

DESARROLLO DE UN MARCADOR MOLECULAR PCR PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE GENOTIPOS RESISTENTES AL VIRUS DEL CRIBADO (MNSV) EN MELÓN

Investigador Principal: Lozano Ruiz, R.

Equipo: Jamilena Quesada, M.; Capel Salinas, J.; Alvarez, J.I.; Celada Jiménez, V.

Centro: Universidad de Almería, S&G Semillas, S.A



1.- INTRODUCCIÓN.-

Los actuales programas de mejora genética en melón están encaminados a incrementar la producción y la calidad de los frutos, y encuadrado en el primer objetivo se encuentra la introducción de resistencias a plagas y enfermedades. Entre los patógenos del melón, los daños producidos por el virus del cribado *Melon Necrotic Spot Virus* (MNSV) (Figura 1), han sido tan importantes, que en zonas productoras de melón como Almería han llegado a constituir el principal factor limitante de la expansión y mantenimiento de la superficie de cultivo (Cuadrado *et al.*, 1993). Si bien se han ensayado, sin éxito, diferentes métodos de control del virus del cribado, sin lugar a duda, el que ofrece mayores garantías de efectividad y menores incidencias medioambientales, es la utilización de variedades resistentes, homocigotas para el alelo recesivo del gen *Nsv/nsv* (Coudriet *et al.*, 1981).



Figura 1. Plantas de melón (semillero) con manchas necróticas en los cotiledones (izquierda) y hojas verdaderas (derecha), causadas por la infección de MNSV.

El desarrollo de nuevas variedades híbridas resistentes a MNSV mediante métodos de mejora clásica es un proceso que requiere de la selección de líneas parentales, portadoras ambas del alelo *nsv* en homocigosis. Ello conlleva la realización de múltiples inoculaciones artificiales con el agente patógeno para seleccionar los descendientes resistentes en cada cruzamiento. Ello implica una excesiva duración del programa de mejora, con el consiguiente gasto de cultivo y personal, así como riesgos medioambientales difíciles de prevenir (contaminación de sustratos, posibilidad de escape del patógeno, etc).

En la actualidad el uso de técnicas de genética molecular permite identificar marcadores moleculares ligados a genes de interés agronómico. Estos marcadores hacen posible la selección temprana de genotipos concretos, en este caso los portadores del alelo que confiere resistencia a MNSV. En el Laboratorio de Genética y Mejora de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería se identificó un marcador RAPD ligado al gen *nsv*, denominado *cri1* (García *et al.*, 1998). Este marcador fue identificado en melones tipo Galia y es de utilidad limitada, dada su naturaleza genética dominante.

En el presente proyecto *cri1* ha sido transformado en un marcador codominante, denominado *cri2*. Asimismo, se evaluó la utilidad del marcador *cri1* en programas de mejora genética de otros tipos varietales de melón cultivados en nuestra provincia. Y por último, utilizando una moderna técnica molecular (AFLP), se han identificado nuevos marcadores aún más estrechamente ligados al gen *nsv*, lo que constituye una información esencial para la obtención de nuevas variedades híbridas de melón resistentes a MNSV.

El trabajo se ha llevado a cabo en su mayor parte en el Laboratorio de Genética y Mejora de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería, si bien la Empresa S&G Semillas, S.A., ha colaborado en la realización de los ensayos de patogenicidad y en la fase de semillero de los distintos ensayos.

2.- METODOLOGÍA Y RESULTADOS.-

A) Clonaje y secuenciación del marcador *cri1*.

El fragmento de ADN correspondiente a *cri1*, se amplificó mediante reacciones tipo PCR-RAPD a partir de ADN de un genotipo de melón sensible a MNSV (GOB), donde está presente dicho marcador, y un genotipo resistente al virus en el que el citado marcador está ausente (G12). También se realizó la reacción de amplificación con ADN del híbrido de ambas líneas puras (F₁). Los productos de estas reacciones se visualizaron y fotografiaron (Figura 2A). El fragmento de ADN correspondiente a *cri1* fue purificado y clonado en un vector plasmídico. En la figura 2B puede verse que uno de los clones reconoce única y específicamente al fragmento *cri1*.

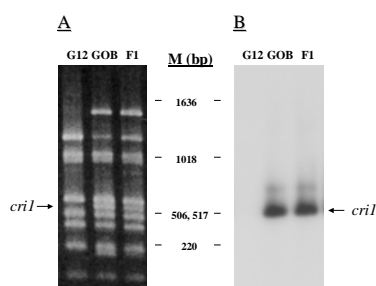


Figura 2. Amplificación y clonación del marcador RAPD *cri1*. El panel A muestra la amplificación del marcador en dos líneas de melón, G12 y GOB resistente y sensible respectivamente al MNSV y en el híbrido de ambas líneas. Estos productos de PCR fueron transferidos a membrana de nylon e hibridados con el inserto de un clon que contenía al marcador. En el centro aparece el tamaño en pares de bases (bp) de un marcador estándar.

Una vez clonado se determinó la secuencia nucleotídica de *cri1*, lo que hizo posible compararla con las bases de datos donde se encuentran todas las secuencias conocidas. Estas comparaciones no han revelado ninguna similitud, por lo que es probable que dicho fragmento corresponda a una región del genoma de melón de función desconocida por el momento. Cabe también la posibilidad de que dicha región sea específica del genoma de melón y especies relacionadas.

B1) Obtención de *cri2* un marcador PCR codominante, útil para la selección de plantas resistentes a MNSV.

Como se ha comentado con anterioridad, el marcador *cri1* es de naturaleza dominante. A partir de la secuencia nucleotídica de *cri1* aplicamos una nueva estrategia molecular, a la que hemos denominado “anchor-RAPD” que permitió convertir *cri1* en un marcador codominante. De este modo, se ha desarrollado un nuevo marcador, denominado

cri2, que permite discernir entre individuos homocigóticos, tanto resistentes como sensibles, así como individuos heterocigóticos, tal y como se muestra en la figura 3, lo que le convierte en una excelente herramienta para la selección eficaz de genotipos de interés en programas de mejora genética dirigidos a la obtención de nuevas variedades de melón resistentes al virus del cribado.

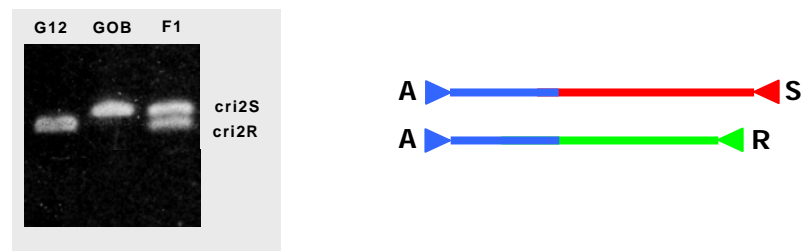


Figura 3. Marcador molecular tipo SCAR cri2. A la izquierda electroforesis de los productos de la PCR. A la derecha se representa un esquema de los productos amplificados, en ambos productos hay una región común, en la que anilla el cebador A y una región específica, en la que anillan los cebadores S o R. La naturaleza codominante de cri2, y su estrecho ligamiento al gen nsv, lo convierten en una herramienta eficaz en programas de selección y mejora asistida por marcadores moleculares.

B2) cri1 se localiza muy cerca del gen nsv en el tipo varietal Amarillo.

Junto a su carácter codominante, la utilidad de un marcador molecular viene dada por la proximidad al gen diana, en este caso al gen de resistencia al virus del cribado. Dado que cri1 fue identificado en un genotipo Galia y que en Almería existen otras variedades de interés como los tipos Piel de Sapo y Cantaloup (Charentais) y Amarillo, lo que se pretendía en este apartado era determinar la distancia genética de dicho marcador al gen Nsv en estos otros cultivares. Para ello se realizaron cruzamientos entre una línea sensible (Nsv, Nsv) y otra resistente (nsv, nsv) a MNSV, en distintos tipos varietales y se autofecundó el híbrido F1 (Nsv, nsv) para obtener una progenie F2 segregante. De esta F2 se sembraron entre 200 y 500 individuos, según los casos (ver Tabla 1), a los que, en estado de cotiledón expandido, se les practicó el fitotest de resistencia a MNSV según protocolo de Cuadrado y col. (1993), encaminado a diferenciar las plantas sensibles de las resistentes. La segregación de la resistencia a MNSV los individuos F2 se ajustaba a un modelo mendeliano y monogénico, esto es, en todos los casos un solo gen recesivo, nsv, es el responsable de la resistencia al virus (Tabla 1).

Tabla1.- Resultado del fitotest de resistencia al MNSV.

Tipo	Nº Plantas Sensibles	Nº Plantas Resistentes	χ^2
Piel de Sapo	162	59	0,560

Cantalupo	341	91	0,059
Amarillo	218	85	0,220

Las plantas sensibles se descartaron, mientras que las resistentes fueron transplantadas a un invernadero tipo parral para obtener las correspondientes semillas F3 provenientes de la autofecundación de cada planta F2. El marcador RAPD *cri1* era polimórfico sólo el tipo Amarillo y monomórfico en el resto de tipos varietales. Este hecho ha permitido mapear el marcador en las plantas del tipo Amarillo e imposibilitado el mapeo en los otros tipos. En el tipo varietal Amarillo, el marcador *cri1* se encuentra a una distancia genética del gen *nsv* de 1,2 cM. Este valor es bastante similar al obtenido en los tipos Galia (0,9 cM), lo que sugiere un posible origen común de la resistencia a MNSV en ambos tipos, diferente de las variedades Piel de Sapo y Cantalupo.

C) Identificación de marcadores moleculares tipo AFLP más estrechamente ligados al gen *nsv*.

Los AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphisms”; Vos y col., 1995), son los marcadores moleculares más modernos y de mayor poder de resolución. Fue por ello que se utilizó esta técnica para identificar nuevos marcadores más estrechamente ligados al gen *nsv*. Con este fin se han estudiado los patrones AFLP generados por 139 combinaciones de cebadores, lo que supone la realización de más de 1000 reacciones AFLPs que nos ha permitido identificar 14 nuevos marcadores, ligados tanto al alelo que confiere resistencia (*nsv*) como al que confiere sensibilidad (*Nsv*).

Estos nuevos marcadores han sido analizados en detalle, especialmente en lo que a su localización en el mapa genético de la región flanqueante al locus *nsv* se refiere (Figura 4). Merece señalar que dos de estos marcadores, C2 y C3, se encuentran muy estrechamente ligados al gen de resistencia, lo que les confiere una buena capacidad para “predecir” si una planta de melón es resistente o no al virus del cribado con una probabilidad cercana al 100%. Con toda esta información se ha podido elaborar el primer mapa genético detallado de esta región del genoma de melón, cuyo interés no sólo científico sino aplicado es indudable. Del mismo se podrán iniciar nuevas líneas de trabajo que posibiliten no sólo la caracterización molecular del gen *Nsv*, sino el análisis funcional de dicho gen así como de otros loci situados en esta zona.

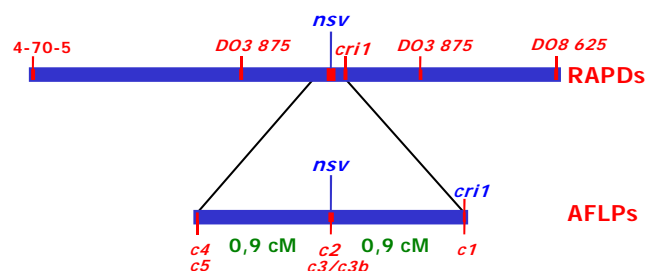


Figura4. Mapa genético de la región cromosómica correspondiente al gen *nsv*.



3.- CONCLUSIONES FINALES Y POSIBLES APLICACIONES.-

- Como conclusión al Proyecto se han desarrollado distintos marcadores moleculares, algunos de muy fácil detección y de enorme utilidad para la selección inequívoca de plantas (genotipos) resistentes al virus del cribado de melón (MNSV) en los tipos Galia y Amarillo. Con algunos de ellos, los denominados cri1 y cri2, la fiabilidad en el diagnóstico de la resistencia a este patógeno es mayor del 99%.
- Con tales marcadores, y en especial empleando como cebadores los correspondientes al marcador cri2, es posible diagnosticar eficazmente mediante reacciones sencillas de PCR, la resistencia al virus del cribado en etapas muy tempranas del desarrollo de la planta, incluso pocos días después de germinar. Ello supone un ahorro importante en tiempo y dinero para cualquier programa de mejora genética encaminado a la obtención de nuevas variedades de melón resistentes al virus del cribado.
- A su vez, los marcadores identificados constituyen las mejores herramientas disponibles, tanto para el agricultor a la hora de detectar problemas de falta de pureza en semilla híbrida, como para los técnicos y patólogos en la identificación de plantas sensibles/resistentes a MNSV en melón.



En el Centro Tecnológico de FIAPA se encuentra a su disposición la Memoria Final del proyecto si necesita más información



F.I.A.P.A.
**Conocimiento y tecnología
al servicio del agricultor.**

Visítanos
<http://www.fiapa.es>

Desarrollo de un marcador molecular pcr para el diagnóstico precoz de genotipos resistentes al virus del cribado (MNSV) en melón

Lozano Ruiz, R.