identificación de un gen candidato se realizó de forma más rápida y económica.

A partir de aquí, se procedió al clonaje del gen candidato de melón mediante el uso de una aproximación con cebadores degenerados, lo que nos permitió obtener un fragmento de la secuencia del gen. A partir de este fragmento, se obtuvo el ADNc completo, imprescindible para proceder a la complementación genética, último paso que confirmaría que el gen candidato es realmente el gen de resistencia *nsv*.

7.2. RESULTADOS

7.2.1. Análisis de microsintenia con *Arabidopsis thaliana* e identificación de un gen candidato para el gen *nsv*

Las secuencias de los extremos de los BACs del "contig" de la **tabla 7.1** fueron analizadas mediante BLASTX y TBLASTX en una base de datos que contiene el genoma de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org). Algunas de estas secuencias (sombreadas en la tabla 7.1) presentaban homología con valor significativo con una región del cromosoma 4 de *Arabidopsis*, concretamente la región comprendida entre las posiciones At4g17600 y At4g19650, poniendo de manifiesto la existencia de microsintenia entre ambas especies en esta región del genoma (**Fig. 7.1**). Si bien existía homología significativa con 4 de los extremos de BACs, el resto de secuencias

también presentaba cierta homología en la misma región, pero con un valor E menos significativo (**Tabla 7.1**).

extremos	homología con <i>Arabidopsis</i>	valor E	posición	Análisis	BACs
38B12U	proteína hipotética	0.56	At4g18980	TBLASTX	F13C5
38B12SP6	proteína putativa	0.38	At4g18220	TBLASTX	T9A21
41I23U	ns				
41I23SP6	proteína no conocida	8,00E-14	At4g18260	BLASTX	T9A21
5A6U	eIF4E	0.14	At4g18040	TBLASTX	F15J5
5A6SP6	ns				
30L11U	retroelemento				
30L11SP6	ns				
7K20U	proteína putativa	8,00E-12	At4g18810	TBLASTX	F28A21
7K20SP6	proteína LRR	7,00E-04	At4g20140	TBLASTX	F1C12
34H17U	proteína resistencia enfermedad	1.4	At4g19510	TBLASTX	F24J7
34H17SP6	proteína putativa	0.28	At4g19650	TBLASTX	T16H5
5B3U	familia 17 hidrolasa glicosil	0.39	At4g18340	TBLASTX	T9A21
5B3SP6	transposon				
9N8U	proteína putativa	0.15	At4g17910	TBLASTX	T6K21
9N8SP6	proteína Lil3	1.0	At4g17600	TBLASTX	FCAAL
1L3	sintasa trealosa-6-fosfato	2,00E-06	At4g17770	BLASTX	FCAAL
1R3	proteína ribosomal L32	3,00E-47	At4g18100	BLASTX	F15J5
52K20bD	ns				
52K20bSP6	ns				
59I22bD	ns				
59I22bSP6	ns				
20F8bD	ns				
20F8bsp6	ns				

Tabla 7.1. La tabla muestra la mejor homología con *Arabidopsis* de las secuencias de los extremos de los BACs de melón de la región del gen *nsv*. Algunos de estos extremos de BACs del "contig" de la fig. 5.15 presentan homología con genes de *Arabidopsis*, en una región del cromosoma 4. En sombreado, se indican las homologías más significativas. ns: valor no significativo.

Los genes predichos en los BACs de *Arabidopsis* que abarcaban esta región, fueron analizados uno a uno buscando posibles genes candidatos para *nsv*. La secuencia del extremo 1R3 del BAC 1-21-10 presentaba homología con uno de los valores más elevados (valor E = 3.00×10^{-47}), con una región del BAC F15J5 de *Arabidopsis*. La anotación de genes de este BAC reveló en la posición 18040 el factor de iniciación de la transcripción 4E de eucariotas (eIF4E) (**Tabla 7.2**). Este factor ha sido descrito como el responsable del gen de resistencia natural frente al virus Y de la patata (PVY) en pimiento (*pvr2*) (Ruffel y col., 2002), frente al virus del mosaico de la lechuga (LMV) en lechuga (*mo1*) (Nicaise y col., 2003), y frente al virus del mosaico de la semilla del guisante (PsBMV) en guisante (*sbm1*) (Gao y col., 2004) y por ello, fue considerado como un gen candidato para *nsv*.

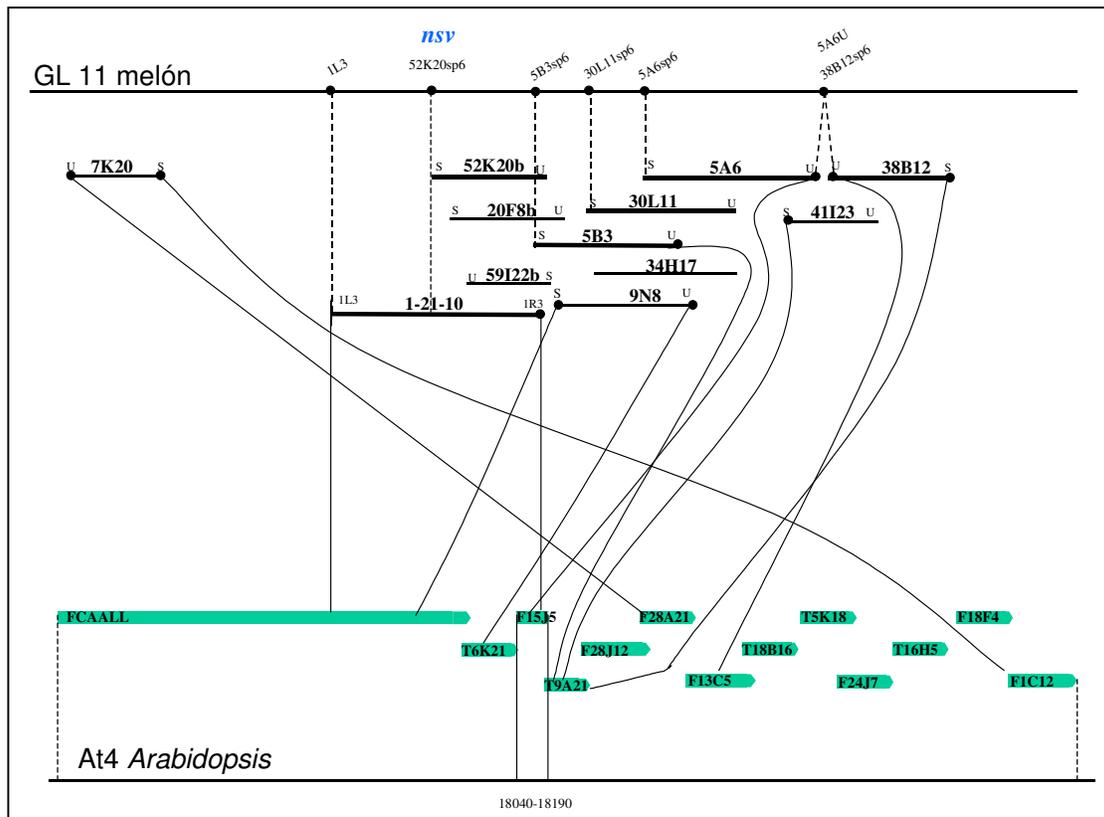


Fig. 7.1. La figura muestra la microsintenia existente entre melón y *Arabidopsis* en esta región. La parte superior de la figura representa el grupo de ligamiento 11 de melón y su correspondiente mapa físico generado en la población F₂. Se indican algunos de los marcadores cartografiados en el mapa genético de la F₂. La parte inferior representa algunos de los BACs (barras color verde) que cubren el grupo de ligamiento 4 (At4) de *Arabidopsis*. Las líneas continuas unen los extremos de los BACs de la genoteca de melón que presentan homología con BACs de *Arabidopsis*. El BAC F15J5 cubre la región del genoma de *Arabidopsis* 18040-18190.

Annotation Unit: F15J5																																			
Date last modified	2001-02-09																																		
Name	F15J5																																		
Clone	vector type insert type clone name BAC genomic F15J5																																		
TAIR Accession	AssemblyUnit:3601.426																																		
Chromosome	4																																		
Neighboring Annotation Unit	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Right Annotation</th> <th>Right Annotation Overlap</th> <th>Left Annotation</th> <th>Left Annotation Overlap</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>T9A21</td> <td>10448 bp</td> <td>T6K21</td> <td>2548 bp</td> </tr> </tbody> </table> <p>Note Sequences from neighboring clones may have been added to this clone by AGI to facilitate annotation of genes near the clone ends; changing the length and overlap sizes. The GenBank size is shown in the Alternate Size field.</p>	Right Annotation	Right Annotation Overlap	Left Annotation	Left Annotation Overlap	T9A21	10448 bp	T6K21	2548 bp																										
Right Annotation	Right Annotation Overlap	Left Annotation	Left Annotation Overlap																																
T9A21	10448 bp	T6K21	2548 bp																																
Map Locations	<table border="1"> <thead> <tr> <th>chrom</th> <th>map</th> <th>map type</th> <th>coordinates</th> <th>orientation</th> <th>attrib</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>AGI</td> <td>nuc_sequence</td> <td>8978135 - 9036559 bp</td> <td>forward</td> <td>details</td> </tr> </tbody> </table>	chrom	map	map type	coordinates	orientation	attrib	4	AGI	nuc_sequence	8978135 - 9036559 bp	forward	details																						
chrom	map	map type	coordinates	orientation	attrib																														
4	AGI	nuc_sequence	8978135 - 9036559 bp	forward	details																														
Map Links	Map Viewer Sequence Viewer																																		
Other Information	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Sequence_status</th> <th>Length</th> <th>Orientation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>annotated GenBank release</td> <td>58425.0 bp</td> <td>F</td> </tr> </tbody> </table>	Sequence_status	Length	Orientation	annotated GenBank release	58425.0 bp	F																												
Sequence_status	Length	Orientation																																	
annotated GenBank release	58425.0 bp	F																																	
Sequence	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Bio Source</th> <th>Source</th> <th>Date</th> <th>GenBank Accession</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>genomic</td> <td>AGI-TIGR</td> <td>2001-04-10</td> <td></td> <td>genomic</td> </tr> </tbody> </table>	Bio Source	Source	Date	GenBank Accession	Sequence	genomic	AGI-TIGR	2001-04-10		genomic																								
Bio Source	Source	Date	GenBank Accession	Sequence																															
genomic	AGI-TIGR	2001-04-10		genomic																															
Gene Features	<table border="1"> <thead> <tr> <th>gene name</th> <th>description</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AT4G18040.1</td> <td>translation initiation factor eIF4E</td> </tr> <tr> <td>AT4G18050.1</td> <td>multidrug resistance Pglycoprotein, putative</td> </tr> <tr> <td>AT4G18060.1</td> <td>putative protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18070.1</td> <td>putative protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18080.1</td> <td>hypothetical protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18090.1</td> <td>hypothetical protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18100.1</td> <td>ribosomal protein L3like protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18110.1</td> <td>hypothetical protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18120.1</td> <td>Meiosis protein mei2related</td> </tr> <tr> <td>AT4G18130.1</td> <td>phytochrome E</td> </tr> <tr> <td>AT4G18140.1</td> <td>putative protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18150.1</td> <td>hypothetical protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18160.1</td> <td>potassium channellike protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18170.1</td> <td>DNA bindinglike protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18180.1</td> <td>polygalacturonaslike protein</td> </tr> <tr> <td>AT4G18190.1</td> <td>putative protein</td> </tr> </tbody> </table>	gene name	description	AT4G18040.1	translation initiation factor eIF4E	AT4G18050.1	multidrug resistance Pglycoprotein, putative	AT4G18060.1	putative protein	AT4G18070.1	putative protein	AT4G18080.1	hypothetical protein	AT4G18090.1	hypothetical protein	AT4G18100.1	ribosomal protein L3like protein	AT4G18110.1	hypothetical protein	AT4G18120.1	Meiosis protein mei2related	AT4G18130.1	phytochrome E	AT4G18140.1	putative protein	AT4G18150.1	hypothetical protein	AT4G18160.1	potassium channellike protein	AT4G18170.1	DNA bindinglike protein	AT4G18180.1	polygalacturonaslike protein	AT4G18190.1	putative protein
gene name	description																																		
AT4G18040.1	translation initiation factor eIF4E																																		
AT4G18050.1	multidrug resistance Pglycoprotein, putative																																		
AT4G18060.1	putative protein																																		
AT4G18070.1	putative protein																																		
AT4G18080.1	hypothetical protein																																		
AT4G18090.1	hypothetical protein																																		
AT4G18100.1	ribosomal protein L3like protein																																		
AT4G18110.1	hypothetical protein																																		
AT4G18120.1	Meiosis protein mei2related																																		
AT4G18130.1	phytochrome E																																		
AT4G18140.1	putative protein																																		
AT4G18150.1	hypothetical protein																																		
AT4G18160.1	potassium channellike protein																																		
AT4G18170.1	DNA bindinglike protein																																		
AT4G18180.1	polygalacturonaslike protein																																		
AT4G18190.1	putative protein																																		
Other Map Features	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Type</th> <th>Number Associated</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EST</td> <td>(24)</td> </tr> <tr> <td>genetic marker</td> <td>(1)</td> </tr> <tr> <td>clone</td> <td>(16)</td> </tr> </tbody> </table>	Type	Number Associated	EST	(24)	genetic marker	(1)	clone	(16)																										
Type	Number Associated																																		
EST	(24)																																		
genetic marker	(1)																																		
clone	(16)																																		
Comments	(shows only the most recent comments by)																																		

Tabla 7.2. Anotación del BAC F15J5 del genoma de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org). La posición At4g18040 muestra el factor de iniciación de la transcripción en eucariotas eIF4E (enmarcado en rojo), posible candidato para el gen *nsv* de melón.

7.2.2. Clonaje del eIF4E de melón

El clonaje del eIF4E de melón fue realizado mediante el uso de una aproximación con cebadores degenerados diseñados sobre la secuencia proteica de eIF4E de varias especies vegetales.

7.2.2.1. Diseño de los cebadores degenerados

En primer lugar, diseñamos los cebadores degenerados a partir de la secuencia proteica del eIF4E de especies dicotiledóneas como *Capsicum annum*, *Lycopersicon esculentum* y *Arabidopsis thaliana*. Los cebadores eIF4E-dF y eIF4E-dR fueron diseñados a partir de dos regiones conservadas entre las 3 especies vegetales (Fig. 7.2).

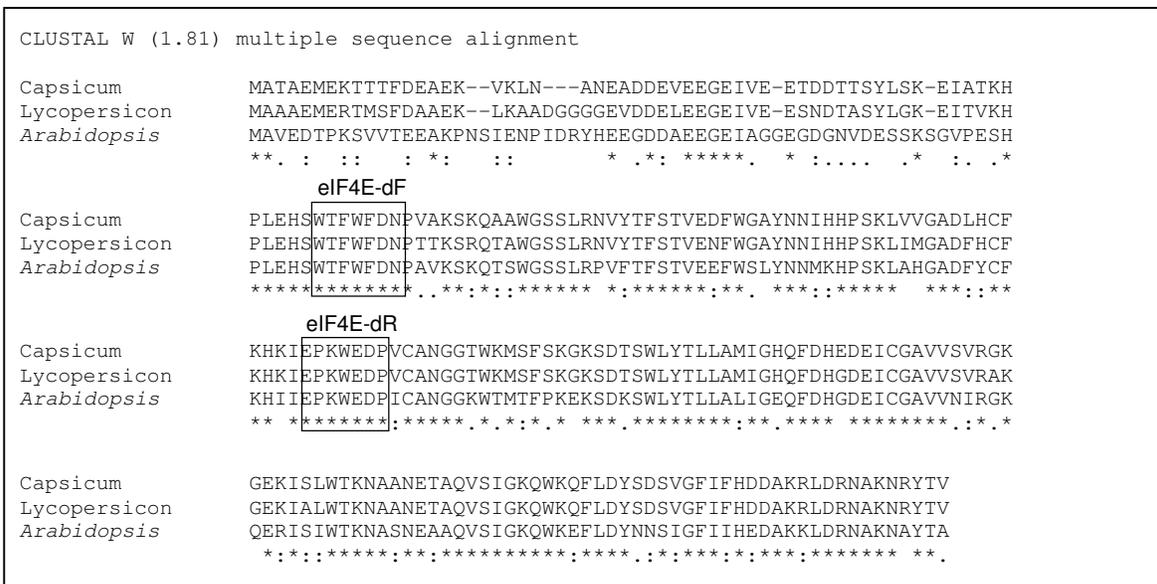


Fig. 7.2. Alineamiento de la secuencias del eIF4E de *Capsicum annum* (AY122052), *Lycopersicon esculentum* (AF259801) y *Arabidopsis thaliana* (AY093750), mediante el programa Clustal W. Los recuadros indican las regiones conservadas entre las 3 especies que fueron escogidas para diseñar los cebadores degenerados (eIF4E-dF y eIF4E-dR).

Estos cebadores son degenerados por que se han diseñado a partir de una secuencia proteica, y un mismo aminoácido puede ser codificado por varios codones diferentes, que varían principalmente en la tercera base del codón. El diseño y la secuencia de los cebadores degenerados eIF4E-dF y eIF4E-dR se detalla en el apéndice B.1.

7.2.2.2. Amplificación con cebadores degenerados en ADN de melón

La amplificación con los cebadores degenerados eIF4E-dF y eIF4E-dR sobre el ADN de los parentales PI y PS y de los BACs identificados en el mapa físico de la región, generó una banda de 1.9 Kb de gran intensidad en el BAC 52K20, y de menor

intensidad en PI y PS. También observamos una banda tenue de 520 pb presente en todos los BACs, excepto en el BAC 52K20, y también en el control negativo (lo que nos indicaba que existía contaminación). Además, esta misma banda de 520 pb, pero de intensidad mayor estaba también presente en las líneas parentales (**Fig. 7.3**). Los dos productos de PCR, de tamaños de 520 pb y 1.9 Kb, fueron clonados a partir de las dos líneas parentales, y secuenciados. El análisis con BLASTX mostró que la banda amplificada de 1.9 Kb presentaba homología con eIF4E de arroz con un valor 3×10^{-12} y la banda de 520 pb con la forma iso del mismo gen (eIF(iso)4E). Así pues, el factor eIF4E de melón correspondió con el producto de PCR de tamaño 1.9 Kb amplificado con los cebadores degenerados eIF4E-dF y eIF4E-dR. Las condiciones de PCR utilizadas se detallan en el apéndice **B.2**.

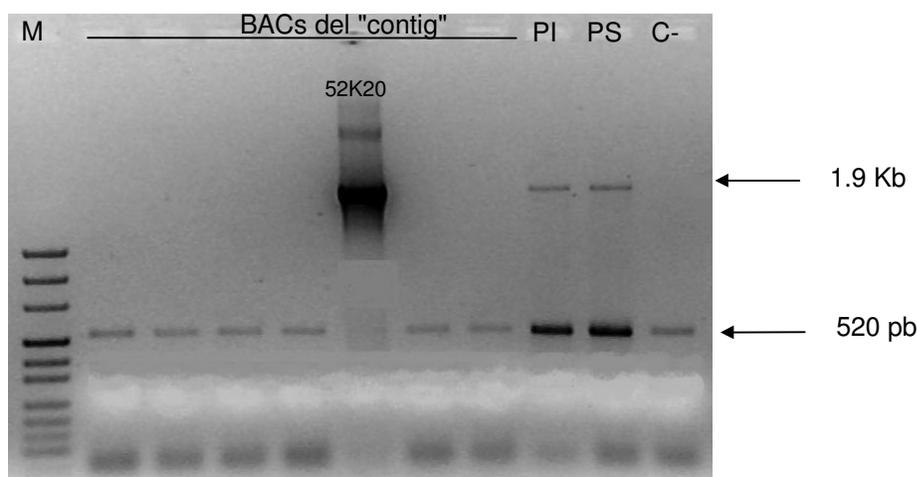


Fig. 7.3. Gel de agarosa donde se muestra la amplificación con los cebadores degenerados eIF4E-dF y eIF4E-dR. Las líneas parentales PI y PS y el BAC 52K20 presentan una banda de 1.9 Kb, que corresponde con el factor eIF4E de melón. Una banda tenue de 520 pb amplificada con los mismos cebadores correspondió con eIF(iso)4E. M: pUC mix. C-: control negativo.

7.2.2.3. Diseño de cebadores específicos de eIF4E de melón y amplificación sobre ADN genómico

Sobre las secuencias parciales del eIF4E de la línea PI obtenida con los cebadores degenerados, se diseñaron un par de cebadores específicos en una región exónica de la secuencia, melF4E-F y melF4E-R, con los que amplificamos el ADN genómico de PI, PS y de algunos de los BACs que formaban el "contig". La amplificación generó una banda de 1.9 Kb en las líneas parentales y en el BAC 52K20 y otra banda de tamaño sensiblemente mayor en el resto de BACs (**Fig. 7.4**). Esta última banda fue descartada al no corresponder a la amplificación presente en las

líneas parentales. Probablemente, unas condiciones de mayor astringencia en la PCR eliminarían la amplificación de esta banda no específica.

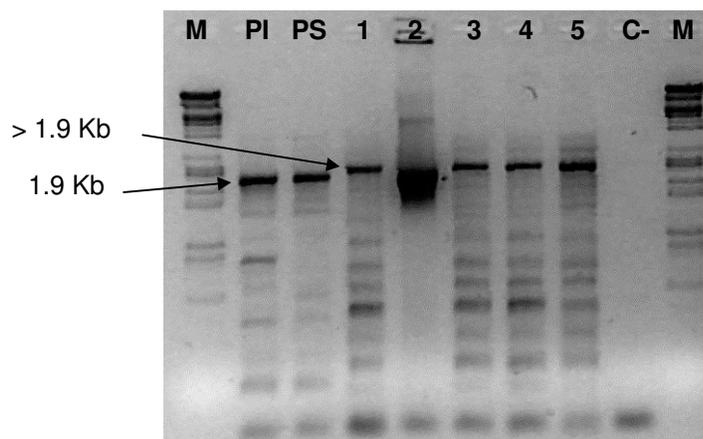


Fig. 7.4. Amplificación con los cebadores específicos de *elF4E* de melón sobre PI, PS y los BACs del "contig". 1: BAC 20F8, 2: BAC 52K20, 3: BAC 59I22, 4: BAC 5B3, 5: BAC 30L11, C-: control negativo, M: marcador de peso molecular λ *HindIII/EcoRI*. Las bandas amplificadas sobre PI, PS y el BAC 52K20 (2) presentan el mismo tamaño, aproximadamente 1.9 Kb. La banda amplificada en el resto de BACs (1, 3, 4 y 5) presenta un tamaño sensiblemente mayor de 1.9 Kb.

7.2.3. Desarrollo de un marcador molecular a partir del *melF4E* y cartografiado de éste en las poblaciones F_2 y BC1

7.2.3.1. Cartografiado de *melF4E* en la población F_2

En la población F_2 , la búsqueda de un polimorfismo que nos permitiera cartografiar el marcador *melF4E* se realizó directamente mediante digestión con varios enzimas de restricción del producto de PCR de las líneas PI y PS. Se digirieron 15 μ l del producto amplificado con los cebadores *melF4E-F* y *melF4E-R* con 5 U de los enzimas de restricción *AluI*, *TaqI*, *DdeI*, *HinfI*, *RsaI* y *Bsp143I*. La digestión con el enzima *RsaI* generó un polimorfismo de tamaño observable en gel de agarosa. Las bandas polimórficas entre PI y PS eran las bandas de 1100 pb y 900 pb respectivamente (**Fig. 7.5**). Gracias a este polimorfismo de restricción, el marcador *melF4E* fue cartografiado en la población F_2 , utilizando únicamente los individuos recombinantes entre los marcadores M132 y M29 (**Fig. 7.5**). No se observó ningún individuo recombinante entre el gen y el marcador *melF4E*. (**Tabla 7.3**). Por tanto, el marcador *melF4E* cosegregaba con el gen *nsv* en la población F_2 de 408 individuos.

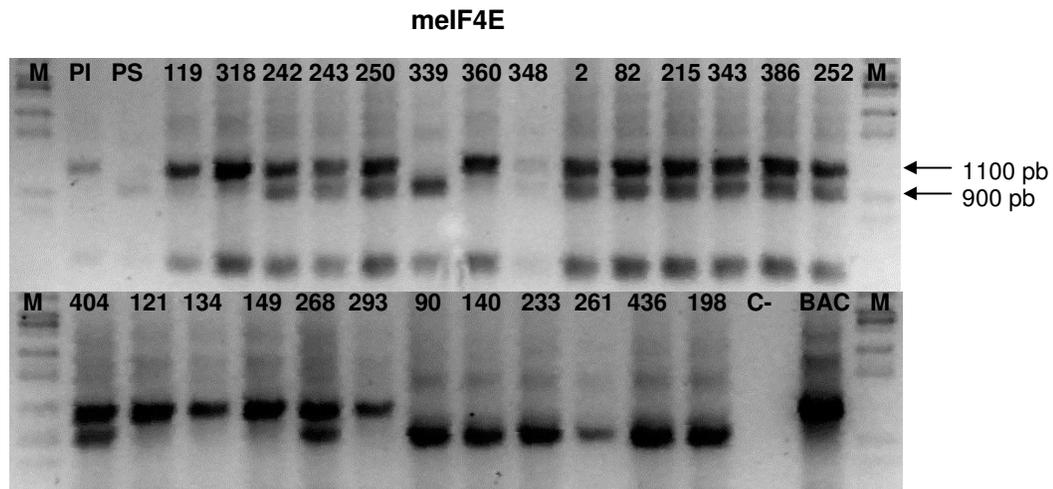


Fig. 7.5. Gel de agarosa que muestra el marcador *melF4E* en individuos de la población F_2 . La digestión con *RsaI* se realizó sobre las líneas parentales y los individuos recombinantes entre los marcadores M29 y M132 de la población F_2 . Tras la digestión, en PI se observa una banda de 1100 pb y en PS una de 900 pb. Los individuos hererocigotos presentan ambas bandas. PI: PI 161375, PS: Piel de Sapo, BAC: BAC 52K20. Los números indican los individuos recombinantes de esta población entre los marcadores M132 y M29 que corresponden con los individuos de la tabla 7.3.. M: marcador peso molecular λ *EcoRI/HindIII*.

Nº PLANTA	7K20U	M 29	1L3	52K20sp6	<i>nsv</i>	<i>melF4E</i>	5B3sp6	30L11sp6	5A6sp6	5A6U-SSR	38B12U	M132
119	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	H
318	A	A	A	A	-	A	A	A	A	H	H	H
242	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B
243	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A
250	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A
339	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H
360	A	A	A	A	-	A	A	A	H	H	H	H
348	H	H		H	-	H	H	B	B	B	B	B
2	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B
268	H	H	H	H	-	H	A	A	A	A	A	A
404	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H
198	A	H	H	B	-	B	B	B	B	B	B	B
82	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
215	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
343	A	A	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H
386	A	A	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H
252	B	B	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H
121	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
134	H	H	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A
149	H	H	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A
293	H	H	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A
90	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
140	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
233	H	H	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B
261	H	H	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B
436	H	H	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B

Tabla 7.3. En la primera columna se indican los individuos recombinantes entre los marcadores 7K20U y M132 de la población F_2 . En verde, se indican los individuos recombinantes utilizados para cartografiar el gen *nsv*, 11 individuos. En la primera fila, se representan todos los marcadores que han sido cartografiados en esta población y en orden respecto al gen *nsv*. Los marcadores *melF4E* y el 52K20 cosegregan con el gen *nsv*: los individuos recombinantes presentan el mismo genotipo que el gen *nsv*. A: genotipo homocigoto resistente como PI, B: genotipo homocigoto susceptible como PS, H: genotipo heterocigoto.

7.2.3.2. Cartografiado del marcador *melF4E* en la población BC1

Los mismos cebadores específicos *melF4E-F* y *melF4E-R*, utilizados en la población F_2 , se usaron para amplificar PI y Ved, los parentales de la población BC1.

El producto de amplificación fue clonado y secuenciado, y el alineamiento de ambas secuencias reveló un polimorfismo que correspondía con un lugar de restricción para el enzima *Mbol*I: la línea PI presentaba una banda 1.4 Kb y otra de 0.5 Kb, mientras que en Ved el tamaño de las bandas tras la digestión era de 1.1 Kb, 0.5 y 0.3 Kb (**Fig. 7.6**).

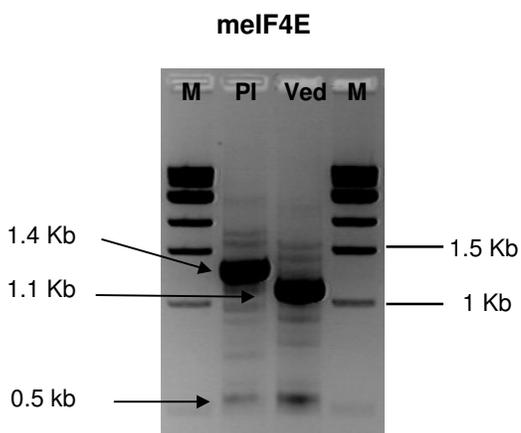


Fig. 7.6. Gel de agarosa que muestra el marcador *melF4E* después de la digestión con *Mbol*I sobre PI y Ved. PI presenta bandas de 1.4 Kb y 0.5 Kb. Ved presenta las bandas de 1.1, 0.5 y 0.3 Kb (esta última no es visible en el gel de agarosa). PI: línea parental resistente PI, Ved: línea parental susceptible, M: marcador peso molecular 1 Kb ladder

Una vez verificado el polimorfismo de la digestión en las líneas parentales, el marcador *melF4E* fue cartografiado en los individuos recombinantes entre los marcadores específicos de alelo *ns1* y *ns2* de la población BC1 (**Fig. 7.7**). Al igual que ocurría en la población F_2 , el marcador *melF4E* cosegregaba con el gen *nsv* en la población BC1.

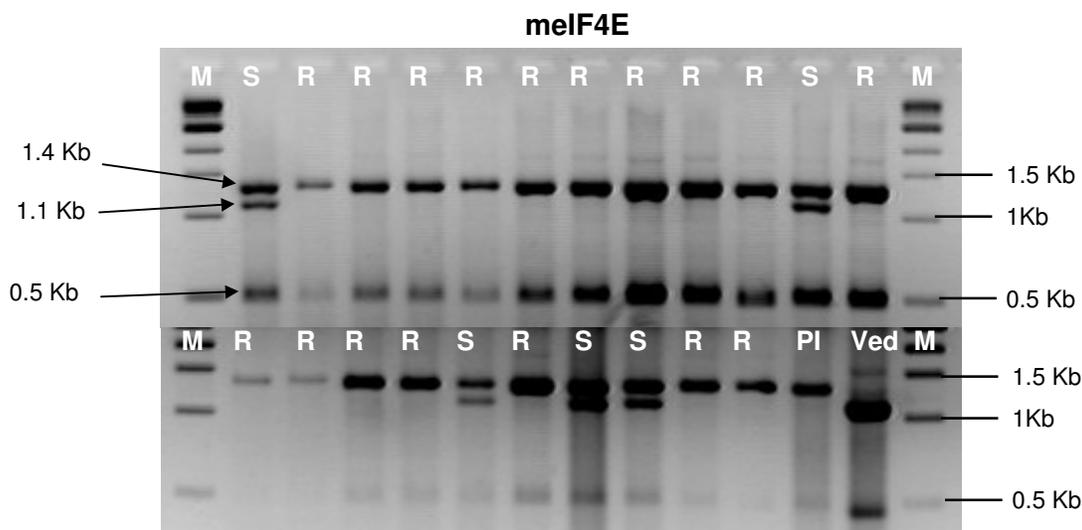


Fig. 7.7. Gel de agarosa que muestra el marcador *melF4E* en algunos de los individuos recombinantes entre *ns1* y *ns2* de la población BC1, después de la digestión con *Mbol*I. Los individuos resistentes (*Nsv/Nsv*) (R) presentan las bandas visibles de 1.4 + 0.5 Kb, mientras que los individuos susceptibles heterocigotos (*Nsv/nsv*) (S) presentan además una banda de 1.1 Kb que es la polimórfica. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder.

Además, cabe remarcar que el marcador melF4E amplificaba también los BACs 52K20 y el BAC 1-21-10 (resultados obtenidos en nuestro laboratorio no incluidos en esta tesis), lo que nos confirmaba que este marcador se localizaba en estos dos BACs, que contienen el gen *nsv*.

7.2.4. Clonaje del ADNc de secuencia completa del eIF4E de melón

El siguiente paso fue obtener el ADNc de secuencia completa del gen candidato eIF4E. Para ello se usó una aproximación mediante RACE-PCR.

7.2.4.1. Extracción y cuantificación del ARN

La extracción del ARN total a partir de hojas frescas (sección 3.6.1) se realizó a partir de las tres líneas parentales, PI, Ved y WMR-29. La visualización en un gel de agarosa al 1% nos mostró una buena calidad del mismo. Además, también observamos que la contaminación con ADN era muy baja (**Fig. 7.8**).

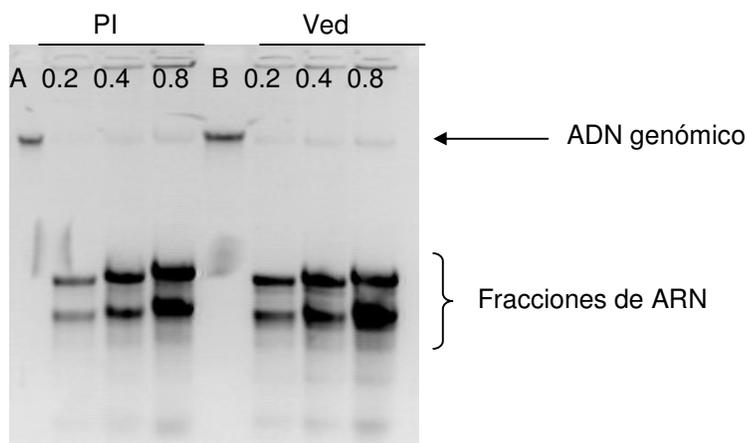


Fig. 7.8. Gel de agarosa al 1% que muestra la calidad del ARN extraído a partir de las líneas PI y Ved. La contaminación con ADN es muy baja, se intuye una banda muy tenue. A: 100 ng, B: 200 ng de ADN del fago λ . Los números 0.2, 0.4, 0.8 indican el volumen (μ l) de ARN cargado en cada pocillo.

Los valores de la densidad óptica a 260 nm (OD_{260}) nos dieron una aproximación de la cantidad del ARN total obtenido. El ARN poliA+, aislado a partir del ARN total, también fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro. Los valores del ARN total obtenidos estaban dentro de los valores esperados (3-4 mg ARN total/extracción), mientras que los valores del ARN poliA+ eran menores que los esperados. Aproximadamente, el 2% del ARN total es ARN poliA+ y en nuestra extracción el valor obtenido fue 4 veces inferior (20 μ g). Esto pudo ser debido a un problema durante el proceso de purificación del ARN poliA+.

7.2.4.2. Diseño de cebadores específicos en la región exónica de la secuencia genómica parcial del eIF4E de melón

La secuencia de PI, obtenida a partir del producto de PCR con los cebadores específicos melF4E-F y melF4E-R, fue utilizada para diseñar 6 pares de cebadores específicos (GSP1 al 6 en las dos direcciones forward y reverse, 3 pares en cada extremo de la secuencia) en una región predicha como parte de un exón de la misma. Estos cebadores fueron utilizados para la amplificación de la RACE-PCR. La secuencia y la orientación de estos cebadores se detalla en el apéndice **B.5**.

7.2.4.3. Obtención del ADNc de secuencia completa del eIF4E

La síntesis del ADNc de las tres líneas parentales PI, Ved y WMR-29 se llevó a cabo con 2 µg de ARN poliA+ en una reacción RT-PCR, tal y como se describe en la sección 3.10.1. La calidad de ADNc obtenido se verificó mediante la amplificación con los cebadores internos GSP2rev y GSP5for que generó una única banda clara e intensa del tamaño esperado (117 pb) (**Fig. 7.9.B**), lo que indicaba que el ADNc no estaba degradado. La amplificación sobre el ADN genómico con estos mismos cebadores se realizó como un control positivo y se observó la banda amplificada del tamaño esperado de 1.8 Kb (**Fig. 7.9.A**).

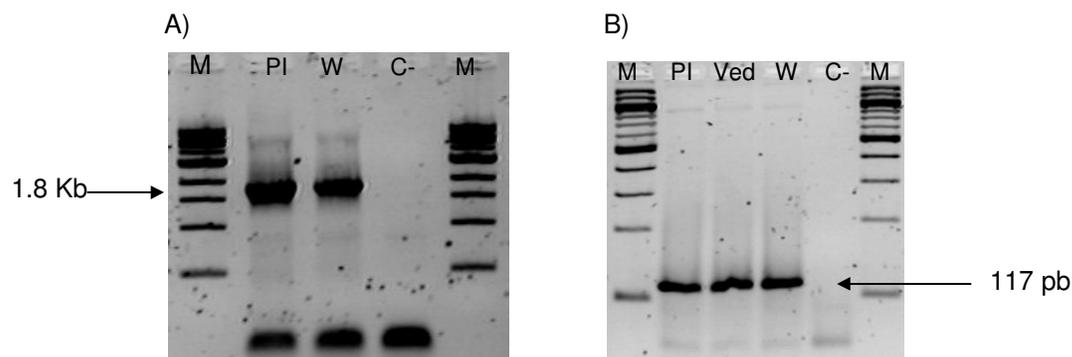


Fig. 7.9. Geles de agarosa que muestran la amplificación con los cebadores GSP2rev y GSP5for sobre A) ADN genómico de PI y WMR-29 (W) y B) ADNc de PI, Ved y WMR-29 (W). M: marcador de peso molecular 1 Kb ladder.

La diferencia del tamaño del producto de PCR con los cebadores GSP2rev y GSP5for se debe a la presencia de al menos un intrón.

El ADNc de PI se utilizó en las amplificaciones RACE-PCR 5' y 3' para amplificar los dos extremos del ADNc. Los cebadores diseñados en esta región exónica del gen permitieron amplificar ambos extremos, de manera que el producto

amplificado a partir de cada extremo presentaba una región solapante con el fragmento original y esto nos permitía obtener la secuencia completa del ADNc.

Concretamente, el extremo 3' fue amplificado con dos juegos de cebadores: el GSP2rev y el cebador P3-PCR (que era complementario a la cola de poliadenilación), y con el GSP5rev y el P3-PCR, amplificando un producto de unas 800 pb en ambos casos. La amplificación del extremo 5' se realizó con el cebador P1-PCR (de secuencia complementaria al adaptador P1 que se había ligado en este extremo) y con el cebador GSP6for. Al no observar ningún producto en esta amplificación, se realizó una segunda PCR con los cebadores P1-PCR y GSP5for y 2 µl de una dilución (50x) de la primera PCR observando en este caso una banda amplificada de 500 pb. Los productos de amplificación de la RACE-PCR 5' y 3' fueron clonados y se seleccionaron 16 clones de cada extremo para ser secuenciados. Las secuencias fueron analizadas con el programa STADEN y se obtuvo una secuencia consenso y completa del ADNc de la línea PI (**Fig. 7.10**). Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en los apéndices **B.4** y **B.5**, y las condiciones de PCR en el **B.6**.

El ADNc resultante del eIF4E de PI tiene una longitud de total de 1153 nucleótidos (nt), con una región 5'-UTR de 122 nt que precede al codón de inicio AUG. El ORF es de 708 nt de longitud que codifica para una proteína de 235 aminoácidos, si se asume que la transcripción se inicia en el primer codón de inicio. La región 3'-UTR presenta una longitud de 323 nt hasta el inicio de la cola de poliadenilación.

En los extremos de la secuencia completa del ADNc del eIF4E de PI se diseñaron un par de nuevos cebadores, full-cDNA5' y full-cDNA3', que se localizaban a 67 nucleótidos río arriba del codón de inicio y a 261 río abajo del codón stop, respectivamente (**Fig. 7.10**). Estos cebadores permitieron la amplificación del ADNc de secuencia completa de eIF4E de otras líneas de melón. En nuestro caso, amplificamos el ADNc de las líneas parentales Ved y WMR-29.

Los productos de PCR obtenidos fueron clonados y se aislaron varios clones que fueron secuenciados. La secuenciación se realizó por los dos extremos con estos mismos cebadores, además de con dos cebadores internos de la secuencia, GSP8rev (nuevo cebador diseñado en la secuencia del ADNc, apéndice **B.5**) y GSP2rev, lo que aseguraba obtener la secuencia completa del ADNc.

Las secuencias fueron analizadas con el programa STADEN y se obtuvieron las secuencias consenso y completas del ADNc de eIF4E a partir de las líneas Ved y WMR. Las secuencias de los cebadores full-cDNA5' y full-cDNA3' y las condiciones de PCR se detallan en el apéndice **B.7**.



Fig. 7.10. Secuencia completa del ADNc del eIF4E de la línea PI. En caja amarilla se indica el codón de inicio (ATG) y en azul el codón stop (TGA). En rojo están marcados los nuevos cebadores (full-cDNA5' y full-cDNA3') que amplifican una banda de 1085 pb, que nos permitirán amplificar otras líneas parentales, como Ved y WMR. La zona codificante contiene un polipéptido de 235 aminoácidos.

7.2.5. Polimorfismo detectado entre eIF4E de PI, Ved y WMR-29

El alineamiento de las secuencias completas de ADNc de PI, Ved y WMR-29 mostró la existencia un único polimorfismo entre la línea resistente PI y las dos líneas susceptibles Ved y WMR en la posición 683 río abajo del codón ATG. El genotipo resistente presentaba una timina (T), mientras que los genotipos susceptibles tenían una adenina (A) (**Fig. 7.11**). Otros 2 polimorfismos se observan en la región codificante, pero se trata de polimorfismos entre las líneas PI/Ved y WMR, lo que sugería que estos polimorfismos no están relacionados con la resistencia /susceptibilidad.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

PI      (R)      GGGACCGACTCAAACGCCTAACAGAAAATCCGAGGGCGGTGCCATTCTTCTTCGGTTCCT 60
Ved     (S)      -----
WMR29  (S)      -----

PI      (R)      TCCCTTCCATTGATTTCGATTCTTCAGATAAAGCTCTCCATTCCACAAAGCACTGAAAACCCA 120
Ved     (S)      -----ACAAAGCACTGAAAACCCA 19
WMR29  (S)      -----TCTCCATTCCACAAAGCACTGAAAACCCA 29
                                *****

PI      (R)      AAATGAGTAGTTGAAGATTCGATGAAAGCTACATCGGCGGAAGATCTTTCTAATTCATTG 180
Ved     (S)      AAATGAGTAGTTGAAGATTCGATGAAAGCTACATCGGCGGAAGATCTTTCTAATTCATTG 79
WMR29  (S)      AAATGAGTAGTTGAAGATTCGATGAAAGCTACATCGGCGGAAGATCTTTCTAATTCATTG 89
                                *****

```

Fig. 7.11. Pie de figura en página siguiente

PI	(R)	CTAATCAAACCCCTAGAGGACGTGGCGGTGACGAAGATGAGGAACCTGAGGAAGGTGAGA	240
Ved	(S)	CTAATCAAACCCCTAGAGGACGTGGCGGTGACGAAGATGAGGAACCTGAGGAAGGTGAGA	139
WMR29	(S)	CTAATCAAACCCCTAGAGGACGTGGCGGTGACGAAGATGAGGAACCTGAGGAAGGTGAGA *****	149
PI	(R)	TCGTGCGGCACGACGACCTCGACTCCTCCAATTTGTCCGCTCCCTAGTGCATCAGCCTC	300
Ved	(S)	TCGTGCGGCACGACGACCTCGACTCCTCCAATTTGTCCGCTCCCTAGTGCATCAGCCTC	199
WMR29	(S)	TCGTGCGGCACGACGACCTCGACTCCTCCAATTTGTCCGCTCCCTAGTGCATCAGCCTC *****	209
PI	(R)	ACCCTCTGGAGCACTCTTGGACCTTTTGGTTCGATAACCCATCTGCCAAATCCAAGCAAG	360
Ved	(S)	ACCCTCTGGAGCACTCTTGGACCTTTTGGTTCGATAACCCATCTGCCAAATCCAAGCAAG	259
WMR29	(S)	ACCCTCTGGAGCACTCTTGGACCTTTTGGTTCGATAACCCATCTGCCAAATCCAAGCAAG *****	269
PI	(R)	CCACCTGGGGTGCCTTATTTCGACCGATCTATACCTTCTTACCGTCGAGGAGTTCTGGA	420
Ved	(S)	CCACCTGGGGTGCCTTATTTCGACCGATCTATACCTTCTTACCGTCGAGGAGTTCTGGA	319
WMR29	(S)	CCACCTGGGGTGCCTTATTTCGACCGATCTATACCTTCTTACCGTCGAGGAGTTCTGGA ****	329
PI	(R)	GTGTTTACAACAACATTTCATCATCCAAGCAAATTTGGCGATGAGGGCAGATTGTACTGCT	480
Ved	(S)	GTGTTTACAACAACATTTCATCATCCAAGCAAATTTGGCGATGAGGGCAGATTGTACTGCT	379
WMR29	(S)	GTGTTTACAACAACATTTCATCATCCAAGCAAATTTGGCGATGAGGGCAGATTGTACTGCT *****	389
PI	(R)	TCAAACATAAAAATTGAGCCTAAATGGGAAGATCCCGTTTGTGCTAATGGAGGGAAATGGA	540
Ved	(S)	TCAAACATAAAAATTGAGCCTAAATGGGAAGATCCCGTTTGTGCTAATGGAGGGAAATGGA	439
WMR29	(S)	TCAAACATAAAAATTGAGCCTAAATGGGAAGATCCCGTTTGTGCTAATGGAGGGAAATGGA *****	449
PI	(R)	CTGTGAACTTTCCAAGGGGAAAATCTGATAATGGCTGGTTGTACACGCTGCTTGCTATGA	600
Ved	(S)	CTGTGAACTTTCCAAGGGGAAAATCTGATAATGGCTGGTTGTACACGCTGCTTGCTATGA	499
WMR29	(S)	CTGTGAACTTTCCAAGGGGAAAATCTGATAATGGCTGGTTGTACACGCTGCTTGCTATGA *****	509
PI	(R)	TCGGAGAACAGTTTACTGTGGTGATGAAATTTGTGGAGCAGTTGTTAATGTTAGGTCTG	660
Ved	(S)	TCGGAGAACAGTTTACTGTGGTGATGAAATTTGTGGAGCAGTTGTTAATGTTAGGTCTG	559
WMR29	(S)	TCGGAGAACAGTTTACTGTGGTGATGAAATTTGTGGAGCAGTTGTTAATGTTAGGTCTG *****	569
PI	(R)	GGCAGGATAAAAATATCAATTTGGACGAAGAATGCTTCCAATGAAGCTGCGCAGGCGAGCA	720
Ved	(S)	GGCAGGATAAAAATATCAATTTGGACGAAGAATGCTTCCAATGAAGCTGCGCAGGCGAGCA	619
WMR29	(S)	GGCAGGATAAAAATATCAATTTGGACGAAGAATGCTTCCAATGAAGCTGCGCAGGCGAGCA *****	629
PI	(R)	TTGGAAAACAGTGAAGGAGTTTCTTGATTACAATGAGAGCATTGGCTTTATATTCCACG	780
Ved	(S)	TTGGAAAACAGTGAAGGAGTTTCTTGATTACAATGAGAGCATTGGCTTTATATTCCACG	679
WMR29	(S)	TTGGAAAACAGTGAAGGAGTTTCTTGATTACAATGAGAGCATTGGCTTTATATTCCACG *****	689
PI	(R)	ATGACGCAAAGAAATTCGATAGACTTGCGAAGAATAAATATATGGTGTCTGTACGGT	840
Ved	(S)	ATGACGCAAAGAAATTCGATAGACTTGCGAAGAATAAATATATGGTGTCTGTACGGT	739
WMR29	(S)	ATGACGCAAAGAAATTCGATAGACTTGCGAAGAATAAATATATGGTGTCTGTACGGT *****	749
PI	(R)	TTCTAGTGCCTGGCGTGGGAGGAGGATAACTCGTCCTATTCTGTCGAAAGCATGCTGCTGC	900
Ved	(S)	TTCTAGTGCCTGGCGTGGGAGGAGGATAACTCGTCCTATTCTGTCGAAAGCATGCTGCTGC	799
WMR29	(S)	TTCTAGTGCCTGGCGTGGGAGGAGGATAACTCGTCCTATTCTGTCGAAAGCATGCTGCTGC *****	809
PI	(R)	ATCTCGGCATGTAAAGGTTGAGCTGTGGCTAGTGGGTACTACCTTTAGTTTCAACCTCCC	960
Ved	(S)	ATCTCGGCATGTAAAGGTTGAGCTGTGGCTAGTGGGTACTACCTTTAGTTTCAACCTCCC	859
WMR29	(S)	ATCTCGGCATGTAAAGGTTGAGCTGTGGCTAGTGGGTACTACCTTTAGTTTCAACCTCCC *****	869
PI	(R)	CTCCCCGGAAAACCAAACACACCACCACCAGGGAAAAAGAAAAAGAAGGTTTTAATTG	1020
Ved	(S)	CTCCCCGGAAAACCAAACACACCACCACCAGGGAAAAAGAAAAAGAAGGTTTTAATTG	919
WMR29	(S)	CTCCCCGGAAAACCAAACACACCACCACCAGGGAAAAAGAAAAAGAAGGTTTTAATTG *****	929
PI	(R)	GTAACGATGTTTTTGTGCGATTAGGAATTTGTGGAATCGCCATTGCTCATAACACAAA	1080
Ved	(S)	GTAACGATGTTTTTGTGCGATTAGGAATTTGTGGAATCGCCATTGCTCATAACACAAA	979
WMR29	(S)	GTAACGATGTTTTTGTGCGATTAGGAATTTGTGGAATCGCCATTGCTCATAACACAAA *****	966

Fig. 7.11. Pie de figura en página siguiente

```

PI      (R)      AGCACCTGAATCTCAGATTCTTGTCTGTACTTGACAGTTTTAGCCAATGAGGTGAAATG 1140
Ved     (S)      AGCACCTGAATCTCAGATTCTTGTCTGTACTTGACAGTTTTAGCCAATGAGGTGAAATG 1039
WMR29  (S)      -----

PI      (R)      CATGCTCTTTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1192
Ved     (S)      CATGCTCTTTTATAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 1077
WMR29  (S)      -----

```

Fig. 7.11. Alineamiento de las secuencias del ADNc del eIF4E de PI, Ved y WMR-29. En amarillo se indica el codón de inicio y en azul el codón stop. El nucleótido polimórfico entre el genotipo resistente PI y los genotipos susceptibles PS y WMR se indica en caja verde y se localiza en la posición 683 río abajo el codón de inicio. El asterisco en la parte inferior de las secuencias indica identidad del nucleótido entre las secuencias de los 3 genotipos en esa posición. En caja roja se indican los 2 polimorfismos en la región codificante entre las secuencias de PI/Ved y WMR.

Además, sólo el polimorfismo de la posición 683 correspondía con un cambio de aminoácido de la proteína en la posición 228: los genotipos susceptibles Ved y WMR-29 (CAT) presentaban una histidina (His) y el genotipo resistente PI (CIT) presentaba una leucina (Leu) (**Fig. 7.12**). Los otros dos polimorfismos de la región codificante son mutaciones en la tercera base del codón, mutaciones silenciosas que no resultan en cambios en la secuencia proteica.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

PI      (R)      MVVEDSMKATSAEDLSNSIANQNPRGRGGDEDEELEEIGEIVGDDDLSSNLSASLVHQPH 60
Ved     (S)      MVVEDSMKATSAEDLSNSIANQNPRGRGGDEDEELEEIGEIVGDDDLSSNLSASLVHQPH 60
WMR29  (S)      MVVEDSMKATSAEDLSNSIANQNPRGRGGDEDEELEEIGEIVGDDDLSSNLSASLVHQPH 60
*****

PI      (R)      PLEHSWTFWFDNPSAKSKQATWGASIRPIYTFSTVEEFWSVYNNIHHP SKLAMRADLYCF 120
Ved     (S)      PLEHSWTFWFDNPSAKSKQATWGASIRPIYTFSTVEEFWSVYNNIHHP SKLAMRADLYCF 120
WMR29  (S)      PLEHSWTFWFDNPSAKSKQATWGASIRPIYTFSTVEEFWSVYNNIHHP SKLAMRADLYCF 120
*****

PI      (R)      KHKIEPKWEDPVCANGGKWTVNFPRGKSDNGWLYTLLAMIGE QFDCGDEICGAVNVRSR 180
Ved     (S)      KHKIEPKWEDPVCANGGKWTVNFPRGKSDNGWLYTLLAMIGE QFDCGDEICGAVNVRSR 180
WMR29  (S)      KHKIEPKWEDPVCANGGKWTVNFPRGKSDNGWLYTLLAMIGE QFDCGDEICGAVNVRSR 180
*****

PI      (R)      QDKISIWTKNASNEAAQASIGKQWKEFLDYNESIGFIFHDDAKKFDRLAKNKYMV 235
Ved     (S)      QDKISIWTKNASNEAAQASIGKQWKEFLDYNESIGFIFHDDAKKFDRLAKNKYMV 235
WMR29  (S)      QDKISIWTKNASNEAAQASIGKQWKEFLDYNESIGFIFHDDAKKFDRLAKNKYMV 235
*****

```

Fig. 7.12. Comparación de la secuencia proteica de las líneas susceptible Ved y WMR-29 y de la línea resistente PI, deducidas a partir de la secuencia del ADNc. El aminoácido polimórfico se indica en verde: una His (H) en los genotipos susceptibles y una Leu (L) en el resistente. Los números del margen derecho de la secuencia proteica indican el número de aminoácidos.

El alineamiento de la secuencia proteica de eIF4E de melón con las secuencias de *Arabidopsis thaliana* (AY093750), *S. cerevisiae* (P07260), ratón común (*Mus musculus* NP_031943), humano (*Homo sapiens*, M15353), lechuga (*Lactuca sativa*, AF530162), pimiento (*Capsicum annuum*, AY122052) y guisante (*Pisum sativum*, AY611425) muestra que la mutación en melón no se localiza en ninguno de los aminoácidos altamente conservados entre estas especies ni en aminoácidos

implicados en el reconocimiento de la estructura 5' cap (**Fig. 7.13**) (Marcotrigiano y col., 1997).

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

Ratón          -----MATVEPETPTTNPPEEEKTESNQEVANPEHYI 35
Humano         -----MATVEPETPTPNPPTTEEEKTESNQEVANPEHYI 35
Arabidopsis    MAVEDTPKSVVTEEAKPNSIENPIDRYHEEGDDAEEGE IAGGEDGDNVDESSK--SGVPE 58
Guisante       MVVEETPKSIIITDDQITNPN----RVIEDNNLEEGEILD---EDDSATSK--PVVHQ 51
Melón          MVVEDSMKATS AEDLSNSIANQNPGRGGDEDEELEEGEIVGDDDLDSNLSA--SLVHQ 58
Lechuga        -----MKSEEQKLIDVKNHRGVRSDGEEDEQLEEGEIVGGDADTLSSSSSRPGTAIA 53
Pimiento       -----MATAEMKTTTFDEAEKVKLNANEADDEVEEGEIVVEETDDTTSYLSKEIAT 51
S.cerevisiae   -----MSVEEVSKKFEENVSDDTTATPKTVLSDSAHFV 35
                : .

Ratón          KHP LQNRWALWFFK---NDKSKT W75 QANLRLISKFDTVEDFWALYNHIQLSSNLMPGCDYS 92
Humano         KHP LQNRWALWFFK---NDKSKT W75 QANLRLISKFDTVEDFWALYNHIQLSSNLMPGCDYS 92
Arabidopsis    SHPLEHSWTFWFDNPAVSKSKQTSW GSSLRPVFTFSTVEEFWSLYNNMKHPSKLAHGADFY 118
Guisante       PHLLENSWTF WFDTPAAKSKQ P W G S M R P I Y T F S T V E E F W S I Y N N I H H P G K L A V G A D F Y 110
Melón          PHPLEHSWTFWFDNPSAKSKQATW GASIRPIYTFSTVEEFWSVYNNIHHPSKLAMRADLY 118
Lechuga        QHPLEHSWTFWFDTPS KSKQVAWGSSMRPIYTFSSVEEFWSLYNNIHRPSKLA G G A D F Y 113
Pimiento       KHPLEHSWTFWFDNP VAKSKQAAGWSS RNVYTFSTVEDFWGAYNNIHHPSKLVVGADLH 111
S.cerevisiae   KHP LNTKWTLWYTKP-AVDKSES WSDLLRPVTSFQTVEEFWAI IQNIPEPHELPLKSDYH 94
                * *: *::: . . * : * : *::: * . : : . : * . *

Ratón          LFKDGI E P M W E D E K N K R G G R W L I T L N K Q Q R R S D L D R F W L E T L L C L I G E S F D D Y S D D V C G A 152
Humano         LFKDGI E P M W E D E K N K R G G R W L I T L N K Q Q R R S D L D R F W L E T L L C L I G E S F D D Y S D D V C G A 152
Arabidopsis    CFKHIIEPKW E D P I C A N G G K W T M T F P K E K S ---D K S W L Y T L L A L I G E Q F D H G -D E I C G A 173
Guisante       CFKHKIEPKW E D P I C A N G G K W T A N Y P K G K S ---D T S W L Y T L L A M I G E Q F D H G -D E I C G A 165
Melón          CFKHKIEPKW E D P V C A N G G K W T V N F P R G K S ---D N G W L Y T L L A M I G E Q F D C G -D E I C G A 173
Lechuga        CFKKNIEPKW E D P V C A N G G K W T M T F T K A K S ---D T C W L Y T L L A M I G E Q F D H G -D D I C G A 168
Pimiento       CFKHKIEPKW E D P V C A N G G T W K M S F S K G K S ---D T S W L Y T L L A M I G H Q F D H E -D E I C G A 166
S.cerevisiae   VFRNDV R P E W E D E A N A K G G K W S F Q L R G K G A D --I D E L W L R T L L A V I G E T I D E D D S Q I N G V 152
                * : . : * * * * . * * * * * * * * * * . : * . : : * .

Ratón          VVNVRAKGD K I A I W T T E S E N R D A V T H I G R V Y K E R L G L P P K I V I G Y Q S H A D T A T K S G S T T K 212
Humano         VVNVRAKGD K I A I W T T E C E N R E A V T H I G R V Y K E R L G L P P K I V I G Y Q S H A D T A T K S G S T T K 212
Arabidopsis    VVNI R G K Q E R I S I W T K N A S N E A A Q V S I G K Q W K E F L D Y N N S I G F I I H E D A K K L D R N A K N A Y 233
Guisante       VV V R G R A E K I S I W T K N A S N E A A Q V S I G K Q W K E F L D Y N E T M G F I F H D D A R K L D R N A K N K Y 225
Melón          VVNV R S G Q D K I S I W T K N A S N E A A Q A S I G K Q W K E F L D Y N E S I G F I F H D D A K K F D R A K N K Y 233
Lechuga        VVNV R A R Q E K I A L W T K N A A N E S A Q L S I G K Q W K E F I D Y N D T I G F I F H E D A K T L D R S A K N K Y 228
Pimiento       VVSV R G K G E K I S L W T K N A A N E T A Q V S I G K Q W K Q F L D Y S D S V G F I F H D D A K R L D R N A K N R Y 226
S.cerevisiae   V L S I R K G G N K F A L W T K - S E D K E P L L R I G G K F K Q V L K L T D D G H L E F F P H S S A N G R H P Q P S I 211
                * : . : * * * * . : . . * * * : * : : : : : : .

Ratón          NRFVV 217
Humano         NRFVV 217
Arabidopsis    TA--- 235
Guisante       VV--- 227
Melón          MV--- 235
Lechuga        TV--- 230
Pimiento       TV--- 228
S.cerevisiae   TL--- 213

```

Fig. 7.13. Alineamiento de las secuencias proteicas predichas de eIF4E del genotipo resistente de melón PI (*C. melo*), lechuga (*Lactuca sativa*, AF530162), *Arabidopsis thaliana* (AY093750), pimiento (*Capsicum annum* AY122052), ratón común (*Mus musculus*, NP_031943), guisante (*Pisum sativum* AY611425), humano (*Homo sapiens*, M15353), *S.cerevisiae* (P07260). Los aminoácidos implicados en la interacción con la estructura del ARNm 5' cap se indican en color azul, donde se destacan los Trp 75 y 121 de pimiento. Los aminoácidos implicados en el reconocimiento de las proteínas de unión a eIF4E están indicados con un círculo negro en la parte superior de la secuencia (Marcotrigiano et al 1997). En asterisco (*) en la parte inferior de la secuencia se indican los aminoácidos absolutamente conservados entre estas especies en la posición indicada. En rojo se indican las posiciones de las mutaciones encontradas en eIF4E de pimiento (Ruffel y col., 2002), guisante (Gao y col., 2004), lechuga (Nicaise y col., 2003) y melón.

7.2.6. Localización y amplificación de los intrones del eIF4E de melón

La estructura del gen eIF4E está estrictamente conservada entre *Arabidopsis* y pimiento: los 4 intrones se encuentran exactamente en las mismas posiciones y el tamaño de los exones 2, 3 y 4 son casi idénticos. Además, también se ha observado una estricta conservación en la posición del intrón 2 entre otras especies como en *Drosophila*, *S. pombe* y humanos, y del intrón 1 en todas ellas excepto en *Drosophila* (Ruffel y col., 2004). Estos datos indicaban que en melón probablemente también estará conservada y por esto, la comparación de la secuencias proteicas de eIF4E de *Arabidopsis* y melón permitió tener una predicción de la posición de los intrones en este último (**Fig. 7.14**).

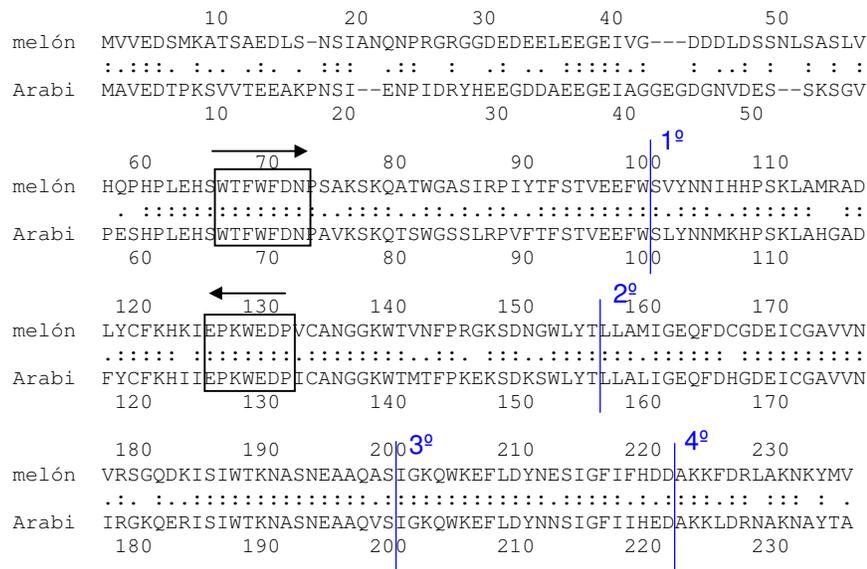


Fig. 7.14. Comparación de las secuencias proteicas de eIF4E de melón (PI) y *Arabidopsis*. Las líneas verticales de color azul indican la posible posición de los 4 intrones a partir de la secuencia de *Arabidopsis*. Las cajas muestran la región donde se diseñaron los cebadores degenerados y las flechas en la parte superior de éstos indican la dirección de los mismos.

Una vez predicha la posición de los intrones, se diseñaron nuevos cebadores (GSP 7for, GSP 7rev, GSP 8for, GSP 8rev) en la secuencia del ADNc del eIF4E de PI (apéndice **B.5**) de manera que cada par de cebadores flanqueaba cada uno de los posibles intrones y de esta manera permitiría conocer el tamaño de los mismos. El tamaño aproximado de los intrones se obtuvo de la diferencia de tamaño entre el producto amplificado con el par de cebadores sobre el ADN genómico y sobre el ADNc (**Tabla 7.4**).

La amplificación del 1^{er} intrón se llevó a cabo con un par de cebadores que fueron diseñados para la amplificación RACE-PCR (GSP 5for y GSP 2rev), y el tamaño aproximado era de 1.8 Kb. El resto de intrones se amplificaron con los cebadores que se detallan en la **tabla 7.4**. El segundo, tercero y cuarto intrón son de

menor tamaño, oscilan entre las 80 y 150 pb aproximadamente. El tamaño completo del gen es de 3 Kb aproximadamente y fue obtenido amplificando con los cebadores full-cDNA5' y full-cDNA3' sobre ADN genómico (**Fig. 7.15**).

Intrón	Tamaño banda sobre ADN genómico (pb)	Tamaño banda sobre ADNc (pb)	Predicción tamaño del intrón (pb)	Cebador 1	Cebador 2
1	1800	114	1686	GSP2 rev	GSP5 for
2	320	173	147	GSP5 rev	GSP7 rev
3	320	167	153	GPS7 for	GSP8 rev
4	450	370	80	GSP8 for	full cDNA 3'
Gen completo	3000	1085	-	full cDNA5'	full cDNA 3'

Tabla 7.4. En esta tabla se muestran los pares de cebadores utilizados para amplificar cada uno de los intrones. Los tamaños de los fragmentos amplificados sobre ADN genómico son aproximados ya que se obtuvieron tras la visualización en gel de agarosa. El tamaño de los intrones es una predicción obtenida de la diferencia de la amplificación sobre ADN genómico y ADNc. El tamaño de los fragmentos amplificados con cada par de cebadores sobre el ADNc es exacto. Los tamaños de los fragmentos se indican en pb.

El producto de PCR de cada intrón fue clonado y secuenciado. Las secuencias del segundo, tercero y cuarto intrón se obtuvieron directamente secuenciando con los cebadores descritos en la tabla 7.4. En cambio, para el primer intrón, al presentar un mayor tamaño, el producto de PCR fue secuenciado con los cebadores de los extremos GSP 2rev y GSP 5for, y además con cebadores internos que fueron diseñados en la secuencia del intrón, eIF4E-3rev y eIF4E-4rev (secuencia detallada en apéndice **B.5**). Las condiciones de PCR de los cebadores utilizados para amplificar los intrones se detallan en el apéndice **B.8**.

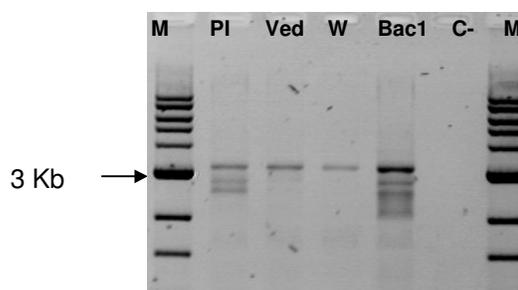
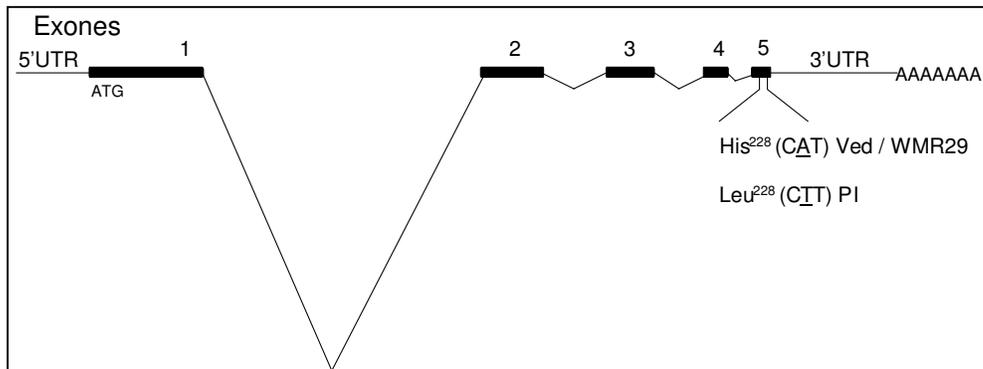


Fig. 7.15. Gel de agarosa que muestra la amplificación con los cebadores full-cDNA5' y full-cDNA3' sobre ADN genómico de PI, Ved, WMR-29 y el BAC 1-21-10. El tamaño de la banda es de 3 Kb aproximadamente y corresponde con el tamaño del gen completo del eIF4E de melón. PI: PI 161375. Ved: Vedrantaïs. W: WMR-29. BAC 1: BAC 1-21-10. C-: control negativo. M: marcador peso molecular 1 Kb ladder.

7.2.7. Estructura y secuencia completa del gen eIF4E de melón

A partir de las secuencias de los cuatro intrones, la secuencia completa de ADNc y la predicción de la posición de los intrones, se elaboró la secuencia completa del gen eIF4E de melón (**Fig. 7.18**) formada por una región 5'-UTR de 122 nt, 5 exones y 4 intrones, una región 3'-UTR de 323 nt y la cola de poliadenilación. El tamaño exacto de los intrones 1, 2, 3 y 4 del gen es de 1719, 154, 154 y 78 nt respectivamente, en concordancia con la predicción que habíamos realizado (**Tabla 7.4**). El tamaño exacto de los exones 1, 2, 3, 4 y 5 es de 299, 166, 126, 66 y 51 nt respectivamente (**Fig. 7.16**). Todos los límites de los exones/intrones siguen la regla GT/AG. La secuencia del gen eIF4E no muestra el promotor del gen, ya que aún no se disponía de su secuencia (**Fig. 7.18**).



[EX1 299 pb]	TGGAG/gtaga	[int1 1719 pb]	tcaag/TGTTT
[EX2 166 pb]	ACACG/gtatt	[int2 154 pb]	aacag/CTGCT
[EX3 126 pb]	CGCAG/gtaat	[int3 154 pb]	gctag/GCGAG
[EX4 66 pb]	TCCAC/gtacg	[int4 78 pb]	ttcag/GATGA
[EX5 51 pb]			

Fig. 7.16. Estructura del gen eIF4E de melón, formado por 5 exones, líneas gruesas, y 4 intrones, líneas finas. La mutación en la posición 228 en el exón 5 del eIF4E de melón se indica en el esquema. El tamaño de los exones e intrones se especifica en la parte inferior (ej. EX1 299 pb indica el tamaño del exón 1). Se muestran los límites de los exones/intrones (en mayúscula la secuencia del exón y en minúscula la del intrón) que cumplen la regla GT/AG.

7.2.8. Análisis por Southern-blot

El análisis por Southern-blot fue realizado con una sonda de 1.9 Kb amplificada sobre el ADN del BAC 1-21-10 y los cebadores melF4E-F/R (apéndice B.2) específicos del eIF4E de melón. El ADN de las tres líneas parentales PI, Ved y WMR-29 fue digerido con los enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RV, *Pvu*II y *Xba*I, transferido a una membrana y ésta fue hibridada con la sonda arriba descrita. La **Fig. 7.17** muestra el revelado de la hibridación. En las digestiones realizadas con *Bam*HI y *Pvu*II se observa una única banda del tamaño de 12 Kb aproximadamente, que nos indica probablemente que el gen es de copia única en el genoma de melón. Las digestiones realizadas con *Eco*RV y *Xba*I presentan digestión del gen ya que se distingue la hibridación de la sonda en más de un lugar. No se observa hibridación con el ADN del BAC 1-21-10 (B), posiblemente por un error de carga de ADN (**Fig. 7.17**).

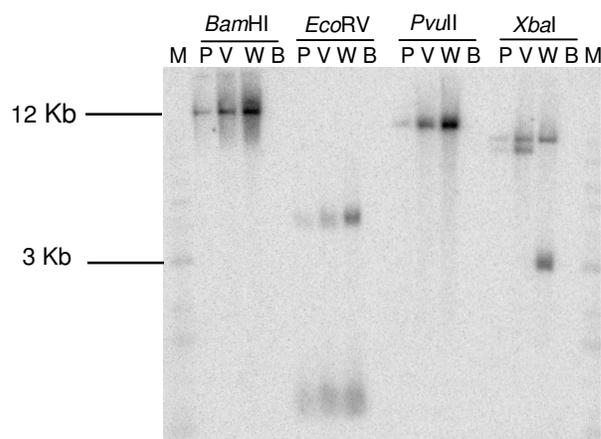


Fig. 7.17. Southern-blot. En esta membrana se puede observar la hibridación con una sonda de ADN de 1.8 Kb específica del eIF4E. P: PI 161375, V: Vedrantaís, W: WMR-29, B: BAC 1-21-10.

Secuencia completa del gen eIF4E de melón (Ved)

GGGACCGACTCAAACGCCTAACAGAAAATCCGAGGGCGGTGCCATTCTTCTTCGGTTCC
 TTCCCTTCCATTGATTCGATTTCTTCAGATAACTTCCATFCCACAAAGCACTGAAAACC
 CAAA**ATG**GTAGTTGAAGATTCGATGAAAGCTACATCGGGCGGAAGATCTTTCTAATTCCA
 TTGCTAATCAAACCTAGAGGACGTGGCGGTGACGAAGATGAGGAACCTGAGGAAGGT
 GAGATCGTCGGCGACGACGACCTCGACTCCTCCAATTTGTCCCGTCCCTAGTGCATCA
 EXÓN 1
 GCCTCACCCTTGGAGCACTCTTGGACCTTTTGGTTCGATAACCCATCTGCCAAATCCA
 AGCAAGCCACCTGGGGTGCCTATTTCGACCGATCTATACTTCTTACCCTCGAGGAG
 TTCGAGGAGTAGAATTTTATTTGATTTTAAATTTTCTCTCTCTCTCTTGTCTTCGATT
 TTTTTGTTTTTGGCGTTTCTTGGTTCGATTTAGGGAAAATTTAGGAACTTGGTGAGA
 TAGAACATTAGGAAATGAAATTTATTTATGTTCTTTTTGTGCTTTAGTCCGTGGT
 TTACTCTTGTGTTATTTGATTGGAAGTAAGGTGAGATAAAGAAGGGATTATGAATGTGA
 GGGCTGGAGAGGGGACTGGACAATGTAGAAATTTGAAGGAATTTTATTTCTTGTCTGT
 GGGCTTGAATGTATGGAATTTTGTATTGATATCTTGTATATATTCATGGACCTAGGA
 GGAACATCTGTGAAGCAATGCTTCTGCCTCTGTTTTGTATGATTTTAAAACCCCTCC
 TTAGGGTTTTGTATTAGGAGCTCTGTGAAGAGTTTATTTTCGACGTCCATATAGATTAT
 TTTTTTTTTTAAATTTCTCTAATTTGAAATTTCTTGTATGATGTCCTGTTGTAAAA
 CTTTCATAATCAGATATCATATTATGAGCTATACTTGCAATATACAAAATATGAGAGCAG
 CTACAAAATTAATGGTACTTGGAAATTAATTTGAATTTATATAAACAGTCATTTCTGCT
 GATTTATCTTTACTAAGATTCTCTCGACCATTTGGTTTTCTTTTCAGCAACTAGATTGGA
 TGAGTTGGATCATCAATCGTCTGATTTTTCACAACCGTTTTCCCTTATTTCTTGT
 TTTCCATCTACGATTGCTGGTTCAGCTTACCATCTTGCCTCCTTCTTCTTGCCTGCT
 intrón 1
 CTGTTTTGTAGTGGTCACTGATTTCTAGAGCTTTTGGCTTCATAAATTACACTATTGA
 ATTAACATACTATGAGTTGGTCTAGTGGTCAATTAAGGGTGAATGTGGCAAAGGTTTT
 TGAAGGAAATGAGTTAAGCTATGGTGGCCATTGTGGCTACCTACCTGGTTTTAATATT
 TTGACAGTCATAGTAGCCTCAAGTGTGATCAGTGAGGAATGAGGATAATTGAGGTGCA
 TTATTGCCGCGTCTGGCTGGATACTCTTAGGCTGTTTTGATATCCATTTAATTTTT
 GGTTTTTGATAAATGAAATTTGTTATCTAACAATTTCTTTATAATGGTCTTAATCTCTCT
 CAAGGTAACATTTGAATTTCTAGCTTGAATTTCAAGGATAAAAAACAAATTTTTAAACT
 ATTTTCTTTTCAAACCTAGCATGGATTTTACAACATTTGTTAAAAGTAGGCCAACGTG
 GAAGTGGTAGCCATTATAAGCTTATTTTTAGGACCAGAAATAGAAATCAAATGGTTAT
 CAAACAGGGCTTCCCTAGTTTATCTTGTTTTTTACTTTTTAAATAGAATAAAAAATTGT
 TAAAGCACTTTATGCGTAAGTTTGTCTTCTGAAATGTTCTGTCTTGTATGGTTATTCTG
 TTGCTTCTACAAATTAATAAAACTTATTTGTTTTTGGGACCGATTGGTTTTAGGGT
 TCCATTTTTACGCCCTCATTAGTTAAAATATACATGGTGTGTTTCGTGTGACATGTC
 CATCATGTTCAATGAAAGTTTTTACTGCCGTACAACACTTAATCTTTTGGCTGGCTGTTA
 ATTTATCTCTGCATTCTTTGTTTTATTTGCATTGTGATTGGTTGATCAATTTGTTCGT
 TTTTCCCTGCTTCAAGTGTTTACAACAACATTCATCATCCAAGCAAATTTGGCGATGAGG
 GCAGATTTGTACTGCTTCAAACATAAAAATTTAGCCTAAAATGGGAAGATCCCGTTTGTGC
 TAATGGAGGAAATGGACTGTGAACCTTCCAAGGGGAAATCTGATAATGGCTGGTTGT
 ACACGGTATTACCCTGAATCCATGTTTAAATTCGACACATAAGCTGCTTCTTTTTAATT
 intrón 2
 ATTTATTTCTTTAAAATTTTAAATGGTAATACACAAGCAAATATATTAAGACTCTATTT
 TATCATTTATTGTTTTTCTAACAATCAATTTTCCAACAGCTGCTTGTCTATGATCGGA
 EXÓN 3
 GAACAGTTTTGACTGTGGTATGAAATTTGTGGAGCAGTTGTTAATGTTAGGTCTGGGCA
 GGATAAAAATCAATTTGGACGAAGAATGCTTCCAATGAAGCTGCGCAGGTAATAACCA
 intrón 3
 CAAGATCAAGTAATTTATTTAAAACCCATATATTTCTCCAGCATAAATGCTCCACAT
 TAGTACAATACTCCATTCTGGCACACACAATGAACCTCATTTAAGTTCAATAAATCTTA
 EXÓN 4
 ACATGTTCTTTTTTTTTTGGCTAGGCGAGCATTGGAACAGTGGAAAGGAGTTCTTT
 intrón 4
 GATTACAATGAGAGCATTGGCTTTATATCCACGTACGTGCATGCGGCTGTATAAATTT
 CAGCTTGATCCTTCGTTTCATGTTTCTGATACCATGTTGTTTCCCTGTTGAGGATGACG
 EXÓN 5
 CAAAGAAATTCGATAGACATGCGAAGAATAAATATATGGTGTGATCTGTACGGTTTCTA
 GTGCGTGGCGTGGGAGGAGGATAACTCGTCTTATTCGTGCAAAGCATGCTGCTGATCT
 CGGCATGTAAGGTTGAGCTGTGGCTAGTGGTACTACCTTTAGTTTCAACCTCCCCTC
 CCCCAGAAAACCAACACACCACCACCCAGGGAAAAGAAAAGAAAGGTTTTAATGGT
 AAACGATGTTTTTGTGCGATTAGGAATTTGTGGAATCGCCATTGCTCATAACACAAAA
 GCACCTGAATCTCAGATTTCTGTTCTGTAAGTTTGTAGCAATGAGGTGAAATG
 CATGCTCTTTTATAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 7.18. Secuencia completa del gen eIF4E de melón (Ved), formado por 5 exones y 4 intrones, una región 5'UTR y 3'UTR. En caja amarilla se resalta el codón de inicio ATG y en azul el codón stop TGA. Todos los intrones siguen la regla GT/AG.

7.3. DISCUSIÓN

En este capítulo hemos descrito la identificación de un gen candidato para *nsv* mediante microsintenia con el genoma de *Arabidopsis thaliana*. La microsintenia hace referencia a la colinealidad existente en pequeños intervalos cromosómicos entre genomas de diferentes especies, próximas o alejadas evolutivamente (Paterson y col., 1996a; Paterson y col., 2000). En lugar de considerar las secuencias de un genoma completo de una especie, se comparan secuencias de BACs que contienen genes homólogos y que han sido secuenciados y anotados completamente (Ku y col., 2000; Liu y col., 2001; Mayer y col., 2001; Rossberg y col., 2001).

Recientemente, se ha descrito la existencia de microsintenia en un BAC de 117 Kb de melón con dos regiones del genoma de *Arabidopsis* (van Leeuwen y col., 2003). El análisis de la secuencia completa de este BAC (60K17), obtenido de una genoteca de BACs de una línea dihaploide de melón, ha permitido tener una primera idea de la estructura física del genoma de melón. Se han identificado tres genes de melón que permitieron definir dos regiones en los cromosomas 3 y 5 de *Arabidopsis* que presentaban un grado significativo de microsintenia, además estas dos regiones de *Arabidopsis* están duplicadas.

Similares análisis se han realizado entre *Arabidopsis* y otras especies. En la comparación entre *Arabidopsis* y tomate se ha encontrado una extensiva microsintenia entre un segmento de 105 Kb del cromosoma 2 de tomate y los cromosomas 2 al 5 de *Arabidopsis* (Ku y col., 2000) y entre un segmento de 57 Kb del cromosoma 7 de tomate en la región del *Lateral Suppressor* y segmentos homólogos de dos especies de la familia de las Brassicaceas (*Arabidopsis* y *Capsella*) (Rossberg y col., 2001). La comparación entre arroz y *Arabidopsis* mostró microsintenia entre un segmento de 340 Kb del cromosoma 2 de arroz y un segmento del cromosoma 4 de *Arabidopsis* (Mayer y col., 2001), mostrando así que la microsintenia ocurre entre especies mono y dicotiledóneas (Mayer y col., 2001). La microsintenia entre *Arabidopsis* y melón, y entre otras especies dicotiledóneas y monocotiledóneas y *Arabidopsis*, sugiere que los datos acumulados en una especie modelo pueden ser utilizados para la localización de genes ortólogos de otras especies de las que se tiene menor conocimiento, como las que presentan un tamaño grande de genoma o aquellas de las que no se dispone de mapas genéticos saturados.

Por otro lado, el mapeo comparativo entre especies de la misma familia ha revelado un alto grado de conservación del contenido y orden de los genes a nivel de grandes fragmentos de cromosoma o de cromosomas enteros, lo que se denomina macrosintenia (Gale y Devos, 1998; Bennetzen, 2000; Paterson y col., 2000). El mejor

ejemplo de macrosintenia está descrito en la familia de los cereales (Poaceae). También se ha observado una amplia macrosintenia dentro de las familias Solanaceae, Brassicaceae, Rosaceae y Fabaceae.

En este capítulo, se describe por primera vez un gen candidato en melón obtenido a partir de la comparación con el genoma de *Arabidopsis*. El análisis de la microsintenia entre las dos especies reveló que había conservación de genes en esta región, aunque no se conservaba el orden de los mismos (**Fig. 7.1**). La identificación del gen candidato eIF4E, gracias a la microsintenia, ha permitido avanzar de una manera más rápida en el clonaje del gen de resistencia *nsv*, ya que no ha sido necesaria la secuenciación completa del BAC que contenía el gen, el ensamblaje de las secuencias y finalmente, la búsqueda y validación de genes candidatos.

El primer gen de resistencia natural recesivo aislado en plantas fue *pvr2* contra el virus Y de la patata (PVY) en pimiento que codifica para el factor de iniciación de la traducción de eucariotas 4E (eIF4E) (Ruffel y col., 2002). El gen eIF4E también ha sido descrito como el responsable de otros genes de resistencia naturales: el gen *mo1* de lechuga contra el virus del mosaico de la lechuga (LMV) (Nicaise y col., 2003) y el gen *sbm1* de guisante contra el virus del mosaico de la semilla del guisante (*Pea seed-borne mosaic virus*, PsBMV) (Gao y col., 2004). En todos estos casos, se trata de genes de resistencia recesivos contra potyvirus. En el caso de los genes *pvr2*, *mo1* y *sbm1*, las mutaciones que confieren resistencia se encuentran cercanas al dominio de unión a la estructura 5' cap o dentro de este, pero nunca afectan a aminoácidos clave implicados en el reconocimiento de la estructura 5' cap, como los residuos Trp conservados en las posiciones 75 y 121 en pimiento (Trp82 y Trp128 en melón), que son esenciales en el primer paso de iniciación de la traducción en ARNm eucarióticos (**Fig. 7.13**), lo que sugiere que las funciones clave del factor 4E no están afectadas. A diferencia de estos casos, en melón, la única mutación de eIF4E que se ha identificado entre los genotipos resistentes y susceptibles se localiza en la posición 228, lejos del dominio de unión al cap, y tampoco afecta a ninguno de aminoácidos altamente conservados entre eucariotas.

Esta mutación es un cambio no conservativo: una histidina (básico, polar) presente en el genotipo susceptible frente a una leucina (apolar) en el genotipo resistente. Además, cabe remarcar, que varios genotipos de melón, algunos de ellos variedades comerciales resistentes y susceptibles al virus, conservan esta misma mutación (resultados obtenidos en nuestro laboratorio no incluidos en esta tesis). Por otro lado, también se clonó el ADNc de eIF4E de *Nicotiana benthamiana*, una especie que no es infectada por el MNSV, y el aminoácido que correspondería en esta posición

es una alanina, un aminoácido hidrofóbico del mismo grupo que la Leu, presente en la línea resistente PI (C. Nieto, comunicación personal). Todo esto, sugiere que este cambio de aminoácido podría ser el responsable de la resistencia, ya que es la única diferencia existente entre las proteínas eIF4E de genotipos resistentes y susceptibles.

Así pues, se trata de la primera vez que se describe el factor eIF4E como un gen de resistencia natural contra un virus que no pertenece a la familia de los potyvirus. Su diferencia frente al resto de genes de resistencia naturales recesivos que codifican para eIF4E es la posición de la mutación que confiere la resistencia, alejada del dominio de unión a la estructura cap.

El trabajo realizado en esta tesis ha consistido en la identificación de un gen candidato para el gen de resistencia *nsv*. Sin embargo, los experimentos de complementación transitoria y/o estable serán los que confirmen que realmente el factor eIF4E es el gen de resistencia *nsv*. En este momento de depositar esta tesis, estos resultados estaban ya disponibles (C. Nieto, comunicación personal) y demostraban que *nsv* está codificado por el factor de iniciación de la transcripción 4E.

8. SNPs detectados en ESTs de melón

8. SNPs DETECTADOS EN ESTs DE MELÓN

El contenido de este capítulo ha sido publicado en la revista **Genome**.

Morales M, Roig E, Monforte A J, Arús P, Garcia-Mas J (2004). "**Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.)**." *Genome* **47**: 352-360.

En este capítulo se describen distintos métodos de detección de SNPs en secuencias ESTs de melón. Algunas de las técnicas descritas, como por ejemplo el SNaPshot, han sido utilizadas para cartografiar varios marcadores en el mapa genético de melón de alta resolución de la región del gen *nsv*, que ha permitido llevar a cabo el clonaje posicional de dicho gen.

8.1. INTRODUCCIÓN

El melón (*Cucumis melo* L.) es un cultivo hortícola de importancia económica en climas tropicales y subtropicales. Es una especie diploide ($2n = 2x = 4$) y tiene un tamaño estimado del genoma relativamente pequeño, 450 Mb (Arumuganathan y Earle, 1991). El nivel de polimorfismo en melón es relativamente elevado, como se indica en Monforte y col. (2003), en un estudio con marcadores SSR en una amplia colección de germoplasma de melón.

Se han construido varios mapas genéticos de melón principalmente con marcadores RAPD, RFLP, AFLP y SSR (Oliver y col., 2001; Périn y col., 2002), y algunos caracteres agronómicos importantes (por ejemplo, resistencia a enfermedades de tipo monogénico) han sido cartografiados en dichos mapas (Morales y col., 2002; Périn y col., 2002). La resistencia a enfermedades es uno de los objetivos más importantes en el cultivo del melón, junto con los caracteres relacionados con la calidad del fruto, como la maduración, la textura o el contenido en azúcares. La mayoría de los caracteres que controlan estos procesos presentan una herencia cuantitativa. Una vez se conoce la posición de un QTL ("quantitative trait locus") es necesario un mapa de alta resolución de la región para caracterizar completamente el QTL (Fridman y col., 2000).

Los polimorfismos de un único nucleótido ("Single-nucleotide polymorphisms": SNPs) son el tipo de variación más frecuente encontrada en el ADN (Brookes, 1999). Debido a su alta frecuencia de aparición en los genomas, los SNPs son una fuente rica de variabilidad que puede ser usada para saturar mapas genéticos. Los SNPs son también potencialmente útiles para realizar mapeado por asociación de caracteres de

interés, como se describe en algunas enfermedades genéticas humanas (Botstein y Risch, 2003).

A pesar de que individualmente los SNPs, debido su naturaleza bialélica, son menos informativos para estudios de genética de poblaciones, éstos presentan varias ventajas sobre otro tipo de marcadores, como su alta frecuencia y su fácil automatización. Iniciativas dedicadas al descubrimiento y anotación de SNPs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) han llevado a la construcción de mapas densos en humanos y en ratón (Wang y col., 1998; Lindblad-Toh y col., 2000; International SNP Map Working Group 2001). En plantas, los SNPs han sido detectados con alto rendimiento en *Arabidopsis* (Cho y col., 1999). Pero, debido al elevado coste de la tecnología para el descubrimiento y la detección de los SNPs, éstos no han sido utilizados ampliamente en plantas.

Específicamente, las colecciones de EST son una buena fuente de descubrimiento de SNPs (cSNPs) y han sido recientemente utilizadas para identificarlos en algunas especies vegetales, como la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Schneider y col., 2001), maíz (*Zea mays* L.) (Ching y col., 2002), arroz (*Oryza sativa* L.) (Nasu y col., 2002), soja (*Glycine max* L. Merr.) (Zhu y col., 2003) y la caña de azúcar (híbrido *Saccharum*) (Grivet y col., 2003).

Algunos métodos descritos permiten la detección de SNPs con un alto rendimiento. Cabe remarcar, los métodos basados en las reacciones de extensión de un único cebador, como la reacción de pirosecuenciación (Alderorn y col., 2000) y la espectrometría de masas MALDI-TOF (Rodi y col., 2002). Existen otros métodos basados en la detección de secuencias heteroduplex mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en condiciones desnaturalizantes (O'Donovan y col., 1998) o ensayos de PCR Taq-Man (Livak, 1999) entre otros. Además, también hay disponibles algunas estrategias de menor coste basadas en electroforesis en geles de agarosa, como los marcadores CAPS ("Cleaved-Amplified Polymorphic Sequence") (Konieczny y Ausubel, 1993). Escoger uno de estos métodos para la detección de SNPs, depende en gran parte del número de muestras que se van a analizar, del coste de la reacción y del proceso automatizado utilizado.

Por tanto, se realizó un estudio para estimar la frecuencia de los SNPs en secuencias codificantes de melón, y así, utilizar más frecuentemente este tipo de marcador en aplicaciones genómicas en melón. Con este propósito, un grupo de secuencias EST de melón fue usado como fuente de descubrimiento de SNPs, usando la resecuenciación de ADN de dos genotipos de melón genéticamente distantes. Algunos de los SNPs detectados fueron posicionados en un mapa genético construido

anteriormente, usando marcadores CAPS y la tecnología de la extensión del cebador único.

8.2. RESULTADOS

8.2.1. Distribución y tipos de polimorfismos

Un total de 41 secuencias EST fueron escogidas para diseñar cebadores y amplificar sobre las líneas parentales PI y PS. Los ESTs seleccionados fueron extraídos de una colección de 1085 ESTs de melón de nuestro laboratorio (datos no publicados) basados en secuencias que contenían el extremo 3' UTR y la cola de poliadenilación (poliA+). Seis ESTs correspondían a marcadores RFLP que habían sido posicionados en el mapa de melón de Oliver y col. (2001). Treinta y cuatro ESTs (82.9%) amplificaron claramente un fragmento usando ADN genómico de melón como molde (**Tabla 8.1**). Los siete ESTs restantes (17.1%) fallaron en el paso de la amplificación. En 18 (52.9%) de los ESTs amplificados, el tamaño de los fragmentos obtenidos fue mayor que el tamaño esperado de la secuencia EST. En todos los casos, esto fue debido a la presencia de al menos un intrón en la región amplificada entre los cebadores. En el resto de ESTs (16), el tamaño del fragmento amplificado fue el esperado (**Tabla 8.2**).

Se secuenciaron aproximadamente 15 kb del ADN de melón y se identificaron un total de 43 polimorfismos (34 SNPs y 9 pequeñas inserciones). La frecuencia de SNPs calculada fue de 2.26×10^{-3} en este grupo de ESTs o la equivalencia de 1 SNP cada 441 pb. Las pequeñas inserciones-deleciones (indels) ocurrían con menor frecuencia, 1 cada 1666 pb. Encontramos 11 SNPs (32%) en secuencias codificantes, mientras que los 32 restantes (68%) fueron localizados en regiones no codificantes, y tanto en la región 3' UTR o en intrones. No se localizaron indels en regiones codificantes. La longitud de los nueve indels varió entre 1 pb (el más frecuente, 5 veces) hasta 13 pb (una única vez). Se detectaron de media 1.26 polimorfismos en cada amplicón. De los 34 SNP detectados, 23 (68%) fueron transiciones mientras que 11 (32%) fueron transversiones.

Siete (64%) de los once SNPs localizados en regiones codificantes produjeron cambios sinónimos, (en seis de ellos, el SNP se localizaba en la posición tercera del codón), mientras que 4 SNPs (36%) producían cambios no sinónimos.

Tabla 8.1. ESTs seleccionados en este estudio. Se muestra su mejor homología BLASTX y su correspondiente valor E.

EST	Mejor homología con BLASTX	Especie	Valor E	Secuencias cebadores ("forward" y "reverse", 5'-3')	Accesión Genbank
CM1.8	G-box binding factor BZIP transcription factor	<i>Catharanthus roseus</i>	2e-23	CAGGCGGAGTGTGAAGAACT CGGCAATTGAAATGAAAAGC	CF675619
CM1.9	Chlorophyll a/b-binding protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	5e-63	CCATGCTCAGAGTATCCTTGC TCAGGGAGTCTCTACTTGAGAAA	CF674904
CM1.11	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-32	CAAACCTGATGCATTTCCAG GTAGTGAACCCAGCCAAAAC	CF674896
CM1.15	Ribulose-5-phosphate kinase	<i>Triticum aestivum</i>	5e-57	CTTGCTCTTACCCTGGCATC TCACAAATCTCCACCGATCA	CF674897
CM1.20	GTP-binding protein	<i>Pisum sativum</i>	6e-21	CGTGCAGGAATCAACAACA AAAGGCAAGATTCAAATTC	CF674898
CM1.21	60S ribosomal protein L1	<i>Prunus armeniaca</i>	2e-34	AACCCATCAAGAAGGGTGTG GAAGTGTAAACCTCAGTGCAAA	CF674899
CM1.32	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase	<i>Gossypium hirsutum</i>	7e-69	TTCTCCACTCTCTACGCTCCTC CTCATTTCCTTTCCCCACAG	CF674900
CM1.41	Calmodulin 7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-78	CGACGATCAGATCTCCGAGT AGAATTGCCCCATTAAGAAG	CF674901
CM1.44	Not significative	-	-	GGCTATCCACCCCAAGGATA AATGTCCAACCAGCGAAGAG	CF674902
CM1.50	EIN3-like protein	<i>Cucumis melo</i>	3e-14	ATAACATCTCCGACTTCAGAT GTATACAACCTAGGCATTAGATATT	CF674903
CM2.12	Metallothionein-like protein 1	<i>Mimulus guttatus</i>	7e-07	CAAAAGAAAAATGGCAAAC T TAGTAGAAATTAACCAGTCATAA	CF674905
CM2.20	Putative fructose biphosphate aldolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-06	TGGTGATGGTGAGTCTGACG TCATCACCAAAATGTTCCATTAAGC	CF674906
CM2.22	Putative protein transporter SEC23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5e-52	ATCCCCAGATGTGATTTTGC TCCTTTTTCAGCCTTGCACT	CF674907
CM2.46	GTP-binding protein, ras-like	<i>Vicia faba</i>	1e-37	TCCAACATTGTCGTGATGCT CACAAACAGCAACCACAACC	CF674908
CM2.48	Cystein proteinase inhibitor	<i>Cucumis sativus</i>	7e-33	AGAGATTTGTGTGTATTGAAA ATCATTAAAGGAGGGGAAAG	CF674909
CM2.68	60s ribosomal protein L27a	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5e-36	ATTTCCACAAGCTTCGCAAC CCAGACAAAATGAAAATTCACC	CF674910
CM2.75	CER1-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-32	ATGCACAAAAGGGACAATC TTTTTCATCACATTCATCCATTT	CF674911
CM2.76	Glycolytic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Antirrhinum majus</i>	2e-12	CGGAATTGCATTGAACGAC TGGAAAAACCAAATCTATTTTCGAG	CF674912
CM5.10	Calcium-binding protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	2e-05	TGGCAATGTCAAGGTCTCAA AGACATTTTTATTATGGATGACACA	CF674913
CM5.14	Putative argininosuccinate synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5e-06	CATCTCTATGGCCTCCCAAC CAACAAAACGAGCAGCCATA	CF674914
CM5.29	Water channel-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-80	GTGACTTTCGGGCTGTTTCT TTTTTCGGGAAATTACCCATT	CF674915
CM5.37	Putative receptor-like protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	5e-29	TGGTGGACAACAATTTGACCT AAAATGGAGCGCAACTAAAGCA	CF674916
CM5.50	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase precursor	<i>Avena sativa</i>	3e-82	GCTACGCTGCAGTCTCACAG CTTGTTTCATGGCATTCAAG	CF674917
CM5.61	Ferredoxin-like protein	<i>Capsicum annum</i>	1e-33	CCCAACATGGGTGAGTCTCT CAGACTCAGCCCTGCAACA	CF674918
CM5.64	Beta-glucan binding protein	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7e-11	CTTTGCAGGGCATTTCGAT AAAACCACATGTTTCAATGTATCAG	CF674919
CM6.9	Blue copper protein stellacyanin precursor	<i>Cucumis sativus</i>	1e-28	GTTGCCTTTGTTTTGGGTCT CCAACGGTGCAAACAAAGTA	CF674922
CM6.79	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase	<i>Zea mays</i>	5e-44	ACGGATGCTATGAGGGAGTC AAAAATCTGCAGTGCCCTA	CF674920
CM6.81	Cysteine proteinase inhibitor like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.002	TATCTCTATCTTGGTATTAGCGATG TGTTAAAGTTTGCATATTGTTGG	CF674921
MC203	Putative ring zinc finger protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-38	CTGAACACATTTGGCCAGAAA TGCAACATGTCTCTGTCAAG	CF674923
MC206	Histone H2B	<i>Gossypium hirsutum</i>	3e-29	GGAAGGGCAAATTTGAACA AAGGCCATGGGGATTATGA	CF674924
MC224	Extensin-like protein	<i>Glycine max</i>	9e-23	GGTACTTGCCCAAGAGATGC CTCCATAAAAATTTGGCACA	CF674925
MC252	Magnesium protophorphyrin methyltransferase	<i>Nicotiana tabacum</i>	2e-43	AGGTCCAACCTCCTCAAGGT TCGGAAGGAGCAGTTATTTCG	CF674926
MC275	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-41	AAACTTACTATGTTATCTCAGCAGATG TGGTTCAGTTCAAAAGTTCC	CF674927
MC344	Chloroplast 50S ribosomal protein L31	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-42	CTTCAACTTCAACGGCCAAAT CAGTAAAACGCCCAAATGGT	CF674928

Tabla 8.2. En esta tabla se muestra para los 34 ESTs: el tamaño predicho y real de los amplicones amplificados, el número de SNPs descubierto en cada EST, el tipo de polimorfismo y la localización y posición del SNP en la secuencia. Continúa en página siguiente.

EST	Tamaño predicho (bp)	Tamaño amplificado (bp)	Número de SNPs/indels	Posición y localización del SNP/indel
CM1.8	496	587	3	T→C 145 (intron) G→C 167 (intron) T→C 275 (coding)
CM1.9	437	437	0	-
CM1.11	446	800	3	C→T 81(coding) A→G 212 (intron) C→A 219 (intron)
CM1.15	460	1500	0	-
CM1.20	296	296	1	A→G 210 (3'UTR)
CM1.21	586	1100	2	T→C 671 (intron) T→C 948 (3' UTR)
CM1.32	532	600	0	-
CM1.41	559	2000	1	+T PS 1456 (intron)
CM1.44	530	800	1	+T PI 230 (intron)
CM1.50	260	260	1	T→C 153 (3'UTR)
CM2.12	422	750	1	A→T 200 (intron)
CM2.20	250	300	3	A→C 102 (3'UTR) +AA PS 191(3'UTR) A→T 207 (3'UTR)
CM2.22	365	365	2	T→C 128 (coding) C→T 166 (coding)
CM2.46	482	800	0	-
CM2.48	400	400	1	G→T 142 (coding)
CM2.68	323	323	0	-
CM2.75	491	588	3	T→A 181 (intron) C→T 283 (coding) T→C 476 (3'UTR)
CM2.76	386	487	2	C→T 161 (intron) C→T 272 (3'UTR)
CM5.10	491	491	1	G→C 366 (3'UTR)
CM5.14	351	351	0	-
CM5.29	727	900	1	+T PI 113 (3'UTR)
CM5.37	458	600	0	-
CM5.50	351	700	6	T→C 316 (intron) C→T 340 (intron) A→G 377 (intron) T→C 379 (intron) +13 bp PS 442 (intron) C→G 459 (intron)
CM5.61	307	307	0	-

EST	Tamaño predicho (bp)	Tamaño amplificado (bp)	Número de SNPs/indels	Posición y localización del SNP/indel
CM5.64	330	420	1	A→T 238 (3'UTR)
CM6.9	325	650	2	T→C 72 (coding) +A PS 258 (intron)
CM6.79	447	1000	3	+T PI 109 (intron) +AAG PS 463 (intron) A→G 483 (intron)
CM6.81	390	390	2	A→G 134 (coding) A→G 301 (coding)
MC203	313	313	0	-
MC206	383	383	1	C→T 21 (coding)
MC224	495	495	1	+GTT PI 299 (3'UTR)
MC252	1204	1204	1	C→T 166 (coding)
MC275	556	556	0	-
MC344	690	800	0	-

8.2.2. Detección de SNPs y mapeado

Se utilizaron tres diferentes métodos para establecer un sistema eficiente de mapeado de SNPs en melón. El primero consistió en la identificación de enzimas de restricción que cortaran selectivamente uno de los alelos en las inmediaciones de la posición del SNP o del indel, produciendo marcadores CAPS. Para el 70% de los ESTs que contenían SNPs, al menos un enzima de restricción podía distinguir entre ambos alelos. Pero varios de estos enzimas no estaban disponibles comercialmente. Seis de los amplicones EST fueron digeridos con el enzima de restricción predicho en seis posiciones SNP (CM2.22 con *Bfal*, CM5.50 con *TaqI*, CM1.11 con *AluI*, CM1.21 con *NlaIII*, CM1.41 con *MspI* y MC252 con *AluI*). Para CM1.11, CM 1.21 y CM2.22 se obtuvieron un gran número de fragmentos después de la digestión con sus enzimas respectivos, y por tanto, no se pudieron interpretar correctamente, y estos fueron descartados. En los 3 restantes, el polimorfismo fue claramente visible incluso en genotipos heterocigotos y fue adecuado para genotipar en la población de LDHs (**Fig. 8.1**).

Se exploró un método alternativo para genotipar SNPs: la tecnología de la extensión del cebador único con SNaPshot. Para CM1.11, se diseñó un cebador interno para la detección del SNP C →A en la posición 219. La reacción de la extensión del cebador produjo una buena detección de ambos alelos C y A en ambas líneas parentales como se muestra en la **figura 8.2**. El pico del alelo C (PI 161375)

define una banda de peso molecular más bajo cuando es comparada con el pico del alelo A (“Piel de Sapo”). En un individuo de la F1 ambos picos están presentes, confirmando que este tipo de marcador es codominante.

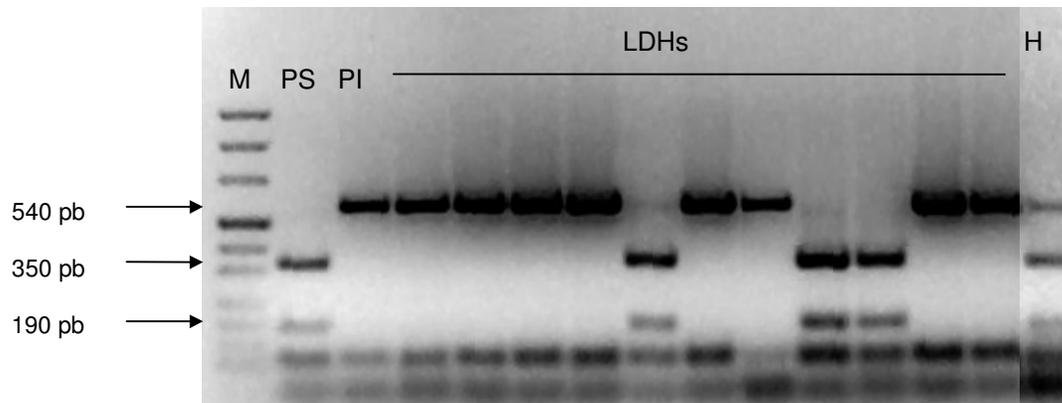


Figure 8.1. Marcador CAPS desarrollado a partir del SNP CM5.50 después de la digestión del producto de PCR con el enzima *TaqI*. La banda de 540 pb representa el alelo de la línea parental resistente PI, mientras que el alelo de la línea susceptible PS corresponde a las dos bandas de 350 y 190 pb. El individuo H presenta las 3 bandas. M: marcador de peso molecular pUC Mix, PI: PI 161375, PS: Piel de Sapo, LDHs: 11 líneas doble haploides de la población que fue cartografiada. H: Heterocigoto

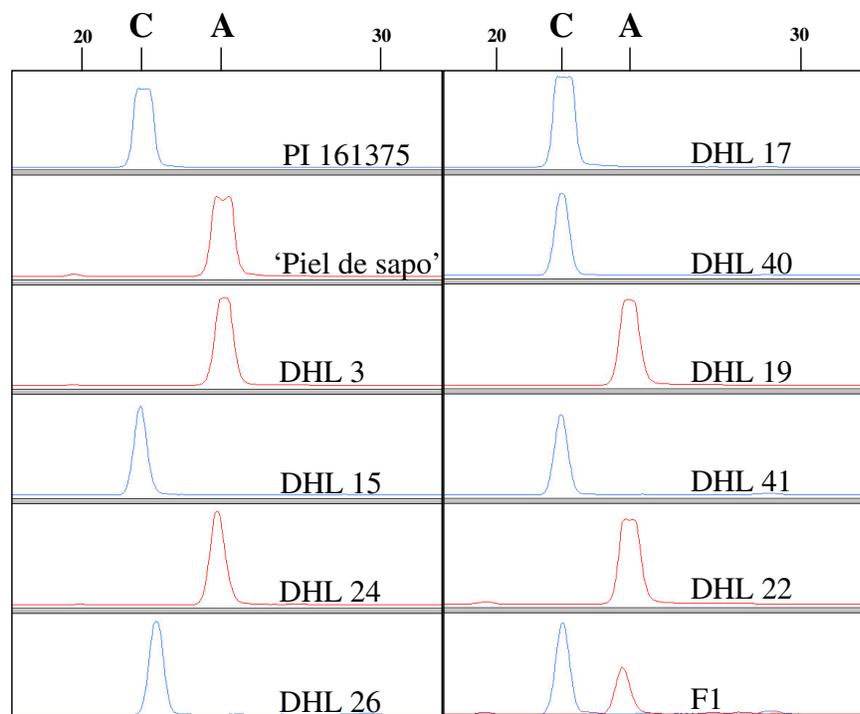


Fig. 8.2. Detección del SNP CM1.11 con la reacción de la extensión del cebador único usando dideoxinucleótidos (SNaPshot). Se muestra el producto de la reacción en las dos líneas parentales y en 9 líneas LDHs de la población. El pico de menor peso molecular corresponde con el alelo C y el de mayor peso con el alelo A. Los números de la parte superior de la figura indican el tamaño del producto de extensión en pb.

Finalmente, para el EST MC224, que contiene una inserción de 3 pb en el alelo PI, se diseñaron cebadores específicos flanqueantes a la inserción que amplificaron un pequeño fragmento de 92 pb. Después de la amplificación, los fragmentos resultantes fueron detectados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, usados también para la detección de SSRs. Un cebador específico fue marcado con el fluorocromo IRD-800 y el producto fue visualizado en un secuenciador LICOR (datos no mostrados). Este EST había sido previamente mapeado como un RFLP en el mapa genético de Oliver y col. (2001).

Cinco ESTs que mostraban un SNP entre las líneas parentales PI y PS fueron cartografiados en este mapa genético de melón (CM1.11, CM1.41, CM5.50, MC252 y MC224). El marcador MC224 mapeaba en el grupo de ligamiento G12, MC252 y CM4.14 en el grupo de ligamiento G8, CM5.50 en el grupo de ligamiento G5 y CM1.11 en el grupo de ligamiento G10. Para MC224 y MC252, la posición del SNP en el mapa fue idéntica a la original obtenida con su correspondiente RFLP.

8.3. DISCUSIÓN

La frecuencia de SNPs en las regiones codificantes en melón se ha estimado en este estudio usando un número pequeño de ESTs (34) y las líneas parentales del mapa de referencia construido por Oliver y col (2001). Una de las líneas (PI 161375) es una accesión coreana incluida en el grupo *Conomon*, mientras que la otra (“Piel de Sapo”) pertenece al grupo *Inodorus* (Monforte y col., 2003). Pertenecen a dos de los grupos más distantes del melón cultivado, como se determinó previamente con distintos marcadores (García-Mas y col., 2000; Monforte y col., 2003). Hemos encontrado que el 67% de los ESTs analizados contienen al menos un SNP o un indel entre las dos líneas parentales en la región secuenciada. Este valor es similar a la frecuencia de sondas que detectan un RFLP polimórfico en las mismas líneas parentales. (65%, Oliver *et al.* 2001). Para cada EST secuenciamos sólo una de las cadenas del amplicón, con una media de 440 pb. En los ESTs monomórficos CM1.15, CM1.32, CM2.46, CM5.37 y MC344, el tamaño del fragmento amplificado era mayor que la media de la región secuenciada (Tabla 8.2), quedando regiones de unos 420 pb/amplicon sin analizar. Esto significa que SNPs adicionales podrían estar presentes en estas regiones no analizadas, incrementando así la media del número total de ESTs polimórficos. En siete ESTs (17%) no hubo amplificación de ningún fragmento de ADN, probablemente debido a la presencia de largas secuencias intrónicas, al igual que ha sido publicado en otras especies (Bhatramakki y col., 2002; Nasu y col., 2002).

La frecuencia observada de SNPs entre las dos líneas parentales fue elevada, con un valor medio de 1 SNP cada 441 pb. Además de los SNPs, también identificamos pequeños indel con una media relativamente elevada de 1 cada 1666 pb. En humanos, la frecuencia de SNPs entre los cromosomas equivalentes es aproximadamente de 1 cada 1000 pb (Brookes, 1999), menos que la mitad del valor detectado entre los dos genotipos de melón examinados aquí. En *Arabidopsis thaliana*, la disponibilidad de la secuencia completa del genoma del ecotipo Col-0 y la secuencia parcial del ecotipo Ler ha permitido la estimación bioinformática de las frecuencias de SNPs o indels (Jander y col., 2002). Como resultado, se detecto un SNP cada 3.3 Kb y un indel cada 6.6 Kb. En la remolacha azucarera, la frecuencia estimada de SNPs, usando dos genotipos evaluados con 37 ESTs, fue de un SNP por cada 130 pb (Schneider y col., 2001). En un estudio reciente realizado entre 36 líneas cultivadas de maíz y 17 ESTs, se detectaron como media 1 SNP cada 60.8 pb y un indel cada 126 pb (Ching y col., 2002). La media entre 5 genotipos de arroz y una especie de la familia *Oryza* fue de un SNP cada 89 pb y entre dos genotipos seleccionados al azar fue menor, uno cada 232 pb (Nasu y col., 2002).

Los valores mencionados anteriormente en humanos, arroz y *Arabidopsis* fueron obtenidos de secuencias genómicas que contenían regiones codificantes y no codificantes. Sin embargo, estos datos no son directamente comparables con los que hemos obtenido nosotros en melón, ya que en nuestro caso sólo fueron utilizadas regiones codificantes y regiones vecinas como el 3'UTR e intrones. Así pues, la actual frecuencia de SNPs en melón podría estar subestimada por que sólo fueron analizadas regiones codificantes, en las cuales el índice de polimorfismo es menor que en regiones no codificantes. No obstante, estos primeros datos sugieren que el nivel de polimorfismo entre estos dos genotipos de melón no es tan elevado como el valor medio encontrado en arroz, maíz o remolacha azucarera, pero mayor que el indicado para *Arabidopsis*.

En concordancia con los datos publicados en humanos y remolacha azucarera (Wang y col., 1998; Schneider y col., 2001), encontramos un 68% de transiciones y 32% de transversiones. Al observar los SNPs que ocurren en regiones codificantes, la proporción de SNPs sinónimos y no sinónimos fue comparable con los valores descritos en maíz (63% sinónimos en melón frente a 72% de sinónimos en maíz (Ching y col., 2002)). Zhu y col. (2003) han descrito recientemente que la baja relación de mutaciones sinónimas frente a las no sinónimas en soja (2.6, similar al 1.7 en melón) podría sugerir la presencia de un nivel relativamente elevado de mutaciones ligeramente deletéreas. Había más SNPs en regiones no codificantes intrónicas y en 3'

UTR (23) que en regiones codificantes (11). Esto también fue observado en maíz (Ching y col., 2002) y en soja (Zhu y col., 2003). Este punto es importante, y sugiere que el descubrimiento de SNPs podría enfocarse hacia el 3' UTR del ADNc o en posiciones conocidas donde se localizarían los intrones. Sería conveniente una búsqueda previa en las bases de datos para conocer la posición de intrones en genes ortólogos correspondientes a los EST de melón, ya que podría ayudar para la predicción de la posición del correspondiente intrón en el gen de melón. Seleccionando cebadores que flaquearan estos intrones se podría maximizar la probabilidad de encontrar polimorfismos (SNPs o indels).

Una tecnología optimizada para la detección de SNPs debería de ser fácilmente manejable, de bajo coste y con la posibilidad de genotipar cientos de muestras en una operación de alto rendimiento. La decisión de utilizar marcadores CAPS es la más sencilla cuando el SNP ocurre en una diana de restricción. Para los 24 ESTs en los que al menos identificamos un SNP o un indel, sólo el 70% se podían detectar potencialmente como CAPS. Aproximadamente la mitad de estos marcadores no fueron útiles porque el enzima no se encontraba disponible comercialmente o por que el patrón de bandas obtenido fue difícil de interpretar. La conclusión es que los marcadores basados en CAPS son adecuados para mapear sólo en una pequeña parte de los SNP en melón y que este sistema no debería considerarse para un programa de detección de SNPs a gran escala en melón, por que no es de fácil automatización.

Como alternativa a los marcadores CAPS, cuya automatización es razonable, aplicamos con éxito el método SNaPshot para detectar y mapear el SNP CM1.11. El protocolo de la extensión del cebador funciona eficazmente, sin embargo, el coste de la reacción es demasiado elevado y el proceso requiere dos pasos de purificación previos a la detección del SNP, incrementando así el tiempo requerido para la detección del SNP. Para pequeños indel, como el presente en CM224, una alternativa simple de genotipado podría ser la detección de un polimorfismo de pequeño tamaño usando geles de acrilamida desnaturalizantes, como ha sido sugerido por Bhatramakki y col (2002) para maíz. El genotipado de CM224 fue realizado gracias a la presencia de un indel. Otros marcadores de melón han sido mapeados con éxito en nuestro laboratorio usando ambos métodos, SNaPshot y polimorfismo de tamaño, confirmado su aplicabilidad (J. Garcia-Mas, datos no publicados).

Otros métodos han sido utilizados en plantas para detectar SNPs, como el polimorfismo de conformación de cadena simple o el análisis de los heteroduplex (Martin-Lopes y col., 2001; Schneider y col., 2001), detección de SNPs con la reacción

de extensión con un único cebador con AcycloPrime FP (Nasu y col., 2002), cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (Kota y col., 2001) o chips de ADN (Cho y col., 1999). En este momento, ninguno de estos métodos presentan claras ventajas para su inmediata aplicación.

Preveamos el descubrimiento de SNPs a partir de ESTs de melón como un excelente medio para obtener marcadores de alta calidad para saturar el mapa genético de melón. La tecnología de los SNPs nos permitiría mapear ESTs candidatos asociados con caracteres agronómicos y obtener un mapa de transcritos, el cual puede ser comparado directamente con posiciones de QTLs identificados previamente. La determinación de las frecuencias alélicas para cada SNP identificado en una colección amplia de genotipos que representan el germoplasma de melón y el estudio de la estructura del haplotipo de algunos de estos loci serían vías rentables de investigación para la gestión y mejora de germoplasma.

9. Discusión general

9. DISCUSIÓN GENERAL

El trabajo presentado en esta tesis describe la caracterización genética y molecular del gen de resistencia *nsv* frente al virus MNSV. El locus *nsv* ha sido clonado mediante la combinación de una aproximación de clonaje posicional y de mapeo comparativo con *Arabidopsis*. Mediante la aproximación de clonaje posicional hemos construido un mapa genético de alta resolución de la región del gen *nsv*, construido un "contig" de BACs y finalmente identificado el BAC 1-21-10 que contenía físicamente el gen *nsv*.

Éste es un ejemplo más del clonaje de un gen de resistencia en una especie cultivada mediante la estrategia de clonaje posicional de los muchos que hay descritos en la literatura, entre ellos los genes de tomate *Pto* (Martin y col., 1993) y *Pfr* (Salmeron y col., 1996) que confieren resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, *I2* que confiere resistencia a *Fusarium oxysporum* (Simons y col., 1998), *Sw5* que confiere resistencia a *Tospovirus* (Brommonschenkel y Tanksley, 1997); el gen *mlo* de cebada que confiere resistencia de amplio espectro a *Eryshiphe graminis* f.sp. *hordei* (Buschges y col., 1997), los genes de arroz *Xa-21* (Song y col., 1995) y *Xa1* (Yoshimura y col., 1998) que confieren resistencia a *Xantomonas*, el gen de *Bs2* de pimiento que confiere resistencia a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Tai y col., 1999), o el gen *Rx1* de patata que confiere resistencia a PVX (Bendahmane y col., 1999), entre muchos otros.

La gran mayoría de los genes de resistencia dominantes que han sido caracterizados en plantas codifican para proteínas que presentan dominios NBS-LRRs (Hammond-Kosack y Parker, 2003). En melón, el único gen de resistencia dominante caracterizado hasta ahora es *Fom-2* que confiere resistencia frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* razas 0 y 1 y codifica para una proteína NBS-LRR que no presenta el dominio TIR (Joobeur y col., 2004), por tanto, *nsv* sería el primer gen recesivo clonado en melón. Pocos genes de resistencia recesivos han sido caracterizados hasta la fecha. Entre ellos se encuentran el gen *mlo* que confiere resistencia frente al hongo *Eryshiphe graminis* f. sp. *hordei* en cebada y probablemente codifica para un regulador negativo de la muerte celular y/o de la resistencia del patógeno (Buschges y col., 1997), *prv2* que confiere resistencia frente al PVY en pimiento (Ruffel y col., 2002), *mo1* frente al LMV en lechuga (Nicaise y col., 2003) y el gen *sbm1* frente el PsBMV en guisante (Gao y col., 2004). Los tres últimos casos descritos son de genes de resistencia contra virus que codifican para el factor de iniciación de la traducción en eucariotas 4E (eIF4E), que forma parte del complejo de

traducción de la planta huésped. La hipótesis que explicaría la resistencia recesiva frente a estos tres virus es que se debe a una pérdida de función o a mutaciones en genes de plantas que necesita el patógeno para crecer y reproducirse (Vogel y Somerville, 2000). Por tanto, el clonaje del gen de resistencia recesivo *nsv* es de gran interés por que nos permitirá entender cómo funcionan los mecanismos de reconocimiento entre la planta huésped y el virus MNSV, así como, el tipo de respuesta de defensa de la planta.

Gracias a la microsintenia existente en esta región entre el genoma de melón y el de *Arabidopsis* se ha identificado el factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E (eIF4E) como un gen candidato para *nsv*, localizado en el BAC F15J5 del genoma de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org). Este mismo factor ha sido descrito como el responsable de otros genes de resistencia naturales recesivos en pimiento (*pvr2*), lechuga (*mo1*) y guisante (*sbm1*) que confieren resistencia frente a distintos potyvirus. El clonaje del ADNc del eIF4E de melón a partir de la línea resistente PI y de las dos susceptibles, Ved y WMR, nos permitió observar que un único cambio de un aminoácido en este gen distingue entre genotipos resistentes y susceptibles, lo que indica que probablemente éste sea el responsable de la resistencia.

Además, en *Arabidopsis* se han identificado los mutantes *cum1* y *cum2* que inhiben la multiplicación del CMV. Estos mutantes presentan unos niveles muy bajos de la proteína 3a necesaria en el movimiento célula a célula del virus y esto provoca un retraso de la multiplicación del CMV en plantas. Mediante el clonaje posicional se demostró que *cum1* y *cum2* codificaban para eIF4E y eIF4G respectivamente (Yoshii y col., 2004). Por otro lado, el locus asociado con la disminución de susceptibilidad a TuMV *lsp1* (*loss-of-susceptibility to potyvirus*) fue aislado mediante clonaje posicional en *Arabidopsis* y el gen codificaba para eIF(iso)4E (Lellis y col., 2002). Estos mutantes presentan un desarrollo normal a pesar de carecer de eIF(iso)4E y no pueden soportar la infección de TuVM, ni tampoco la de TEV, lo cual sugiere que eIF4E, la proteína de unión al cap, no puede compensar la falta de eIF(iso)4E durante la infección de estos virus (Lellis y col., 2002).

Una vez identificado el gen candidato para *nsv*, la confirmación de que eIF4E es realmente el gen de resistencia se obtendría mediante experimentos de complementación. Así pues, experimentos de complementación transitoria en melón consistentes en bombardear hojas de un genotipo resistente y otro susceptible con dos construcciones, una del virus y otra del ADNc del eIF4E susceptible, confirmaron la existencia de complementación (C. Nieto, comunicación personal). El virus es capaz de multiplicarse en plantas resistentes bombardeadas con el virus y con el ADNc del

eIF4E del genotipo susceptible, indicando así que eIF4E es el factor de la planta que el virus necesita para multiplicarse. La detección de la replicación del virus en las plantas resistentes transformadas se realizó primero mediante RT-PCR y estas fueron confirmadas mediante los análisis por Northern correspondientes (C. Nieto, comunicación personal). Por tanto, podemos confirmar que una mutación en el factor eIF4E de melón confiere resistencia contra el virus MNSV, siendo ésta la primera vez que se describe en un virus que no pertenece a la familia de los potyvirus.

En células eucarióticas, la mayoría de ARNm nucleares, presentan en 5' una estructura cap (m^7GpppN , donde m es un grupo metilo y N es cualquier nucleótido) y una cola de poliadenilación (poliA) en 3'. El factor de iniciación de la traducción de eucariotas 4E (eIF4E) se pone en contacto directo con el ARNm mediante la unión al cap y media el reclutamiento de los ribosomas y, por tanto, está directamente implicado en el inicio de la traducción de proteínas. En mamíferos el factor eIF4E está asociado con la proteína eIF4G y forman el núcleo del complejo eIF4F. eIF4G es una proteína de gran peso molecular que sirve de anclaje para otras pequeñas subunidades, como la eIF4A helicasa y el eIF3 que recluta la subunidad ribosomal 40S. La proteína de unión a la cola poliA (PABP) también está unida a eIF4G y produce la circularización del ARNm. La presencia simultánea del cap y de la cola poliA actúa sinérgicamente para promover la traducción del ARNm (Tarun y Sachs, 1996). En levaduras y plantas, el complejo eIF4F está formado sólo por dos proteínas: eIF4E y eIF4G. En plantas se han identificado dos complejos, eIF4F y eIF(iso)4F, con sus respectivas subunidades, eIF4E y eIF(iso)4E para la unión al cap, y eIF4G y eIF(iso)4G como subunidades de anclaje (Browning, 1996).

En los virus de ARN su multiplicación depende de la maquinaria de traducción del huésped y esto implica que proteínas virales interaccionen con proteínas del huésped. Los potyvirus no presentan en el extremo 5' del ARN la estructura cap, en su lugar presentan una proteína unida covalentemente llamada VPg, codificada por el genoma del virus. Se ha identificado la existencia de interacción entre la proteína VPg del TuMV y el factor eIF(iso)4E de *Arabidopsis* (Wittmann y col., 1997) lo que sugiere la participación de la VPg con el inicio de la traducción de proteínas virales. También se ha identificado la interacción de la VPg de TuMV y el eIF(iso)4E de trigo (Leonard y col., 2000), y que esta interacción era necesaria para la infectividad del virus. Una única sustitución de un ácido aspártico en el dominio de interacción de la VPg con eIF(iso)4E impide totalmente esta interacción y no se produce infección viral (Leonard y col., 2000). Otros virus carecen de la estructura 5'-cap, de la cola poli A o de ambas, y sin embargo, son eficientemente transcritos en las células huésped a través de

mecanismos que ha desarrollado cada virus (Gallie, 1996). Algunos de los virus ARN que carecen de la cola poliA pero presentan el cap, contienen elementos en la secuencia del extremo 3'UTR que incrementan la eficiencia de la traducción, como en el TMV y BMV (Gallie y Walbot, 1990; Lahser y col., 1993). Otros virus de ARN de plantas, como el virus del enanismo amarillo de la cebada (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV), el virus del arrugado del nabo (*Turnip crinkle virus* TCV), el virus del enanismo ramificado del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) y el virus satélite de la necrosis del tabaco (*Satellite tobacco necrosis virus*, STNV) carecen de las dos estructuras, cap y cola poliA (Danthinne y col., 1993; Allen y col., 1999; Wu y White, 1999; Qu y Morris, 2000). La traducción de BYDV depende estrictamente de una secuencia 3' TE ("transcription enhancer") localizada en el 3'UTR que actuaría como una secuencia potenciadora de la traducción de manera independiente al cap. Se ha visto que eIF4E está implicado en esta secuencia TE *in vitro*, además de que el 5'UTR del ARN de BYDV era necesario para la función del TE (Wang y col., 1997a). Los virus de ARN TCV, TBSV y STNV también contienen las secuencias TE en sus 3'UTR y sus extremos 5'UTR también son necesarias para una eficiente traducción (Danthinne y col., 1993; Wu y White, 1999; Qu y Morris, 2000). Además recientemente, se ha encontrado la existencia de una nueva interacción de los complejos eIF4F y eIFiso4F con el fragmento 3' TE de STNV de unos 130 nucleótidos, sugiriendo que este TE localizado en el 3'UTR imita las funciones de la estructura cap de los ARNm eucarióticos (Gazo y col., 2004). El virus MNSV pertenece al género *Carmovirus*, y parece probable que no presente cap en 5' del ARN genómico, al igual que otros carmovirus como TCV.

El trabajo realizado por Díaz-Pendón (2004a) demostró que la resistencia conferida por *nsv* actúa a nivel unicelular: el aislado MNSV-M α 5 no era capaz de replicarse en protoplastos del genotipo resistente Planters Jumbo (*nsv/nsv*). Además, la identificación de un aislado del virus capaz de superar esta resistencia en melones de genotipo resistente, descrita como MNSV-264, (Díaz y col., 2000), permitió la construcción de mutantes quiméricos entre MNSV-M α 5 y MNSV-264, demostrando así que la capacidad de superar la resistencia residía en la región 3' terminal del ARN genómico del virus. El análisis de las secuencias entre MNSV-264 y la de dos aislados que no superaban la resistencia, MNSV- α 5 y MNSV-Dutch (Riviere y Rochon, 1990) indicaron que las diferencias se localizaban en la región 3'-UTR, con una identidad nucleotídica inferior al 50%, a diferencia del 5'-UTR que presenta un 96% y 75% de identidad nucleotídica con MNSV-Dutch y MNSV- α 5 respectivamente (Díaz-Pendón, 2004a). Además, el análisis de predicción de estructuras secundarias de los 3'-UTR

muestra un mayor número de horquillas, o sea, una mayor estructuración en el caso de MNSV-264 que en las cepas que no superan la resistencia. Podría ser que algunas de las horquillas específicas del MNSV-264 estén implicadas en la capacidad de superar la resistencia (Díaz-Pendón, 2004a).

En definitiva, nuestros resultados han proporcionado fuerte evidencia a favor de que el gen de resistencia *nsv* corresponde al factor eIF4E de melón. Nuestra hipótesis es que el virus MNSV utilizaría el factor eIF4E como paso inicial para multiplicarse y la interacción con una región del extremo 3' UTR sería necesaria para ello. La mutación en el factor eIF4E de melón (un cambio de un único aminoácido en la posición 228 de la proteína, lejos del dominio de unión al cap) podría hacer incompatible esta interacción y el virus no sería capaz de replicarse. Esto se corroboraría con la predicción del modelo en 3D de la proteína eIF4E de melón (resultados obtenidos en nuestro laboratorio no incluidos en esta tesis). Este modelo se ha obtenido gracias a la alta conservación en las secuencias de eIF4E entre eucariotas y la disponibilidad de estructuras 3D de la proteína eIF4E de ratón y levadura (Marcotrigiano y col., 1997; Matsuo y col., 1997). Esta predicción de la estructura muestra que la mutación de eIF4E de melón se localizaría en la superficie de la proteína, sugiriendo una posible interacción con algún factor del virus, probablemente con una región del 3'UTR. Así pues, a pesar de que la mutación no afecta al dominio de unión al cap, ésta podría afectar a la estructura y/o a la función de la proteína. Esto sugiere que en melón se puede haber desarrollado una nueva estrategia para evitar la infección de este virus, diferente a la sugerida para potyvirus, ya que la mutación que confiere resistencia a MNSV es una mutación en el factor eIF4E que se localiza en una posición alejada del dominio de unión al cap, a diferencia de las mutaciones que afectan a eIF4E que confieren resistencia a varios potyvirus, localizadas todas ellas en aminoácidos cercanos o del dominio de unión a la estructura cap. Por otro lado, la cepa que es capaz de superar la resistencia, MNSV-264, con un 3' UTR muy diferente, podría no necesitar *nsv* para multiplicarse.

10. Conclusiones

10. CONCLUSIONES

Los principales resultados obtenidos en esta tesis permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha cartografiado el gen *nsv* en el grupo de ligamiento 11 del mapa genético de melón elaborado en nuestro laboratorio.
2. Se ha elaborado un mapa genético de media resolución en una población F_2 de 408 individuos en la región del gen *nsv* con una resolución estimada de 0.12 cM/evento de recombinación. Se han identificado los marcadores 1L3 y 5B3sp6 separados 0.49 cM y flanqueando al gen que se sitúa a 0.245 cM de cada uno de ellos y el marcador 52K20sp6 que cosegrega con *nsv*.
3. Se ha elaborado un mapa genético de alta resolución de la región del gen *nsv* usando una población BC1 de 2727 individuos con una resolución estimada de 0.036 cM/evento de recombinación. Los marcadores 1L3 y 10O16sp6 flanquean al gen *nsv* a las distancias estimadas de 0.245 y 0.47 cM, respectivamente y el marcador 52K20sp6 cosegrega con el mismo.
4. Se han elaborado dos mapas físicos de la región del *nsv* a partir de dos genotecas de BACs, obtenidas a partir de la línea resistente PIT92 y de la línea susceptible WMR-29.
5. Se ha identificado el BAC 1-21-10 que contiene físicamente el gen *nsv*, y que proviene de la genoteca de la línea susceptible WMR-29.
6. Se ha identificado la existencia de microsintenia entre la región del gen de resistencia *nsv* del genoma de melón y una región del cromosoma 4 de *Arabidopsis*.
7. Se ha identificado un gen candidato para *nsv*, el factor de iniciación de la traducción eIF4E, en base a la microsintenia con dicha región del genoma de *Arabidopsis*.
8. Es la primera vez que se describe el factor eIF4E como el responsable de la resistencia frente a un virus que no pertenece a la familia de los potyvirus.

11. Bibliografía

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlquist P, Noueiry A O, Lee W M, Kushner D B y Dye B T** (2003). "Host factors in positive-strand RNA virus genome replication." *J Virol* **77**: 8181-8186.
- Alderorn A, Kristofferson A y Hammerling U** (2000). "Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate." *Genome Res.* **10**: 1249-1258.
- Álvarez J M** (1997). Melones. Compendios de Horticultura nº10. p 25-34. Reus.
- Allen E, Wang S y Miller W A** (1999). "*Barley yellow dwarf virus* RNA requires a cap-independent translation sequence because it lacks a 5' cap." *Virology* **253**: 139-144.
- Arumuganathan K y Earle E D** (1991). "Nuclear DNA content of some important plant species." *Plant Mol Bio Rep* **9**: 211-215.
- Avgelis A** (1985). "Occurrence of *Melon necrotic spot virus* in Crete (Greece)." *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **114**: 365-372.
- Avgelis A** (1990). "*Melon necrotic spot virus* in plastic houses on the island of Crete." *Acta Hort ISHS* **287**: 349-352.
- Baudracco-Arnas S y Pitrat M** (1996). "A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers." *Theor Appl Genet* **93**: 57-64.
- Bendahmane A, Kanyuka K y Baulcombe D** (1999). "The *Rx* Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses." *Plant Cell* **11**: 781-791.
- Bendahmane A, Kanyuka K y Baulcombe D C** (2000). "*Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato." *Plant Journal* **21**: 73-81.
- Bendahmane A, Kohn B A, Dedi C y Baulcombe D C** (1995). "The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx1*-mediated virus resistance in potato." *Plant J* **8**: 933-941.
- Benich A J y Anderson R S** (1974). "Novel properties of satellite DNA from muskmelon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1511-1515.
- Bennetzen J L** (2000). "Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: microcolinearity and its many exceptions." *Plant Cell* **12**: 1021-1029.
- Bent A F** (1996). "Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure." *Plant Cell* **8**: 1757-1771.
- Bent A F, Kunkel B N, Dahlbeck D, Brown K L, Schmidt R, Giraudat J, Leung J y Staskawicz B J** (1994). "*RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes." *Science* **265**: 1856-1860.
- Berdiales B, Bernal J J, Sáez E, Woudt B, Beitia F y Rodríguez-Cerezo E** (1999). "Occurrence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) and beet pseudo-yellows virus in cucurbit crops in Spain and transmission of CYSDV by two biotypes of *Bemisia tabaci*." *European Journal of Plant Pathology* **105**: 211-215.
- Bhatramakki D, Dolan M, Hanafey M, Wineland R, Vaske D, Register J C, Tingey S V y Rafalski A J** (2002). "Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occurs frequently and can be used as highly informative genetic markers." *Plant Mol Biol* **48**: 539-547.
- Birnbom H C y Doly J** (1979). "A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acid Res* **7**: 1513-1522.
- Bonas U y Lahaye T** (2002). "Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition." *Curr Opin Microbiol* **5**: 44-50.

- Bos L, van Dorst J M, Huttinga H y Maat D Z** (1984). "Further characterization of *Melon necrotic spot virus* causing severe disease in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control." *Neth J PI Path* **90**: 69-72.
- Botella M, Parker J, Frost L, Bittner-Eddy P, Beynon J, Daniels M, Holub E y JD J** (1998). "Three genes of the Arabidopsis *RPP1* complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants." *Plant Cell* **10**: 1847-1860.
- Botstein D y Risch N** (2003). "Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease." *Nat Genet* **33**: 228-237.
- Brommonschenkel S H y Tanksley S D** (1997). "Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato." *Mol Gen Genet* **256**: 121-126.
- Brookes A J** (1999). "The essence of SNPs." *Gene* **234**: 177-186.
- Browning K S** (1996). "The plant translational apparatus." *Plant Mol Biol* **32**: 107-144.
- Brueggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B y Kleinhofs A** (2002). "The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9328-9333.
- Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F y Schulze-Lefert P** (1997). "The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance." *Cell* **88**: 695-705.
- Campbell R N** (1996). "Fungal transmission of plant viruses." *Annu Rev Phytopathol* **34**: 87-108.
- Clepet C, Le Clainche I y Caboche M** (2004). "Improved full-length cDNA production based on RNA tagging by T4 DNA ligase." *Nucleic Acids Res* **32**: e6.
- Coudriet D L, Nishaba A N y Bohn G W** (1981). "Inheritance of resistance to *muskmelon necrotic spot virus* in a melon aphid-resistant breeding line of muskmelon." *J Amer Soc Hort Sci* **106**: 798-791.
- Cuadrado I M, Gomez J y Moreno P** (1993). "El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. I. Importancia del MNSV como causa de la muerte súbita del melón." *Bol San Veg Plagas* **19**: 96-106.
- Ching A, Caldwell K S, Jung M, Dolan M, Smith O S, Tingey S, Morgante M y Rafalski A J** (2002). "SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines." *BMC Genet* **3**: 19.
- Cho R J, Mindrinos M, Richards D R, Sapolsky R J, Anderson M, Drenkard E, Dewdney J, Reuber T L, Stammers M, Federspiel N, Theologis A, Yang W-H, Hubbell E, Au M, Chung E Y, Lashkari D, Lemieux B, Dean C, Lipshutz R J, Ausubel F M, Davis R W y Oefner P J** (1999). "Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*." *Nat Genet* **23**: 203-207.
- Dangl J L** (1992). "Applications of *Arabidopsis thaliana* to outstanding issues in plant-pathogen interactions." *Int Rev Cytol* **144**: 53-83.
- Dangl J L** (1995). The enigmatic avirulence gene of phytopathogenic bacterial. Bacterial pathogenesis of plants and animals, molecular and cellular mechanisms. Dangl J L. Berlin: 91-118.
- Dangl J L, Dietrich R A y Richberg M H** (1996). "Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions." *Plant Cell* **8**: 1793-1807.
- Dangl J L y Jones J D** (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *Nature* **411**: 826-833.
- Daning- Poleg Y, Reis N, Baudracco-Arnas S, Pitrat M, Staub J E, Oliver M, Arús P, de Vicente M C y Katzir N** (2000). "Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging." *Genome* **43**: 963-974.
- Danthinne X, Seurinck J, Meulewaeter F, van Montagu M y Cornelissen M** (1993). "The 3' untranslated region of *Satellite tobacco necrosis virus* RNA stimulates translation *in vitro*." *Mol Cell Biol* **13**: 3340-3349.

- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng D X, Bittner-Eddy P, Beynon J y Marco Y** (2002). "Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2404-2409.
- Díaz J A, Bernal J J, Moriones E y Aranda M A** (2000). Caracterización de una cepa del virus de las manchas necróticas del melón que supera la resistencia conferida por *nsv*. Resúmenes del X congreso Sociedad Española de Fitopatología, Valencia, España.
- Díaz J A, Bernal J J, Moriones E y Aranda M A** (2003). "Nucleotide sequence and infectious transcripts from a full-length cDNA clone of the carmovirus *Melon necrotic spot virus*." *Arch Virol* **148**: 599-607.
- Díaz-Pendón J A** (2004a). Resistencia genética en melón (*Cucumis melo*) a virus de importancia agrícola: virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) y virus del mosaico de las sandía (WMV). Tesis doctoral. Córdoba, Universidad de Córdoba: 165.
- Díaz-Pendón J A, Truniger V, Nieto C, Garcia-Mas J, Bendahmane A y Aranda M A** (2004b). "Advances in understanding recessive resistance to plant viruses." *Molecular Plant Pathology* **5**: 223-233.
- Díaz J A, Nieto C, Moriones E, Truniger V y Aranda M A** (2004). "Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and non-host plants." *Mol Plant-Microbe Interact* **17**: 668-675.
- Diez J, Ishikawa M, Kaido M y Ahlquist P** (2000). "Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication." *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3913-3918.
- Dixon M S, Hatzixanthis K, Jones D A, Harrison K y Jones J D** (1998). "The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number." *Plant Cell* **10**: 1915-1925.
- Dixon M S, Jones D A, Keddie J S, Thomas C M, Harrison K y Jones J D** (1996). "The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins." *Cell* **84**: 451-459.
- Doyle J y Doyle J** (1990). "Isolation of plant DNA from fresh tissue." *Focus* **12**: 13-15.
- Dumas de Vaulx A** (1970). Étude de la transmission du virus de la criblure. Rapport d'activité 1969-1970. Station d'Amélioration des Plantes Mariachères, Monfavet, France: 46-50.
- Durrett R T, Chen K y Tanksley S D** (2002). "A simple formula useful for positional cloning." *Genetics* **160**: 353-355.
- Ellis J y Peter D** (2000). "Structure, function and evolution of plant disease resistance genes." *Curr Opin Plant Biol* **3**: 278-284.
- FAO** (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. www.fao.org.
- Flor H H** (1947). "Host-parasite interaction in flax-rust -its genetics and other implication." *Phytopathology* **45**: 680-685.
- Flor H H** (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-298.
- Fraser R S** (1990). "The genetics of resistance to plant-viruses." *Annual Review of Phytopathology* **28**: 179-200.
- Fridman E, Pleban T y Zamir D** (2000). "A recombination hotspot delimits a wild species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene." *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4718-4723.
- Frye A C, Tang D y Innes R W** (2001). "Negative regulation of defence responses in plants by a conserved MAPKK kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 373-378.

- Furuki I** (1981). "Epidemiological studies on melon necrotic spot virus. Technical Bulletin 14. Shizuoka Agricultural Experimental Station, Shizuokaken, Japón."
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H y Ryals J** (1993). "Requirement of salicylic acid for induction of systemic acquired resistance." *Science* **261**: 754-756.
- Gale M D y Devos K M** (1998). "Plant comparative genetics after 10 years." *Science* **282**: 656-659.
- Gallie D R** (1996). "Translational control of cellular and viral mRNAs." *Plant Mol Biol* **32**: 145-158.
- Gallie D R y Walbot V** (1990). "RNA pseudoknot domain of *Tobacco mosaic virus* can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells." *Genes Dev* **4**: 1149-1157.
- Gao Z, Johansen E, Evers S, Tomas C T, Noel E y Maule A** (2004). "The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking." *Plant Journal* **40**: 376-385.
- Garcia-Mas J, Oliver M, Gómez H y de Vicente M C** (2000). "AFLP, RAPD and RFLP markers to measure genetic diversity in melon." *Theor Appl Genet* **101**: 860-864.
- Gazo B M, Murphy P, Gatchel J R y Browning K S** (2004). "A novel interaction of Cap-binding protein complexes eukaryotic initiation factor (eIF) 4F and eIF(iso)4F with a region in the 3'-untranslated region of *Satellite tobacco necrosis virus*." *J Biol Chem* **279**: 13584-13592.
- Gómez-Guillamón M L, Moriores E, Luis-Arteaga M, Álvarez J M, J.A. T, López-Sesé A I, Cánovas I, Sánchez F y Camero R** (1998). Morphological and disease resistance evaluation in *Cucumis melo* and its wild relatives. Cucurbitaceae'98: Evaluation and enhancement of the cucurbit gerplasm. J.D. McCreight. Alexandria, V.A: 53-61.
- Gonzales-Garza R, Gumph D J, Kishaba A A y Bohn G W** (1979). "Identification, seed transmission and host range pathogen-city of a California isolate of *melon necrotic spot virus*." *Phytopathology* **69**: 340-345.
- Gonzalo M J** (2003). Generación, caracterización molecular y evaluación morfológica de una población de líneas dihaploides en melón (*Cucumis melo* L.). Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal. Lleida, Universitat de Lleida. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. Tesis doctoral.
- Grivet L, Glaszmann J C, Vincentz M, da Silva F y Arruda P** (2003). "ESTs as a source for sequence polymorphisms discovery in sugarcane: example of the *Adh* genes." *Theor Appl Genet* **106**: 190-197.
- International SNP Map Working Group** (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. In *Nature* (London), pp. 928-933.
- Hammond-Kosack K E y Jones J D** (1996). "Resistance Gene-Dependent Plant Defence Responses." *Plant Cell* **8**: 1773-1791.
- Hammond-Kosack K E y Jones J D** (1997). "Plant Disease Resistance Genes." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 575-607.
- Hammond-Kosack K E y Parker J E** (2003). "Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding." *Curr Opin Biotechnol* **14**: 177-193.
- Hibi T y Furuki I** (1985). "*Melon Necrotic Spot Virus*." *AAB Descriptions of Plants Viruses* n° **302**.
- Hollings M y Brunt A** (1981). Potyvirus. Handbook of plants virus infections and comparative diagnosis. Kurstak E. Amsterdam, Elsevier, North Holland Biomedical Press: 943.
- Iyer A S y McCouch S R** (2004). "The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance." *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1348-1354.
- Jander G, Norris S R, Rounsley S D, Bus D F, Levin I M y Last R L** (2002). "*Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era." *Plant Physiol* **129**: 440-450.

- Johansen I E, Lund O S, Hjulsager C K y Laursen J** (2001). "Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus." *J Virol* **75**: 6609-6614.
- Jones D, Thomas C, Hammond-Kosack K, Balint-Kurti P y Jones J** (1994). "Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging." *Science* **266**: 789-793.
- Jones D A y Jones J D** (1996). "The roles of leucine rich repeats in plant defences." *Adv Bot Res Adv Plant Pathol* **24**: 90-167.
- Joobeur T, King J J, Nolin S J, Thomas C E y Dean R A** (2004). "The *Fusarium* wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features." *Plant J* **39**: 283-297.
- Kajava A V** (1998). "Structural diversity of leucine-rich repeat proteins." *J Mol Biol* **277**: 519-527.
- Kaloshian I, Lange W H y Williamson V M** (1995). "An aphid-resistance locus is tightly linked to the nematode-resistance gene, *Mi*, in tomato." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 622-5.
- Kaloshian I, Yaghoobi J, Liharska T, Hontelez J, Hanson D, Hogan P, Jesse T, Wijbrandi J, Simons G, Vos P, Zabel P y Williamson V M** (1998). "Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus *Mi* in tomato." *Mol Gen Genet* **257**: 376-385.
- katzir N, Danin-Poleng Y, Tzuri G, Karchi Z, Lavi U y Cregan P B** (1996). "Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceas species." *Theor Appl Genet* **93**: 1282-1290.
- Kawchuk L M, Hachey J, Lynch D R, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer D R, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard R J, Fischer R y Pruffer D** (2001). "Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6511-6515.
- Keen N T** (1990). "Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions." *Annu Rev Genet* **24**: 447-463.
- Kerje T y Grum M** (2000). "The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature." *Acta Hort ISHS* **510**: 37-44.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S y Ryals J** (1994). "Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals." *Annu Rev Phytopathol* **32**: 439-459.
- Kinoshita T** (1995). "Construction of molecular maps and their applications in rice genetics and breeding." *Asia-Pacific J Mol Biol Biotech* **3**: 22.
- Kirkbride J H** (1993). *Biosystematic monograph of the genus Cucumis*. Parkway, Boone, NC.
- Kishi K** (1966). "Necrotic spot of melon, a new virus disease." *Ann Phytopath Soc Japan* **32**: 138-144.
- Konieczny A y Ausubel F M** (1993). "A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers." *Plant J* **4**: 403-410.
- Kota R, Wolf M, Michalek W y Graner A** (2001). "Application of denaturing high-performance liquid chromatography for mapping single nucleotide polymorphisms in barley (*Hordeum vulgare* L.)." *Genome* **44**: 523-528.
- Ku H M, Vision T, Liu J y Tanksley S D** (2000). "Comparing sequenced segments of the tomato and *Arabidopsis* genomes: large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9121-9126.
- Kuhne T, Shi N, Proeseler G, Adams M J y Kanyuka K** (2003). "The ability of a bymovirus to overcome the *rym4*-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1." *J Gen Virol*: 2853-2859.
- Lahser F C, Marsh L E y Hall T C** (1993). "Contributions of the brome mosaic virus RNA-3 3'-nontranslated region to replication and translation." *J Virol* **67**: 3295-3303.

- Lander E, Green P, Abrahamson J, Barlow a, Daley M, Lincoln S y Newburg L** (1987). "MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations." *Genomics* **1**: 174-181.
- Lawrence G J, Finnegan E J, Ayliffe M A y Ellis J G** (1995). "The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*." *Plant Cell* **7**: 1195-1206.
- Lecoq H, Wilser G y Pitrat M** (1998). Cucurbit viruses: the classics and the emerging. Cucurbitaceae'98: Evaluation and enhancement of the cucurbit germoplasm, Alexandria, VA, ASHS Press.
- Lee W M, Ishikawa M y Ahlquist P** (2001). "Mutation of host ω_9 fatty acid desaturase inhibits *Brome mosaic virus* RNA replication between template recognition and RNA synthesis." *J Virol* **75**: 2097-2106.
- Lellis A D, Kasschau K D, Whitham S A y Carrington J C** (2002). "Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection." *Curr Biol* **12**: 1046-1051.
- Leonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin M G y Laliberte J F** (2000). "Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity." *J Virol* **74**: 7730-7737.
- Lindblad-Toh K, Wincherter E, Daly M J, Wang D G, Hirshhorn J N, Laviolette J P, Ardlie K, Reich D E, Robinson E, Sklar P, Shah N, Thomas D, Fan J B, Gingeras T, Warrington J, Patil N, Hudson T J y Lander E S** (2000). "Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse." *Nat Genet* **24**: 381-386.
- Liu H, Sachidanandam R y Stein L** (2001). "Comparative genomics between rice and *Arabidopsis* shows scant collinearity in gene order." *Genome Res* **11**: 2020-2026.
- Livak K J** (1999). "Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay." *Genet Anal Tech Appl* **14**: 159-162.
- Luis-Arteaga M** (1991). "Virosis de cucurbitáceas en España." *Phytoma España* **25**: 9-16.
- Luis-Arteaga M, Alvarez J M, Alonso-Prados J L, Bernal J J, Garcia-Arenal F, Laviña A, Batlle A y Moriones E** (1998). "Occurrence, distribution and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain." *Plant Disease* **82**: 979-982.
- Luo M, Wang Y H, Frisch D, Joobeur T, Wing R A y Dean R A** (2001). "Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (*Fom-2*)." *Genome* **44**: 154-162.
- Marcotrigiano J, Gingras A C, Sonenberg N y Burley S K** (1997). "Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." *Cell* **89**: 951-961.
- Martin G B, Bogdanove A J y Sessa G** (2003). "Understanding the functions of plant disease resistance proteins." *Annu Rev Plant Biol* **54**: 23-61.
- Martin G B, Brommonschenkel S H, Chunwongse J, Frary A, Ganai M W, Spivey R, Wu T, Earle E D y Tanksley S D** (1993). "Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato." *Science* **262**: 1432-1436.
- Martin-Lopes P, Zhang H y Koebner R** (2001). "Detection of single nucleotide mutations on wheat using single strand conformation polymorphism gels." *Plant Mol Bio Rep* **19**: 159-162.
- Maruyama K y Sugano S** (1994). "Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides." *Gene* **138**: 171-174.
- Matsuo H, Hanging L, McGuire A M, Fletcher C M, Gringras A C, Sonenberg N y Wagner G** (1997). "Structure of translation factor eIF4E bound to m7-GDP and interaction with 4E-binding protein." *Nat Struct Biol* **4**: 717-724.
- Mayer K, Murphy G, Tarchini R, Wambutt R, Volckaert G, Pohl T, Dusterhoft A, Stiekema W, Entian K D, Terry N, Lemcke K, Haase D, Hall C R, van Dodeweerd A M, Tingey S V, Mewes H W,**

- Bevan M W y Bancroft I** (2001). "Conservation of microstructure between a sequenced region of the genome of rice and multiple segments of the genome of *Arabidopsis thaliana*." *Genome Res* **11**: 1167-1174.
- Memelink J, Swords K M M, Staehelin L A y Hoge H C** (1994). "Southern, Northern and Western blot analysis." *Plant Molecular Biology Manual* **D1**: 1-23.
- Mestre P, Brigneti G y Baulcombe D C** (2000). "An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the NIa proteinase from *Potato virus Y*." *Plant J* **23**: 653-661.
- Meyers B C, Chin D B, Shen K A, Sivaramakrishnan S, Lavelle D O, Zhang C y Michelmore R W** (1998). "The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases." *Plant Cell* **10**: 1817-1832.
- Michelmore R W, Paran I y Kesseli R V** (1991). "Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations." *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9828-9832.
- Mindrinos M, Katagiri F, Yu G L y Ausubel F M** (1994). "The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats." *Cell* **78**: 1089-1099.
- Monforte A J, Garcia-Mas J y Arus P** (2003). "Genetic variability in melon based on microsatellite variation." *Plant Breed* **122**: 153-157.
- Morales M, Luis-Artega M, Dolcet-Sanjuan R, Monfort A, Arús P y Garcia-Mas J** (2002). "Marker saturation of the region flanking the gene *nsv* conferring resistance to the *Melon necrotic spot Carmovirus* (MNSV) in melon." *J Amer Soc Hort Sci* **127**: 540-544.
- Munger H M y Robinson R W** (1991). "Nomenclature of *Cucumis melo* L." *Cucurbit Genet Coop Rep* **14**: 43-44.
- Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, Ghabrial S A, Jarvis A W, Martilli G P, Mayo M A y Summers M D** (1995). "Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses." *Arch Virol suppl.* **10**.
- Nasu S, Suzuki J, Ohta R, Hasegawa K, Yui R, Kitazawa N, Monna L y Minobe Y** (2002). "Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNPs markers." *DNA Res* **9**: 163-171.
- Neuhausen S L** (1992). "Evaluation of restriction fragment length polymorphism in *Cucumis melo*." *Theor Appl Genet* **83**: 379-384.
- Nicaise V, German-Retana S, Sanjuan R, Dubrana M P, Mazier M, Maisonneuve B, Candresse T, Caranta C y LeGall O** (2003). "The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the *Potyvirus Lettuce mosaic virus*." *Plant Physiol* **132**: 1272-1282.
- Noueiry A O, Chen J y Ahlquist P** (2000). "A mutant allele of essential, general translation initiation factor DED1 selectively inhibits translation of a viral mRNA." *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12985-12990.
- Nuez F, Prohens J, Iglesias A y Fernandez de Cordova P** (1996). *Catálogo de semillas de melón*, Madrid. Banco de Germoplasma de la Universidad Politécnica de Valencia. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- O'Donovan M C, Oefner P J, Roberts S C, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer S y McGuffin P** (1998). "Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection." *Genomics* **52**: 44-49.
- Oliver M, Garcia-Mas J, Cardus M, Pueyo N, Lopez-Sese A L, Arroyo M, Gomez-Paniagua H, Arus P y de Vicente M C** (2001). "Construction of a reference linkage map for melon." *Genome* **44**: 836-45.
- Paran I y Michelmore R W** (1993). "Development of reliable PCR-based markers linked to downey mildew resistance genes in lettuce." *Theor Appl Genet* **85**: 985-993.

- Parker J E, Coleman M J, Dean C y Jones J D G** (1997). "The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with *N* and *L6*." *Plant Cell* **9**: 879-894.
- Paterson A H, Bowers J E, Burow M D, Draye X, Elsik C G, Jiang C X, Katsar C S, Lan T H, Lin Y R, Ming R y Wright R J** (2000). "Comparative genomics of plant chromosomes." *Plant Cell* **12** (9): 1523-40.
- Paterson A H, Lan T H, Reischmann K P, Chang C, Lin Y R, Liu S C, Burow M D, Kowalski S P, Katsar C S, DelMonte T A, Feldmann K A, Schertz K F y Wendel J F** (1996a). "Towards a unified genetic map of higher plants, transcending the monocot-dicot divergence." *Nat Genet* **14**: 380-382.
- Paterson A H** (1996b). *Genome mapping in plants*. Academic Press. Australia, Texas.
- Périn C, Hagen L S, de Conto V, Katzir N, Daning- Poleg Y, Portnoy V, Baudracco-Arnas S, Chadouef J, Dogimont C y Pitrat M** (2002). "A reference map for *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations." *Theor Appl Genet* **104**: 1017-1034.
- Perl-Treves R, Stepansky A, Schaffer A A y Kovalski I** (1998). "Intraspecific classification of *Cucumis melo*: How is the morphological and biochemical variation of melons reflected at the DNA level?" *Cucurbitaceae* **98**: 310-319.
- Pico B y Ruiz J** (2000). Clonación posicional y mapeo comparativo. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Nuez F y Carrillo J M: 443-512.
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins N, Panstruga R y Schulze-Lefert P** (2002). "The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli." *Plant Physiol* **129**: 1076-1085.
- Pillen K, Ganai M W y Tanksley S D** (1996). "Construction of a high-resolution genetic map and YAC-contigs in the tomato *Tm-2a* region." *Theor Appl Genet* **93**: 228-233.
- Pitrat M, Dogimont C y Barlin M** (1998). Resistance to fungal diseases of foliage in melon. *Cucurbitaceae'98: Evaluation and enhancement of the cucurbit germplasm*, Alexandria, VA, ASHS Press.
- Pitrat M, Hemelt P y Hammer K** (2000). "Some comments on interspecific classification of cultivars of melon." *Proc Cucurbitaceae 2000. Acta Horticulturae* **510**: 29-36.
- Pitrat M y Lecoq H** (1984). A rapid method to test muskmelon for several virus resistance. 3rd Eucarpia Mtg. Cucumber and melons, Plovdiv, Bulgaria, 2-5 July.
- Qu F y Morris T** (2000). "Cap-independent translational enhancement of *Turnip crinkle virus* genomic and subgenomic RNAs." *J Virol* **74**: 1085-1093.
- Riviere C J y Rochon D M** (1990). "Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus*." *J Gen Virol* **71**: 1887-1896.
- Rodi C P, Darnhofer-Patel B, Stanssens P, Zabeau M y van den Boom D** (2002). "A strategy for the rapid discovery of disease markers using the MassARRAY system." *BioTechniques* **32**: 62-69.
- Ross A F** (1961). "Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts." *Virology* **14**: 329-339.
- Rossberg M, Theres K, Acarkan A, Herrero R, Schmitt T, Schumacher K, Schmitz G y Schmidt R** (2001). "Comparative sequence analysis reveals extensive microcolinearity in the lateral suppressor regions of the tomato, *Arabidopsis*, and *Capsella* genomes." *Plant Cell* **13**: 979-988.
- Rossi M, Goggin F L, Milligan S B, Kaloshian I, Ullman D E y Williamson V M** (1998). "The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9750-9754.

- Ruffel S, Dussault M H, Palloix A, Moury B, Bendahmane A, Robaglia C y Caranta C** (2002). "A natural recessive resistance gene against *potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)." *Plant J* **32**: 1067-1075.
- Ruffel S, Palloix A, Lefebvre V, Caboche M, Caranta C y Bendahmane A** (2004). "Structural analysis of the eukaryotic initiation factor 4E gene controlling potyvirus resistance: exploitation of a pepper BAC library." *Gene* **338**: 209-216.
- Salmeron J M, Oldroyd G E, Rommens C M, Scofield S R, Kim H S, Lavelle D T, Dahlbeck D y Staskawicz B J** (1996). "Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster." *Cell* **86**: 123-133.
- Sambrook J, Frits E F y Maniatis T** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York.
- Sato M, Masuta C y Uyeda I** (2003). "Natural resistance to *Clover yellow vein virus* in beans controlled by a single recessive locus." *Mol Plant-Microbe Interact* **16**: 994-1002.
- Schaad M C y Carrington J C** (1996). "Suppression of long-distance movement of *Tobacco etch virus* in a non-susceptible host." *J Virol* **70**: 2556-2561.
- Schneider K, Weisshaar B, Borchard D C y Salamini F** (2001). "SNP frequency and allelic haplotype structure of *Beta vulgaris* expressed genes." *Mol Breed* **8**: 63-74.
- Sekine S y Kato S** (1993). "Synthesis of full-length cDNA using DNA-capped mRNA." *Nucleic Acids Symp Ser* **29**: 143-144.
- Shirasu K y Schulze-Lefert P** (2000). "Regulators of cell death in disease resistance." *Plant Mol Biol* **44**: 371-385.
- Silberstein L, Kovalski I, Huang R, Anagnostou K, Kyle J y Perl-Treves R** (1999). "Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers." *Sci Hort* **79**: 101-111.
- Simons G, Groenendijk J, Wijbrandi J, Reijans M, Groenen J, Diergaarde P, Van der Lee T, Bleeker M, Onstenk J, de Both M, Haring M, Mes J, Cornelissen B, Zabeau M y Vos P** (1998). "Dissection of the fusarium *I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy." *Plant Cell* **10**: 1055-1068.
- Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C y Ronald P** (1995). "A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*." *Science* **270**: 1804-1806.
- Staden R** (1996). "The Staden sequence analysis package." *Mol Biotechnol* **5**: 233-241.
- Stepansky A, Kovalski I y Perl-Treves R** (1999). "Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation." *Plant Systematics and Evolution* **217**: 313-332.
- Tai T H, Dahlbeck D, Clark E T, Gajiwala P, Pasion R, Whalen M C, Stall R E y Staskawicz B J** (1999). "Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato." *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14153-14158.
- Tanksley S D, Ganai M W y Martin G B** (1995). "Chromosome landing: a paradigm for map based cloning in plants with large genomes." *Trends Genet* **11**: 63-68.
- Tanksley S D, Young N D, Paterson A H y Bonierbale M W** (1989). "RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science." *Biotechnology* **7**: 247-264.
- Tarun S Z, Jr. y Sachs A B** (1996). "Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G." *Embo J* **15**: 7168-7177.
- Thomas C M, Jones D A, Parniske M, Harrison K, Balint-Kurti P J, Hatzixanthis K y Jones J D** (1997). "Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*." *Plant Cell* **9**: 2209-2224.

- Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmognin F y DG H** (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acid Res* **25**: 4876-4882.
- Tomita Y, Mizuno T, Diez J, Naito S, Ahlquist P y Ishikawa M** (2003). "Mutation of host *dnaJ* homolog inhibits *Brome mosaic virus* negative-strand RNA synthesis." *J Virol*: 2990-2997.
- Tornero P, Chao R A, Luthin W N, Goff S A y Dangl J L** (2002). "Large-scale structure-function analysis of the *Arabidopsis RPM1* disease resistance protein." *Plant Cell* **14**: 435-450.
- Torres J M** (1997). "Melones. Compendios de Horticultura." **10**: 13-20.
- Tsujimoto Y, Numaga T, Ohshima K, Yano M A, Ohsawa R, Goto D, Naito S y . I M** (2003). "*Arabidopsis* tobamovirus multiplication (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1." *EMBO J*. **22**: 335-343.
- van Kan J, van den Ackerveken G y de Wit P** (1991). "Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold." *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 52-59.
- van Leeuwen H, Monfort A, Zhang H B y Puigdomenech P** (2003). "Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana*." *Plant Mol Biol* **51**: 703-718.
- Vogel J y Somerville S** (2000). "Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants." *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (4): 1897-1902.
- Vogel J P, Raab T K, Schiff C y Somerville S C** (2002). "*PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **14**: 2095-2106.
- Vos P, Hogers R, Bleker M, Reijans M, van De Lee T, Horgers M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M** (1995). "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." *Nucleic Acid Res* **23**: 4407- 4414.
- Wang D G, Fan J-B, Siao C-J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Wincherter E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittman M, Morris M S, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson T J, Lipshutz R, Chee M y Lander E S** (1998). "Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome." *Science* **280**: 1077-1082.
- Wang S, Browning K S y Miller W A** (1997a). "A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA." *Embo J* **16**: 4107-4116.
- Wang Y H, Thomas C E y Dean R A** (1997b). "A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers." *Theor Appl Genet* **99**: 1149-1154.
- Wang Y H, Thomas C E y Dean R A** (2000). "Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melo* L.)." *Mol Breeding* **6**: 379-389.
- Whitaker T W** (1976). *Cucurbits. Evolution of Crop Plants*.
- Whitham S, Dinesh-Kumar S P, Choi D, Hehl R, Corr C y Baker B** (1994). "The product of the *Tobacco mosaic virus* resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor." *Cell* **78**: 1101-1115.
- Williams J, Kubelik A, Kenneth J, Rafalski J y Tingey S** (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acid Res* **18**: 6531-6535.
- Wittmann S, Chatel H, Fortin M G y Laliberte J F** (1997). "Interaction of the viral protein genome linked of *Turnip mosaic potyvirus* with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system." *Virology* **234**: 84-92.
- Wolter M, Hollricher K, Salamini F y Schulze-Lefert P** (1993). "The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype." *Mol Gen Genet* **239**: 122-128.

- Wu B y White K** (1999). "A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the *Tomato bushy stunt virus* genome." *J Virol* **73**: 8982-8988.
- Xiao F, Lu M, Li J, Zhao T, Yi S Y, Thara V K, Tang X y Zhou J M** (2003). "*Pto* mutants differentially activate *Prf*-dependent, *avrPto*-independent resistance and gene-for-gene resistance." *Plant Physiol* **131**: 1239-1249.
- Xiao S, Ellwood S, Callis O, Patrick E, Li T, Coleman M y Turner J G** (2001). "Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*." *Science* **291**: 118-120.
- Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, Yoshioka N, Kozuka R, Naito S y Ishikawa M** (2004). "The *Arabidopsis* Cucumovirus Multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G." *J Virol* **78**: 6102-6111.
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang Z X, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N y Sasaki T** (1998). "Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1663-1668.
- Zheng X Y, Wolff D W, Baudracco-Arnas S y Pitrat M** (1999). "Development and utility of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) linked to the *Fom-2* fusarium wilt resistance gene in melon (*Cucumis melo* L.)." *Theor Appl Genet* **99**: 453-463.
- Zhou F, Kurth J, Wei F, Elliott C, Valè G, Yahiaoui N, Keller B, Somerville S, Wise R y P S-L** (2001). "Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *rar1*-independent signaling pathway." *Plant Cell* **13**: 337-350.
- Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, Van Tasell C P, Matukumalli L K, Grimm D R, Hyatt S M, Fickus E W, Young N D y Cregan P B** (2003). "Single-nucleotide polymorphisms in soybean." *Genetics* **163**: 1123-1134.

12. Apéndices

12. APÉNDICES

APÉNDICE A

CEBADORES Y CONDICIONES DE PCR

A.1. Secuencias de los cebadores y adaptadores usados para AFLPs

A.1.1. Secuencia y estructura de los adaptadores utilizados para las reacciones de AFLPs

Adaptadores	Adaptadores	Secuencia
<i>MseI</i>	ADAP- <i>MseI</i> -F	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'
	ADAP- <i>MseI</i> -R	
<i>EcoRI</i>	ADAP- <i>EcoRI</i> -F	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5'
	ADAP- <i>EcoRI</i> -R	

A.1.2. Secuencias de los cebadores *MseI*+1, *EcoRI*+1, *MseI*+3, *EcoRI*+3 utilizados en la reacción de los AFLPs. En **negrita** se indican los nucleótidos selectivos.

Cebadores +1	Secuencia (5'- 3')
<i>MseI</i> +1 C	5'-GATGAGTCCTGAGTAA C
<i>MseI</i> +1 A	5'-GATGAGTCCTGAGTAA A
<i>EcoRI</i> +1 A	5'-GACTGCGTACCAATTC A

Cebadores <i>MseI</i> +3	Secuencia (5'- 3')
<i>MseI</i> +3 CTT	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTT
<i>MseI</i> +3 CTG	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG
<i>MseI</i> +3 CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTC
<i>MseI</i> +3 CTA	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTA
<i>MseI</i> +3 CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAT
<i>MseI</i> +3 CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG
<i>MseI</i> +3 CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAC
<i>MseI</i> +3 CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA
<i>MseI</i> +3 CGT	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGT
<i>MseI</i> +3 CGG	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGG
<i>MseI</i> +3 CGC	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGC
<i>MseI</i> +3 CGA	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGA
<i>MseI</i> +3 CCT	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CCT
<i>MseI</i> +3 CCG	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CCG
<i>MseI</i> +3 CCC	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CCC
<i>MseI</i> +3 CCA	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CCA
<i>MseI</i> +3 ACT	5'-GATGAGTCCTGAGTAA ACT
<i>MseI</i> +3 ACG	5'-GATGAGTCCTGAGTAA ACG
<i>MseI</i> +3 ACC	5'-GATGAGTCCTGAGTAA ACC
<i>MseI</i> +3 ACA	5'-GATGAGTCCTGAGTAA ACA
<i>MseI</i> +3 AAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAA AAT

<i>Mse</i> I+3 AAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAA AAC
<i>Mse</i> I+3 AAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAA AAA

Cebadores <i>Eco</i>RI+3	Secuencia (5'- 3')
<i>Eco</i> RI+3 AAC	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC
<i>Eco</i> RI+3 AAG	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG
<i>Eco</i> RI+3 ACA	5'-GACTGCGTACCAATTC ACA
<i>Eco</i> RI+3 ACC	5'-GACTGCGTACCAATTC ACC
<i>Eco</i> RI+3 ACG	5'-GACTGCGTACCAATTC ACG
<i>Eco</i> RI+3 ACT	5'-GACTGCGTACCAATTC ACT
<i>Eco</i> RI+3 AGC	5'-GACTGCGTACCAATTC AGC
<i>Eco</i> RI+3 AGG	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG

A.2. Lista de cebadores utilizados en PCRs inversas (iPCR) y para amplificación con el kit Genome Walker

Marcador	Cebadores	Secuencia (5'-3')
CTA/ACG-115	29-IPCR-F 29-IPCR-R	CCT CAC CAA GTT ATA TAG CG AGC AAT ATG AAG GAA GAC TC
ACC/ACC-110	132-IPCR-F 132-IPCR-R	TTA GTT CGT GAG TTT ATA AAA CAA CCC ATT CTA TAA
ACC/ACC-110 (Genome Walker)	AP2 GSP2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T GGG TTG TTT TGG TTC TTG AAT TGT ATT

A.3. Marcadores de PCR para el "contig" del locus *nsv*

A.3.1. Lista de cebadores de PCR derivados de los marcadores AFLPs y RAPDs

Marcador	Cebadores	Secuencia (5'-3')
M29	M29-F M29-R	CATCAATTAAGACGACACACAGG TCGAGAACCTTTTTATTATTGATGG
M132	M132-F M132-R	TCTGGAAAGGTCTACCCCCTCAT GGGTTGTTTTGGTTCTTGAATTGTATT
D08	D8 F D8 R	GTGCCCCAACGACTAAAAAG GCTTCCTGACAAGTAGTGGC
X15	X15-F X15-R	CAGACAAGCCCAGATAATTAACA CAGACAAGCCTAGGAGTTGTGGG

A.3.2. Condiciones de amplificación de los marcadores de PCR derivados de los AFLPs y RAPDs. En todas las PCRs se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de

hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t. elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C: temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, pb: pares de bases.

Marcadores	Condiciones de PCR						Tamaño banda (pb)	Enzima restricción polimórfico
	MgCl ₂ (mM)	t. des (s)	T ^a hibri (°C)	t. hibri (s)	t. elong (s)	número ciclos		
M29	3.5	30	61	30	60	35	360	<i>AflIII</i>
M132	3.5	30	53	30	90	35	1100	<i>TaqI</i>
D08	2	30	60	30	60	35	750	<i>EcoRV</i>
X15	2.5	20	63	20	60	35	1100	-

A.4. Secuencia de los cebadores universales M13

Cebadores universales	Secuencias 5'-3'
M13-R	CAGGAACACGCTATGAC
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT

A.5. Marcadores específicos de alelo

A.5.1. Lista de cebadores diseñados a partir de las secuencias de PI y Ved para desarrollar los marcadores específicos de alelo. Se muestran secuencias parciales de los marcadores M29 y 5A6sp6 en Ved y PI, que presentan alguna mutación (el número indica la posición en la secuencia del marcador). Las mutaciones en las secuencias entre los dos genotipos están subrayadas. En *cursiva* se muestran las secuencias de los cebadores específicos de alelo diseñados en esta región. F ("Forward") y R ("Reverse") indican la región 5' y 3', respectivamente de cada marcador.

M29-forward	Secuencias (5'-3')
Ved-M29-4	4- GAGAACCTTTTTATTATTGAT <u>G</u> GGGA-30
PI-M29-4	4- GAGAACCTTTTTATTATTGAT <u>_</u> GGGA-30
<i>ns1-F1a</i>	<i>GAGAACCTTTTTATTATTGATGGGGA</i>
<i>ns1-F1b</i>	<i>GAGAACCTTTTTATTATTGATGCGGA</i>
<i>ns1-F1c</i>	<i>GAACCTTTTTATTATTGATGCGGA</i>
Ved-M29-84	84-GATTTCTTTTGAAATTTATATATATA <u>**</u> AGC-114
PI-M29-84	84-GATTTCTTTTGAAATTTATATATATATA <u>A</u> AGC-114
<i>ns1-F2b</i>	<i>GATTTCTTTTGAAATTTATATATATAGAAGC</i>
<i>ns1-F2c</i>	<i>GATTTCTTTTGAAATTTATATATATATCAGC</i>

M29-reverse	Secuencias (5'- 3')
Ved-M29-294	294-GAAAGAATCTTCTTGAAGACCGTTTGT-267
PI-M29-294	294-GAAAGAATCTTCTTGAAGACAGTTTGC-267
<i>ns1-R1</i>	<i>GAAAGAATCTTCTTGAAGACCGTTTGT</i>
<i>ns1-R2</i>	<i>GAAAGAATCTTCTTGAAGACCGTATGT</i>
<i>ns1-R2b</i>	<i>AAGAATCTTCTTGAAGACCGTATGT</i>

5A6sp6-forward	Secuencias (5'- 3')
Ved-5A6sp6-130	130-CAGATTATAAGTTTCAGGTGATATTA-157
PI-5A6sp6-130	130-CAGATTATAAGTTTCAGGTG *_*ATTA-157
<i>ns2-F1a</i>	<i>CAGATTATAAGTTTCAGGTGATATTA</i>
<i>ns2-F1b</i>	<i>CAGATTATAAGTTTCAGGTGAGATTA</i>
5A6sp6-reverse	
Ved-5A6sp6-623	623-TGATCCTGAAATTTATAATTATAATC-598
PI-5A6sp6-623	623-TGATCCTGAAATTTATAATTATAATA-598
<i>ns2-R1a</i>	<i>TGATCCTGAAATTTATAATTATAATC</i>
<i>ns2-R1b</i>	<i>TGATCCTGAAATTTATAATTAGCATC</i>

A.5.2. Condiciones de PCR de los marcadores específicos de alelo. En todas las PCRs se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t. elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C: temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, pb: pares de bases. El número de ciclos fue de 35 en los dos marcadores.

Marcador específico de alelo	Marcador CAPS	cebadores	MgCl₂ (mM)	t. des (s)	T^a hibri (°C)	t. hibri (s)	t. elong (s)	Tamaño banda (pb)
ns1	M29	ns1-F2c ns1-R2b	2.5	10	57	15	30	237
ns2	5A6sp6	ns2-F1b ns2-R1b	2.5	15	50	30	40	492

A.6. Marcadores de PCR desarrollados a partir de los extremos de los BACs

A.6.1. Cebadores y condiciones de PCR. En todas las PCRs se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t. elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C: temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, pb: pares de bases. El número de ciclos fue de 35.

Marcador	Cebador	Secuencia (5'-3')	MgCl ₂ (mM)	Tamaño banda (bp)	t. des (s)	T ^a hibri (°C)	t. hibri (s)	t. elong (s)
38B12U	38B12U-F	TGA ATG ATT AAT CGC AAC AAT TT	3.5	624	20	50	20	40
	38B12U-R	CGT TAA GAC TTT GTT ACT TAG TAC						
38B12sp6	38B12sp6-F	CAC ACT GTC GTC GTT TCT CC	3.5	597	30	48.2	30	40
	38B12sp6-R	TCAGAGCCAAGCTTCCATAAA						
5A6U-SSR*	5A6U-F	TCCATTGGTTAAAAAGAAAGACG	3.5	213	30	59	30	30
	5A6U-R-SSR	TTTATTTTTGTATTCCTACTGCATTT						
5A6sp6	5A6sp6-F	GTCCTATGAGAACGACCGAGA	2.5	650	20	48.2	20	40
	5A6sp6-R	CGGACAGTTTTGTTAACCCATA						
7K20U	7K20U-F	GTTGGAGAGCATTTCATGTGC	2.5	539	30	59.6	30	40
	7K20U-R	GCTGGGTGCAGATCTCATT						
7K20sp6	7K20sp6-F	GCAGCATGCAACGAGTGTA	3.5	621	30	56.7	30	40
	7K20sp6-R	GGGGGAATATTACTACTCTACAAC						
7K20sp6-2	7K20sp6-3'-F	CCAAAACACCATACCCTGAAA	2.5	507	30	54	30	30
	7K20sp6-3'-R	TTTCTACCTATACTCGTCTTGTTTC						
30L11U	30L11U-F	TCCACAGTCAGTGAGGTTCCG	2.5	350	20	59.6	20	30
	30L11U-R	GCTGCCAACTCTAGATCATGTG						
30L11sp6	30L11sp6-F	CCTCCATAGCAGCATCAACA	2.5	432	20	59.6	20	30
	30L11sp6-R	CATGCACTCATTGGATTGG						
5B3U	5B3D-F	CACCACAACAAAGCACACAG	2.5	302	20	58	20	20
	5B3D-R	TTCTTTGTTTGGCGATTTTT						
5B3sp6	5B3sp6-F	GGATCCACAACGATTTACGC	2.5	150	20	55	20	20
	5B3sp6-R	TGTTACATAAGACAGGCGGGTTA						
52K20sp6	52K20sp6-F	GCA ATG TAT CCT TGC ACA AAT GC	2.5	744	20	65	20	50
	52K20-sp6-R	TCC AGC TTC TAT CCA TCA ATC TG						
10O16sp6	10O16sp6-F	TCCCACCACTAAAAACATCG	2.5	423	20	53.4	30	30
	10O16sp6-R	CTGAATTGTCCTGGCATGTG						
10O16U	10O16U-F	GGATCCTATTATTATATTTGGGTTGTC	2.5	409	20	53.4	20	30
	10O16U-R	CGGGACTTTTATCTTTTCAATATG						
9N8U	9N8U-F	GGATCCTATTATTATATTTGGGTTGTC	2.5	310	15	53.4	30	30
	9N8U-R	TTTGACAACATAACATGGCTGA						
20E15U	20E15U-F	TCCCACCACTAAAAACATCG	2.5	419	20	53.4	20	30
	20E15U-R	TGTACCTGGCATGTGACTCC						
1L3	1L3-F	GTC CTC AGT GGG AGT GAC AGA AGT G	2.5	750	30	60	30	60
	1L3-R	CTT GAT AGC ACT ATG CAG TCA TAT C						
1R3	1R3-F	GAA CAA TTT AGA TCC TTT CAT GCC AG	2.5	500	30	60	30	30
	1R3-R	GTA AGT AAA TTA GAA AGC CAA TAT CC						
1L3-HinI	1L3-F	GTC CTC AGT GGG AGT GAC AGA AGT G	2.5	270	15	57	30	30
	1L3-HinI-R	TCG TAT CGT ATC ATT ATT TCG AGT						

*PCR radiactiva con marcaje ^{33}P αdCTP

A.6.2. Cebadores internos desarrollados para la detección de SNPs mediante el método de SNaPshot

Marcador	Cebador interno	Secuencia (5'-3')
1L3	1L3-SNP	GGT TGA GAG TGT TAA GGT ATG
CM1.11	CM1.11-SNP	AAG ATG AAC ACA AAA TTT CCA
52K20sp6	52K20sp6-SNP	CTT TCT AAT TAT GTA CTA ATT G

A.6.3. Marcadores derivados de los extremos de los BACs cartografiados en los mapas genéticos. Se indica el tamaño del marcador, el enzima de restricción que reconoce el polimorfismo o el SNP correspondiente en su caso, las bandas generadas tras la digestión y las bases correspondientes al SNP.

Marcador	Tamaño (pb)	Polimorfismo	Bandas (pb) o bases polimórficas	
			PI	PS o Ved
38B12U	624	<i>EcoRI</i>	300 + 324	624
5A6U-SSR	213	SSR	-	-
5A6sp6	650	<i>TaqI</i>	390 + 260	390 + 130 + 130
7K20U	539	<i>EaeI</i>	469 + 70	539
30L11sp6	432	Indel A	11A	10A
5B3sp6	150	<i>TaqI</i>	130 + 20	150
52K20sp6	744	SNP	G	A
10O16sp6	423	<i>HaeIII</i>	423	273 + 150
1L3 (F ₂)	750	SNP	G	A
1L3 (BC1)	270	<i>HinI</i>	270	250 + 20

APÉNDICE B

CLONAJE DEL eIF4E DE MELÓN

B.1. Desarrollo de los cebadores degenerados a partir de la secuencia proteica del eIF4E

Cebador	eIF4E-dF						
Secuencia proteica	W	T	F	W	F	D	N
Secuencia nucleotídica correspondiente	TGG	ACN	TT(T/C)	TGG	TT(T/C)	GA(T/C)	AA(T/C)
Cebador degenerado-F	TGG ACI TTY TGG TTY GAY AA						

Cebador	eIF4E-dR						
Secuencia proteica	E	P	K	W	E	D	P
Secuencia nucleotídica correspondiente	GA(A/C)	CCN	AA(A/G)	TGG	GA(A/G)	GA(T/C)	CCN
Secuencia nucleotídica reverse	GG (A/G)TC (T/C)TC CCA (C/T)TT NGG (T/C)TC						
Cebador degenerado-R	GGR TCY TCC CAY TTI GGY TC						

Y = C/T R = A/G

N = A/T/G/C

I = Inosina (nucleótido modificado que permite la unión de cualquiera de los 4 nucleótidos)

B.2. Condiciones de PCR con los cebadores degenerados

En esta PCR se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t. elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C: temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, min: tiempo en min kb: kilobases. El número de ciclos fue de 35.

Cebador	Secuencia (5'-3')	MgCl ₂ (mM)	Tamaño banda (kb)	t. des (s)	T ^a hibri (°C)	t. hibri (s)	t. elong (min)
eIF4E-dF	TGG ACI TTY TGG TTY GAY AA	2.5	1.9	20	55	20	2
eIF4E-dR	GGR TCY TCC CAY TTI GGY TC						

B.3. Cebadores específicos del eIF4E de melón y condiciones de PCR

En esta PCR se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t. elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C:

temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, min: tiempo en min kb: kilobases. El número de ciclos fue de 35.

Cebador	Secuencia (5'-3')	MgCl ₂ (mM)	Tamaño banda (kb)	t. des (s)	T ^a hibri (°C)	t. hibri (s)	t. elong (min)
melF4E-F	CCG ATC TAT ACC TTC TCT ACC	2.5	1.8	20	55	20	2
melF4E-R	TAC AAA TCT GCC CTC ATC GCC						

B.4. Cebadores utilizados en la obtención del cADN

Cebador	Secuencias (5'-3')
PI	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGrCrArGrGrCrTrGrGrG
P2	NNNNNNCCCAGCCTGC
P3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ₂₀ VN
P1-PCR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
P3-PCR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

N: puede ser cualquiera de los 4 nucleótidos; V: puede ser dA, dC o dG.; rG, rT y rC son ribonucleótidos.

B.5. Cebadores específicos diseñados en el cADN y en ADN genómico de eIF4E. Los cebadores del GSP1 a GSP6 se diseñaron inicialmente para amplificar los extremos 5' y 3' del cADN del eIF4E de melón. Los cebadores GSP7 y GSP8 fueron diseñados posteriormente, entre las posición predichas de los intrones. Los pares de cebadores con el mismo número se han diseñado en la misma posición, pero en sentido inverso, es decir en las dos cadenas del ADN. Los cebadores eIF4E-3rev y eIF4E-4rev se diseñaron en la secuencia del primer intrón. En la secuencia del cADN del eIF4E de PI que se muestra a continuación se han posicionado los cebadores marcados en color en la tabla. También se han indicado en la secuencia de PI los cebadores full-cDNA 5' y full-cDNA 3' (este último en sentido 3'-5'). El color del cebador indica la posición en la secuencia. La posición de los intrones se indica con XXX. El codón de inicio ATG se indica en amarillo y el de parada TGA en marrón.

Cebadores	Secuencia (5'-3')
GSP1 rev	GATAACCCATCTGCCAAATCCAAGCAAGCC
GSP1 for	GGCTTGCTTGGATTTGGCAGATGGGTTATC
GSP2 rev	GGTGCGTCTATTGACCGATCTATACCT
GSP2 for	AGGTATAGATCGGTCCAATAGACGCACC
GSP3 rev	ACCTTCTCTACCGTCGAGGAGTTCTGG
GSP3 for	CCAGAACTCCTCGACGGTAGAGAAGGT
GSP4 rev	CATCATCCAAGCAAATTGGCGATGAGGGC
GSP4 for	GCCCTCATCGCCAATTTGCTTGGATGATG
GSP5 rev	GGCGATGAGGGCAGATTTGTACTGCTTC
GSP5 for	GAAGCAGTACAAATCTGCCCTCATCGCC
GSP6 rev	GCTTCAAACATAAAATTGAACCCAATGGG
GSP6 for	CCCATTTGGGTTCAATTTTATGTTTGAAGC
GSP7 rev	ATCACCACAGTCAAACCTGTTCTCC
GSP7 for	GGAGAACAGTTTGACTGTGGTGAT
GSP8 rev	AAGCCAATGCTCTCATTGTAATC
GSP8 for	GATTACAATGAGAGCATTGGCTT
eIF4E-3rev	GGAGGAACATCTGTGAAGCAATGC
eIF4E-4rev	CATAATCAGATATCATATTATGAGC
full-cDNA 5':	GAGGGCGGTGCCATTCTTCTTCGG
full-cDNA 3':	GTCAAGTACAGAACAAGAATCTGAG

cADN de secuencia completa del eIF4E de melón PI (5'-3')

GGGACCGACTCAAACGCCTAACAGAAAATCC**GAGGGCGGTGCCATTCTTCTTCGG**TTCCCT
TCCCTTCCATTGATTTCGATTCTTTCAGATAACTCTCCATTCCACAAAGCACTGAAAACCCA
AA**AT**GGTAGTTGAAGATTTCGATGAAAGCTACATCGGCAGGAAGATCTTTCTAATTCCATTG
CTAATCAAAAACCCCTAGAGGACGTGGCGGTGACGAAGATGAGGAACTTGAGGAAGGTGAGA
TCGTGGCGACGACGACCTCGACTCCTCCAATTTGTCCGCGTCCCTAGTGCATCAGCCTC
ACCCTCTGGAGCACTCTTGGACCTTTTGGTTC**GATAACCCATCTGCCAAATCCAAGCAAG**
CCACCTGG**GGTGCGTCTATTGACCGATCTAT****ACCTTCTCTACCGTCGAGGAGTTCTGG**
XXAGTGTTTACAACAACATT**CATCATCCAAGCAAATTGGCGATGAGGGCAGATTTGTACT**
GCTTCAAACATAAAATTGAGCCTAAATGGGAAGATCCCCTTTGTGCTAATGGAGGAAAT
GGACTGTGAACTTTCCAAGGGGAAAATCTGATAATGGCTGGTTGTACACG**XXX**CTGCTTG
CTATGATC**GGAGAACAGTTTGACTGTGGTGAT**GAAATTTGTGGAGCAGTTGTTAATGTTA
GGTCTGGGCAGGATAAAAATATCAATTTGGACGAAGAATGCTTCCAATGAAGCTGCGCAGG
CGAGC**XXX**ATTGGAAAACAGTGGAAGGAGTTTCTT**GATTACAATGAGAGCATTGGCTTTA**
TATTCCACGATGAC**XXX**GCAAAGAAATTCGATAGACTTGCGAAGAATAAATATATGGTG**T**
GATCTGTACGGTTTCTAATGCGTGGCGTGGGAGGAGGATAACTCGTCCTATTTCGTGCAAA
GCAATGCTGCTGCATCTCGGCATGTAAGGTTGAGCTGTGGCTAGTGGGTACTACCTTTAG
TTTCAACCTCCCCTCCCCGGAAAACCAAACACACCACCACCCAGGGAAAAAGAAAAAGA
AGGTTTTAATTGGTAAACGATGTTTTTGTGCGATTAGGAATTTGTGGAAATCGCCATTGC
TCATAACACAAAAGCACCTGAAT**CTCAGATTCTTGTCTGTACTTGAC**AGTTTTAGCCAA
TGAGGTGAAATGCATGCTCTTTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

B.6. Condiciones de PCR de los cebadores utilizados en la RACE-PCR

En todas las PCRs se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t. elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, pb: pares de bases. El número de ciclos fue de 30.

Cebadores	Tamaño aprox. (pb)	t. des (s)	T ^a hibrid. (°C)	t. hibri (s)	t. elong (min)	Extremo
P3-PCR GSP 2rev	800	20	58	20	90	3'
P3-PCR GSP 5rev	800	20	68	90	-	3'
P1-PCR GSP 6for	500	20	55	20	30	5'
P1-PCR GSP 6for	500	20	55	20	30	5'

B.7. Secuencias y condiciones de PCR de los cebadores que se han diseñado en los extremos de la secuencia del cADN completo de eIF4E. La amplificación sobre el cADN genera una banda de 1097 pb y la amplificación sobre el ADN genómico amplifica el gen completo de 3 Kb aproximadamente (indicado entre paréntesis). En esta PCR se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t. elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C: temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, pb: pares de bases. El número de ciclos fue de 35.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	MgCl ₂ (mM)	Tamaño banda (bp)	t. des (s)	T ^a hibri (°C)	t. hibri (s)	t. elong (s)
full-cDNA5'	GAGGGCGGTGCCATTCTTCTTCGG	1.5	1097 (3000)	15	60	20	60 (120)
full-cDNA3'	GTCAAGTACAGAACAAGAATCTGAG						

B.8. Secuencias y condiciones de PCR de los cebadores utilizados para amplificar los cuatro intrones del eIF4E. El tamaño de banda hace referencia al producto amplificado sobre el ADN genómico y es un valor aproximado. En todas las PCRs se realizó una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C y una extensión final de 5 min a 72°C. t. des: tiempo de desnaturalización a 94°C. T^a hibri: temperatura de hibridación. t. hibri: tiempo de hibridación. t.

elong: tiempo de elongación a 72°C. MgCl₂ (mM): concentración MgCl₂, °C: temperatura en grados centígrados, s: tiempo en segundos, pb: pares de bases. El número de ciclos fue de 30.

Intrón	Cebadores	Tamaño banda (bp)	MgCl ₂ (mM)	t. des (s)	T ^a hibri (°C)	t. hibri (s)	t. elong (s)
1	GSP2 rev	1800	1.5	15	55	30	120
	GSP5 for						
2	GSP5 rev	320	1.5	15	55	30	30
	GSP7 rev						
3	GPS7 for	320	1.5	15	55	30	30
	GSP8 rev						
4	GSP8 for	450	1.5	15	55	30	30
	full cDNA 3'						