A. MEMORIA. Describa los resultados del proyecto en relación con los objetivos propuestos

Objetivo 1: Mapado próximo de los genes *Nsv* y *Vat*

El punto de partida para la investigación realizada en la mayor parte de los objetivos de este proyecto es un mapa genético elaborado con la F_2 (N=93) del cruzamiento entre la línea de melón coreano PI161375 y una línea pura de melón de tipo español 'Piel de Sapo' ('T111') proporcionada por la empresa participante en el proyecto Semillas Fitó S.A., y a la que abreviaremos como PIxPS. Este mapa contiene en la actualidad 411 marcadores (RFLPs, SSRs, AFLPs, RAPDs, ISSRs, isoenzimas y el gen (*P/p*) que determina el número de carpelos del fruto). Los detalles sobre este mapa, que estimamos cubre la práctica totalidad del genoma con una densidad media de 3.0 cM/marcador, pueden obtenerse de las publicaciones (Oliver et al., 2001a, y Oliver et al., 2001b). Este mapa fue obtenido en el transcurso de un proyecto anterior (BIO96-1173-C03-01).

-*Nsv*:

El gen *Nsv* determina la resistencia al virus (*Carmovirus* de RNA de cadena sencilla) del cribado del melón (Melon Necrotic Spot Virus o MNSV). Las plantas resistentes son homocigóticas para el alelo recesivo *nsv*, mientras que las susceptibles tienen el alelo dominante *Nsv* (*Nsv/Nsv* o *Nsv/nsv*). El parental PI161375 es resistente, la F_1 es susceptible y en la F_2 se espera una segregación de 3 plantas susceptibles por cada planta resistente. Puesto que la inoculación se realiza con mejores garantías en plántulas, y dado que el material disponible de la F_2 consistía en explantes mantenidos 'in vitro' por Semillas Fitó, se optó por obtener semilla F_3 de cada planta de la F_2, lo que permitió realizar el estudio de la segregación de la resistencia en 20 plántulas de 91 de los 93 individuos de la población F_2.

Los ensayos de resistencia se realizaron con métodos standard de inoculación mecánica en colaboración con los investigadores del SIA de Zaragoza (José María Álvarez y Marisol Luis). Se obtuvieron datos consistentes con la segregación 1:2:1 esperada (22 *Nsv/Nsv*:49 *Nsv/nsv*:20 *nsv/nsv*) y esta información fue usada para situar al gen *Nsv* en el grupo de ligamiento 11 (G11) del mapa de PIxPS. La posición del gen quedaba flanqueada, por un lado y a una distancia de 9 cM, por cinco loci (2 RFLPs (MC50A y MC255B), 2 AFLPs (CCT/AAC-153 y CAT/AAC-295) y el gen *P*), por el otro y a una distancia de 18 cM, por un RFLP (MC330). Dos marcadores más cosegregaban con *Nsv* (el RAPD OPX15-1.06 y el RFLP MC320).

Para encontrar marcadores adicionales situados en las proximidades de *Nsv* se usó la estrategia del "bulked segregant analysis" (BSA). Para ello optamos por usar una nueva población, constituida por 69 líneas diplohaploides a partir de una planta F1 del mismo cruzamiento, obtenida por Ramon Dolcet-Sanjuan en el IRTA. A esta población la abreviaremos como PIxPSDH. Esta elección fue debida a que tanto los análisis de resistencia, realizados también en el SIA de Zaragoza, como el análisis de BSA era más sencillo al no tener que considerar la presencia de individuos heterocigotos. Como actividad relacionada con este trabajo e imputable al presente proyecto, se realizó un mapa genético de esta población usando 49 microsatélites, lo que dio lugar al trabajo de la tesis de Máster de Dª Farida Azzouz presentado en el I.A.M. de Zaragoza en Enero de 2001.

Se seleccionaron 8 plantas resistentes y 8 susceptibles de PIxPSDH y se analizaron sus mezclas de ADN para AFLPs con 184 combinaciones de cebadores (*Mse*I+3/*Eco*RI+3) y para RAPDs con 168 cebadores. Se obtuvieron 5 AFLPs y 1 RAPD, que se maparon en esta población juntamente con el resto de marcadores encontrados en el mapa de la F_2. Finalmente se localizaron 10 marcadores en la zona circundante a *Nsv*. Cinco de ellos se seleccionaron por estar en las inmediaciones del gen: 2 de ellos cosegregaban con *Nsv* (ACC/ACC-110 y OPX15-1.06) y 3 más lo flanqueaban, 2 de ellos cosegregaban a una distancia de 1 cM (CTA/ACG-115 y CTA/ACG-120, que después de su secuenciación se ha comprobado que son alelos del mismo locus) y el RAPD OPD08-0.80 a 4 cM. Estos tres últimos fueron escogidos para el análisis de mapado fino de la región tal como se explica en el objetivo 2.1.

Con los resultados de este trabajo se elaboró una publicación (Morales et al.) que ha sido enviada en Abril de 2001 y que está en revisión en el momento de escribir esta memoria.

- Vat

La presencia del alelo dominante del gen *Vat* ("Virus Aphid Transmission") confiere resistencia a la colonización por el áfido *Aphis gossypii* en melón. La línea PI161375 es homocigótica para este alelo, mientras que la variedad 'Piel de Sapo' tiene la composición genética *vat/vat* y es, por tanto, susceptible. El análisis de la resistencia se realizó en la población PIxPSDH en una colaboración con el grupo de Entomología del Centro de Cabrils (Rosa Gabarra y Òscar Alomar), en la que también intervino nuestro equipo y que fue financiada por Semillas Fitó como una actividad lateral del presente proyecto.

El proceso de inoculación implica la cría de una cepa del áfido en condiciones uniformes (usando la variedad Piel de Sapo como planta hospedadora), la transferencia de 10 pulgones en la primera hoja verdadera de 10 plántulas de cada LDH y la evaluación 24 h más tarde del número de pulgones que permanecían en cada planta. Un número igual o superior a 7, determinaba que la planta fuera susceptible y un número inferior a 7 que fuera resistente. Los resultados mostraron un rango de resistencia continuo que no se ajustaba a la distribución bimodal esperada. Por ello se estudiaron otros aspectos de la colonización de los áfidos que pudieran dar lugar a una explicación monogénica de los resultados. Estos fueron: a) la ampliación a 72 h de la medida del número de pulgones que permanecían en la planta, el número de pulgones que habían criado y el número de pulgones que se habían desplazado de la hoja inicial a otras. Ninguno de ellos se comportó de la manera esperada, por lo que se examinaron estos parámetros como si se tratara de un carácter cuantitativo, y el número de pulgones que criaron detectó un QTL significativo mayor (LOD = 5,26) situado en el grupo de ligamiento 4 en una región muy poblada de microsatélites (NR2, NR3 y CSWTA02) y con dos de los homólogos de genes de resistencia MRGH4 y MRGH63 (ver objetivo 2.2). Esta región cubría una distancia genética de 25 cM entre sus marcadores extremos (NR3 y CSWA02) tenía los tres marcadores restantes situados a 2-8 cM del máximo de la curva de LOD para este carácter.

Obtenidos estos resultados, se transfirió la información a la empresa, sugiriéndoles el uso de NR2 para la selección de este carácter. Sin embargo, se descartó continuar con el gen *Vat* para pasos ulteriores ya que: a) Nuestros ensayos de resistencia no nos permitían identificar claramente el genotipo de cada planta para este gen lo que impedía realizar con garantías una aproximación BSA a la búsqueda de marcadores ligados y b) la indudable pero escasa diferencia entre individuos susceptibles y resistentes a la colonización por áfidos, hacía poco interesante este carácter desde un punto de vista comercial.

Objetivo 2: Mapado fino de los genes de resistencia

2.1. Localización de individuos recombinantes en las zonas próximas a cada gen mediante el cribado de una población de tamaño grande

Se prosiguió en esta dirección con el gen *Nsv*. El primer paso consistió en la obtención de marcadores de PCR codominantes a partir de los dos marcadores flanqueantes más próximos al gen (CTA/ACG-115/120 por un lado, y OPD08-0.80 por el otro), además de los que cosegregan con el mismo. Los detalles de este proceso están descritos en el objetivo 3. Para llegar a tener las condiciones óptimas para poder realizar los ensayos de mapado fino tuvieron que resolverse primero algunos aspectos que demoraron su inicio que se situó en Abril de 2001. En primer lugar, la población original de DHLs, consistente en 92 individuos incluía algunos que no eran realmente diplohaploides. Hubo por tanto que hacer una criba de ellos con marcadores, lo que redujo los efectivos de la población a 69 plantas. Segundo, encontramos algunas inconsistencias entre los datos de ligamiento obtenidos con los marcadores y las observaciones sobre la resistencia al virus, lo que obligó a un ensayo posterior de resistencia con seis plantas, que nos permitieron detectar tres casos en los que efectivamente había un error y elaborar un mapa regional completamente consistente. Finalmente, y como situación imprevista nos encontramos que no era posible en las condiciones de nuestros invernaderos cultivar satisfactoriamente el melón fuera del período entre Abril y Octubre. Por tanto, cualquier experimento que obligara a obtener semilla, como es el caso de los ensayos de mapado fino, no podía empezarse más tarde del mes de Julio o, en caso contrario, había que esperar hasta Abril del siguiente año. Así, aunque la información necesaria para iniciar la búsqueda de recombinantes estaba disponible en Septiembre, los experimentos no se han iniciado hasta Abril de este año.

En la actualidad disponemos de una plantación de 1000 individuos de la F_2, de los que hemos analizado 450 y obtenido más de 40 recombinantes entre los dos marcadores flanqueantes que nos permiten avanzar hacia la saturación de la región, que continuará dentro de los próximos meses. Al mismo tiempo, estamos

aprovechando ya la información generada por la localización de BACs que contengan los marcadores de esta región (Objetivo 4), para situar en el mapa marcadores de PCR obtenidos a partir de los extremos de los BACs positivos, con lo que podremos por una parte situar la dirección de estos BACs en el mapa, buscar otros adyacentes en la dirección correcta y obtener marcadores adicionales para la saturación de esta región. Así, el BAC 17e23, que contiene el marcador OPX15-1.06, ha sido secuenciado en sus extremos y se han desarrollado marcadores de PCR de los mismos, que en el momento de escribir esta memoria están siendo mapados en la nueva población F_2.

2.2. Mapado de productos de amplificación obtenidos de zonas de genes de resistencia análogos de otras especies.

Se designaron cebadores degenerados correspondientes a motivos altamente conservados del dominio NBS de genes de resistencia ya descritos. Se amplificó ADN de melón con estos cebadores y se clonaron y secuenciaron los productos de PCR de tamaño 450-550 pb. Se detectaron cuatro familias de homólogos de resistencia (MRGH4, 18, 21 y 63) con similaridades de secuencia de aminoácidos de entre el 45 y el 75% entre sí, 97 al 99% entre miembros de la misma familia y entre 33 y 56% con genes de resistencia de otras especies. Usando los clones obtenidos en melón como sondas de RFLPs, conseguimos situar a tres de ellos en el mapa de esta especie. Dos de ellos (MRGH63 y MRGH4) se situaron en el mismo grupo de ligamiento (G4) a una distancia muy corta (1cM) uno de otro. MRGH21 fue también polimórfico en PIxPS y se situó en la parte distal del grupo de ligamiento 7, a 4cM del marcador más próximo (el RFLP MC52A, ver Oliver et al. 2001). MRGH18 no pudo ser mapado como RFLP por no presentar polimorfismo. Como solución alternativa se designaron cebadores específicos para amplificarlo, pero la digestión posterior de estos fragmentos con diversos enzimas de restricción no produjo el polimorfismo deseado. Finalmente, se localizó un BAC que contenía a MRGH63 y también a MRGH18, lo que indica que esta familia de homólogos de resistencia se encuentra también en la misma región de G4. Este trabajo ha sido publicado (Garcia-Mas et al. 2001)

Objetivo 3: Conversión de los marcadores más cercanos o cosegregantes con el gen en marcadores de tipo PCR

Los dos marcadores cosegregantes con *Nsv* y los dos flanqueantes en PIxPSDH (ACC/ACC-110, OPX15-1.06, CTA/ACG-115/120 y OPD08-0.80) fueron convertidos en marcadores de PCR. Los dos AFLPs fueron clonados procediendo a recortar la banda radioactiva de un gel de acrilamida, reamplificados por PCR, secuenciados y confirmada su identidad con nuevos cebadores AFLP+5 generados a partir de su secuencia. Se diseñaron después cebadores específicos, se amplificó por PCR el ADN de ambos parentales y se localizaron polimorfismos de secuencia que eran reconocidos por un enzima de restricción, obteniéndose de este modo dos marcadores CAPS codominantes. Para los dos RAPDs se recortó la banda polimórfica del gel de agarosa y se procedió de la misma manera que con los AFLPs. Así, se obtuvo un CAPS codominante para OPD08-0.80 y un SCAR dominante para OPX15-1.06.

Objetivo 4: Construcción de una genoteca de BACs ("Bacterial artificial chromosomes") a partir del parental resistente y cribado de la genoteca de BACs.

Esta parte del proyecto fue realizada por el equipo del IBMB-CSIC y su actividad, queda reflejada en el informe correspondiente.

Referencias

Oliver, M., J. Garcia-Mas, M. Cardús, N. Pueyo, A.I. López-Sesé, M. Arroyo, H. Gómez-Paniagua, P. Arús and M.C. de Vicente. 2001. Construction of a reference linkage map for melon. Genome (en prensa)

El resto de las publicaciones citadas se encuentran en el apartado C 1.1.1.

B. RESULTADOS MÁS RELEVANTES ALCANZADOS EN EL PROYECTO

1. CIENTÍFICOS

- Localización de dos genes de resistencia *Nsv* y *Vat* en el mapa genético del melón.
- Obtención de marcadores de PCR próximos a la posición de ambos genes
- Saturación de la zona del mapa que contiene el gen *Nsv* con marcadores de tipo RAPD y AFLP.
- Detección de secuencias homólogas a genes de resistencia a enfermedades (de la clase NBS) y situación de las cuatro familias encontradas en el mapa del melón.
- Obtención de una genoteca de BACs en melón (que a nosotros nos conste es la primera genoteca de grandes fragmentos obtenida en una planta por un grupo español).
- Detección de BACs que contienen los marcadores próximos al gen *Nsv*
- Secuenciación de la mayor parte de las sondas usadas para la obtención RFLPs del mapa del melón.
- Comparación de los mapas de melón y *Arabidopsis*.

2. TECNOLÓGICOS

- Obtención de marcadores de PCR próximos a los siguientes genes del melón:

  Nsv (resistencia al virus del cribado)
  Vat (resistencia a pulgones)

C. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

1.1.1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS

Oliver, M., J. Garcia-Mas, M. Morales, R. Dolcet-Sanjuan, M.C. de Vicente, H. Gómez, H. van Leeuwen, A. Monfort, P. Puigdomènech and P. Arús. 2000. The Spanish melon genome project: construction of a saturated genetic map. Acta Horticulturae 510:375-378.

Jordi Garcia-Mas, J., H. van Leeuwen, A. Monfort, M. C. de Vicente, P. Puigdomènech and P. Arús. 2001. Mapping of resistance gene homologues in melon. Plant Science 161:165-172.

Morales, M., M. Luís, J. M. Álvarez, R. Dolcet-Sanjuan, A. Monfort, P. Arús, amd J. Garcia-Mas. Construction of a genetic map around the locus conferring resistance to MNSV in melon. (enviado).

1.1.2. ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN EN REVISTAS

Ninguno

1.1.3. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Ninguno

1.2. LIBROS, CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS

Arús, P., J.I. Cubero, J. Garcia-Mas y L. Rallo. 2000. Marcadores moleculares en genética y mejora de plantas. En "Biotecnología Vegetal" (J.L. Caballero y V. Valpuesta Eds.) (en prensa)

Garcia-Mas, J., E. Graziano, M. J. Aranzana, A. Monforte, M. Oliver, J. Ballester, M. A. Viruel y P. Arús. 2000. Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos. En: Los Marcadores Genéticos en Mejora Vegetal. F. Nuez y J.M. Carrillo Eds. Editorial U.P.V, València. pp. 93-151.

Monfort, A., J. Garcia-Mas, P. Puigdomènech y P. Arús. 2001. Estructura del genoma. En: Genómica y Mejora Vegetal. F. Nuez, J.M. Carrillo y R. Lozano Eds. Editorial Mundi Prensa. (en prensa)

1.3. PRESENTACIONES EN CONGRESOS, SIMPOSIOS Y REUNIONES (POR INVITACIÓN)

Ninguno por invitación. Se presentaron comunicaciones o carteles a los siguientes congresos:

- V Reunión de Biología Molecular de Plantas (Alicante, Noviembre de 1999)
- 7th Eucarpia meeting on Cucurbit Genetics and Breeding (Israel, Marzo de 2000)
- VIII Seminario conjunto de las secciones de Biología Molecular y Biología del Desarrollo de la Sociedad Catalana de Biología (Sitges, Mayo de 2000)
- Rencontres Franco-Espagnoles: Université de Perpignan-CNRS, IBMB-CSIC (Sitges, Octubre de 2000)

2. PATENTES Y OTROS TÍTULOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

Ninguno

3. OTRAS TRANSFERENCIAS

Los marcadores transferidos a la empresa Semillas Fitó S.A. para la selección de los genes *Nsv* y *Vat* significan un cambio en los procedimientos de la empresa que puede actualmente seleccionar por estos marcadores sin necesidad de realizar el testaje patológico o entomológico de los mismos. El hecho de que los marcadores localizados sean de tipo codominante permite además averiguar si los individuos analizados son homocigóticos o heterocigóticos para dichos genes.

E. PROYECTOS COORDINADOS

Los dos equipos participantes han mantenido una estrecha colaboración a lo largo de todo el proyecto. Algunas de las tareas del mismo han sido compartidas, como la obtención de los homólogos de genes de resistencia, la utilización de marcadores próximos a los genes de interés para la localización de BACs que los contuvieran o la comparación de los mapas de *Arabidopsis* y melón. Otras, como el mapado de los genes de resistencia o la obtención de marcadores codominantes de PCR se han realizado enteramente en el IRTA de Cabrils, mientras que la elaboración de la genoteca de BACs y la secuenciación de las sondas de melón se han hecho en su totalidad en el IBMB-CSIC.

Anualmente se han realizado una o dos reuniones de coordinación que han permitido revisar el estado avance del proyecto y la distribución de tareas de acuerdo con el plan de trabajo. Además los investigadores y doctorandos implicados en el mismo hemos estado en contacto constante, lo que ha sido muy favorable para la buena marcha y resultados globales del proyecto

F. RELACIONES CON EL SECTOR INDUSTRIAL.

F1. Colaboración con las empresas participantes en el proyecto.
1. Describa con detalle la relación mantenida con la(s) Empresa(s)...

La empresa participante en el proyecto fue Semillas Fitó S.A. Tal como estaba previsto en el proyecto original, la empresa proporcionó al proyecto:

- El mantenimiento de la población F_2 PIxPS 'in vitro'
- Realizó los contactos oportunos para realizar las inoculaciones con MNSV en el SIA de Zaragoza
- Financió el experimento de detección del gen *Vat* realizado en su mayor parte por el grupo de Entomología del Centro de Cabrils del IRTA.
- Proporcionó el material vegetal de las F_3 y de la F_2 de la población PIxPS.

La relación ha sido fluida en todo momento, estando la empresa al corriente de la actividad del proyecto y proporcionándonos la información y material solicitado en los momentos adecuados.

2. Describa, si procede, las transferencias realizadas a la(s) Empresa(s)...

Se han transferido a la empresa los marcadores de PCR desarrollados para la selección de los genes *Nsv* y *Vat*. La empresa los usa ya rutinariamente para la selección de estos genes en melón.

3. Indique si esta colaboración ha dado lugar al desarrollo de nuevas propuestas, con la intención de continuarla(s) en el futuro.

Existe en la actualidad una relación estable entre el IRTA y Semillas Fitó que desembocó en la creación de una Unidad Mixta que se inició hace 2 años. Nuestro propósito es continuar con esta colaboración en el futuro, tanto en lo que se refiere a las actividades relacionadas con el uso de los marcadores moleculares en la mejora de hortalizas que llevamos a cabo en la actualidad dentro del presente contrato, como en otras actividades más a largo plazo. Entre estas últimas se cuenta con la participación de los tres partners de este proyecto en un posible proyecto de genómica del melón a presentar en la convocatoria MCYT que se espera dentro de los próximos meses.

F2. Si el proyecto ha dado lugar a otras colaboraciones en el entorno socioeconómico (industrial, administrativo, de servicios, etc.) no previstas inicialmente en el proyecto, descríbalas brevemente.

Ninguna

G. COLABORACIONES Y PARTICIPACIÓN EN PROGRAMAS INTERNACIONALES.

1. Si el proyecto ha dado lugar a colaboraciones con otros grupos de investigación, coméntelas brevemente.

Dada la similitud de objetivos con respecto al gen *Nsv* con el grupo del Dr. Rafael Lozano de la Universidad de Almería tuvimos varios contactos con el objetivo de utilizar la información obtenida por ambos grupos para avanzar con mayor rapidez hacia la clonación de este gen. Estos contactos fructificarán ahora con la petición del proyecto genoma del melón en la nueva convocatoria de genómica, en la que la clonación del gen *Nsv* va a ser previsiblemente uno de los objetivos.

La construcción de la genoteca de BACs se hizo en colaboración con el equipo del Dr. Hong-Bin Zhang del Departament of Soil and Crop Science de Texas A&M University, USA.

2. Si ha participado en proyectos del programa marco de I+D de la UE y/o de otros programas internacionales en temáticas relacionadas con este proyecto, indique programa, tipo de participación y beneficios para el proyecto

Presentamos un proyecto a la última convocatoria del programa marco de la UE sobre la genética de las características del fruto contenidos vitamínicos, composición química y características organolépticas. El proyecto está coordinado por M. Pitrat del INRA de Avignon y participamos en él varios equipos españoles, italianos, ingleses y un equipo israelí. El proyecto no fue aprobado pero será enviado a la próxima convocatoria del programa marco en el mes de Octubre.