



Facultat de Biologia



Optimització del protocol de PCR per la selecció de varietats de meló (*Cucumis melo*) resistents a patògens.

Treball final de grau presentat per

Iris Pérez Salvà

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona,

Universitat Politècnica de Catalunya

en col·laboració amb el

Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals

Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Tutor : Dr. Salvador Nogués Mestre

Tutora : Maria Teresa Mas Serra

Barcelona, 8 de Juny 2018.

Index

1	Introducció	6
1.1	Generalitats	6
1.2	Patògens.....	6
1.2.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	7
1.2.2	Melon Necrotic Spot Virus (MNSV)	7
1.2.3	Oïdi	7
1.3	Aplicació de la biotecnologia.....	8
1.3.1	PCR: Polymerase Chain Reaction	8
1.3.2	Resistència a patògens	9
2	Objectius	10
3	Materials i mètodes	11
3.1	Material Vegetal.....	11
3.2	Extracció de l'ADN	11
3.3	Polymerase Chain Reaction (PCR)	11
3.3.1	Procés d'amplificació.....	11
3.3.2	Optimització de paràmetres.....	12
3.4	Electroforesi	14
3.5	Digestió.....	14
4	Resultats i discussió.....	15
4.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	15
4.2	Melon Necrotic Spot Virus (MNSV)	19
4.3	Oïdi	20
5	Conclusions	25
	Annex 1 : Avaluació fenotípica	28
5.1	Avaluació fenotípica.....	28
5.1.1	Avaluació de <i>Fusarium oxysporum</i>	28
5.1.2	Avaluació de MNSV	28
5.1.3	Avaluació de Oïdi.....	29

Resum

El meló (*Cucumis melo*) és un cultiu altament valorat en regions de clima temperat i tropical. No obstant, la seva producció es veu limitada per malalties que provoquen una disminució de la productivitat i de la qualitat del cultiu. Els esforços per superar aquestes limitacions no paren de créixer i els tractaments químics, a pesar de ser un recurs accessible i econòmic, són uns mètodes de control ja coneguts com perillosos per a la salut pública i per a la conservació del medi ambient. Actualment, aquests esforços s'estan concentrant en desenvolupar varietats resistents a aquestes malalties. El desenvolupament de varietats resistents passa per l'anàlisi fenotípica i genètica d'aquestes. L'objectiu principal d'aquest treball és l'optimització dels paràmetres de PCR per determinar la presència o absència de regions gèniques vinculades a la resistència a patògens en el cultiu del meló. En aquest treball es tenen en compte tres de les majors patologies en el cultiu de *Cucumis melo* causades per : *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* , MNSV (Melon Necrotic Spot Virus) i oïdi per *Podosphaera xanthii* i per *Golovinomyces cichoracearum*. S'ha realitzat l'anàlisi genètic de les varietats 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12 i 13 proveïdes per Rocalba S.A. mitjançant l'ús de marcadors moleculars i la tècnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amb electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%. Els marcadors moleculars utilitzats han sigut SB17₆₄₅, SV01₅₇₄, Fom2-S₃₄₂, Fom2-R₄₀₈ i Marker F/f per *Fusarium oxysporum*; M29 per MNSV; CMBR120, CMBR8, MRGH5, MRGH63, Marker E , Marker D, SCAR0305 per oïdi. Els encebadors són específics per cada marcador, així com la temperatura d'anellament dels encebadors a l'ADN és també específica i varia en funció de les condicions del laboratori. Aquest treball ha optimitzat aquesta temperatura per cada marcador comparant els resultats de les PCR amb els resultats de l'anàlisi fenotípic i amb la bibliografia. Els resultats d'aquest treball han demostrat que els marcadors Fom2-S₃₄₂ , Fom2-R₄₀₈ , MRGH5, MRGH63 i SCAR0305 ens permetran detectar resistència al patogen corresponent en les varietats de meló estudiades. S'ha pogut establir la temperatura d'anellament òptima per a aquests marcadors així com el temps d'elongació per a alguns, el que permetrà en un futur la selecció de varietats resistents per a les següents fases del projecte.

Resumen

El melón (*Cucumis melo*) es un cultivo altamente valorado en regiones de clima templado y tropical. Sin embargo, su producción se ve limitada por enfermedades que provocan una disminución de la productividad y de la calidad del cultivo. Los esfuerzos para superar estas limitaciones no paran de crecer y los tratamientos químicos, a pesar de ser un recurso accesible y económico, son unos métodos de control ya conocidos como peligrosos para la salud pública y para la conservación del medio ambiente. Actualmente, estos esfuerzos se están concentrando en desarrollar variedades resistentes a estas enfermedades. El desarrollo de variedades resistentes pasa por el análisis fenotípica y genética de estas. El objetivo principal de este trabajo es la optimización de los parámetros de PCR para determinar la presencia o ausencia de regiones génicas vinculadas a la resistencia a patógenos en el cultivo del melón. En este trabajo se tienen en cuenta tres de las mayores patologías en el cultivo de *Cucumis melo* causadas por: *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, MNSV (Melon necrótico Spot Virus) y oidio por *Podosphaera xanthii* y por *Golovinomyces cichoracearum*. Se ha realizado el análisis genético de las variedades 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12 y 13 provistas por Rocalba S.A. mediante el uso de marcadores moleculares y la técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Los marcadores moleculares utilizados han sido SB17645, SV01574, Fom2-S342, Fom2-R408 y Marker F / f para *Fusarium oxysporum*; M29 para MNSV; CMBR120, CMBR8, MRGH5, MRGH63, Marker E, Marker D, SCAR0305 para oidio. Los cebadores son específicos para cada marcador, así como la temperatura de anillamiento de los cebadores al ADN es también específica y varía en función de las condiciones del laboratorio. En estetrabajo se ha optimizado la temperatura para cada marcador comparando los resultados de las PCR con los resultados del análisis fenotípico y con la bibliografía. Los resultados de este trabajo han demostrado que los marcadores Fom2-S342, Fom2-R408, MRGH5, MRGH63 y SCAR0305 nos permitirán detectar resistencia al patógeno correspondiente en las variedades de melón estudiadas. Se ha podido establecer la temperatura de anillamiento óptima para estos marcadores así como el tiempo de elongación para algunos, lo que permitirá en un futuro la selección de variedades resistentes para las siguientes fases del proyecto.

Abstract

Melon (*Cucumis melo*) is a highly valued crop in temperate and tropical climate regions. However, its production is limited by diseases that cause a decrease in productivity and the quality of the crop. Efforts to overcome these limitations do not stop growing and chemical treatments, despite being an accessible and economic resource, are control methods already known as dangerous for public health and for the conservation of the environment. Currently, these efforts are concentrating on developing varieties resistant to these diseases. The development of resistant varieties goes through the phenotypic and genetic analysis of these. The main objective of this work is the optimization of the parameters of PCR to determine the presence or absence of genetic regions linked to the resistance to pathogens in the cultivation of melon. In this work, three of the major pathologies in *Cucumis melo* culture are considered : *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, MNSV (Spot Necrotic Melon Virus) and powdery mildew by *Podosphaera xanthii* and *Golovinomyces cichoracearum*. The genetic analysis of the varieties 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.9, 10, 11, 12 and 13 provided by Rocalba S.A. through the use of molecular markers and the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique with 2,5% agarose gel electrophoresis. The molecular markers that have been used are SB17645, SV01574, Fom2-S342, Fom2-R408 and Marker F / f for *Fusarium oxysporum*; M29 for MNSV; CMBR120, CMBR8, MRGH5, MRGH63, Marker E, Marker D, SCAR0305 for powdery mildew. The primers are specific for each marker, as well as the annealing of the primers to the DNA is also specific and varies depending on the laboratory conditions. This work has optimized this temperature for each marker by comparing the results of the PCR with the results of the phenotypic analysis and the bibliography. The results of this work have shown that the Fom2-S342, Fom2-R408, MRGH5, MRGH63 and SCAR0305 markers will allow us to detect resistance to the corresponding pathogen in the studied melon varieties. The optimal annealing temperature for these markers has been established as well as the elongation time for some of them. This fact will allow the selection of resistant varieties for the following phases of the project.

1 Introducció

1.1 Generalitats

La família de les cucurbitàcies inclou un número important de cultius d'interès agronòmic i econòmic. Cultius com el cogombre (*Cucumis sativus*), el meló (*Cucumis melo*), la carbassa (*Cucurbita moschata*), la síndria (*Citrullus lanatus*) o el carbassó (*Cucurbita pepo* L.) en són alguns exemples. Tots ells són cultivats arreu del món i tenen un fort impacte en la civilització moderna (Dong *et al.* 2016).

El meló (*Cucumis melo*), es una espècie diploide ($2x=2n=24$) amb un genoma estimat en 454 Mb. L'any 2012, es va obtenir el genoma del meló en un treball liderat per Pere Puigdomènech, del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), i Jordi Garcia Mas, de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), que van desenvolupar el seu treball al Centre de Recerca en Agrigenòmica de Barcelona (CRAG). Va comptar amb una col·laboració destacada del grup dirigit per Roderic Guigó, del Centre de Regulació Genòmica (CRG) (DICAT, 2012). Per altre banda, també s'han obtingut avanços en la caracterització molecular d'importants trets agronòmics com ara la resistència a patògens o la determinació sexual. Fins a present s'han descobert 411 gens putatius de resistència a malalties en el meló. El número d'aquest tipus de gens no es conserva entre diferents espècies vegetals el que pot donar una idea de l'evolució de cada espècie i de les pressions evolutives que han patit (Garcia-Mas *et al.* 2012).

No obstant, aquestes resistències s'han trobat en genotips salvatges molt llunyans de les varietats cultivades a Espanya el que dificulta el procés de millora genètica degut a què es necessita un gran número de retrocreuaments per incorporar la resistència. És aquí on la biotecnologia obre moltes possibilitats, permetent que els processos siguin més ràpids i fiables. Una de les tècniques biotecnològiques més útils és la selecció assistida per marcadors moleculars en la que es construeixen mapes genètics a partir de marcadors moleculars. En els mapes genètics es poden localitzar gens d'interès associats a resistències a malalties. A més, als programes de millora assistida per marcadors (MAS) es realitzen creuaments dirigits i es poden diagnosticar les característiques desitjades de manera precoç sense haver d'analitzar fenotípicament el caràcter d'interès. El desenvolupament de marcadors permet determinar la presència o no del gen desitjat i és una forma de selecció més ràpida i fiable que els processos de selecció tradicional (Morales Germán 2005).

1.2 Patògens



Figura 1: a) Fotografia d'una planta de meló infectada per *Fusarium oxysporum* .b) Fotografia de la tija i fulles d'una planta de meló infectada pel virus MSNV . c) Escala empleada en l'avaluació de resistència a *Podosphaera fusca*. Adaptat de www.mapama.gob.es.

1.2.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Fusarium oxysporum és un fong causant de la fusariosis vascular en el meló i que afecta a més d'un centenar d'espècies vegetals. Colonitza els conductes xilemàtics bloquejant i tapant els vasos conductors, el que provoca l'aparició de símptomes d'estrès hídric fins eventualment la mort de la planta. Els símptomes poden ser de "tipus Yellow" caracteritzat per l'engroguiment de les nerviacions al que segueix l'engroguiment generalitzat del limbe foliar, juntament amb estries necròtiques formades en les tiges i pecíols acompanyat d'una exsudació gomosa i posterior mort de la planta. L'altre ve caracteritzat pel marcimant de la planta sense engroguiment, que es desenvolupa des de l'àpex de les tiges fins la base de la planta que pot quedar verda, denominat com a "tipus Wilt". (Vázquez and Marquina 2000)

Tenir el control d'aquesta malaltia amb l'aplicació de fungicides i bona praxis és difícil ja que el fong sobreviu al sòl i és capaç de colonitzar residus del cultiu o bé les arrels dels altres cultius en rotació amb el meló. Com a resultat de la persistència d'aquest fong al sòl hi ha una especial atenció posada sobre la resistència genètica a aquest.(MAPAMA 2018)

Es coneixen 4 races fisiològiques (R0, R1, R2 i R1-2) i dos gens de resistència (Fom-1 i Fom-2). Périn et al. (2002) en un recull de gens mapejats i associats a resistències exposa que un anàlisi fenotípic demostraria que el gen Fom-1 confereix resistència a les races 0 i 2 i que el gen Fom-2 confereix resistència a les races 0 i 1, segons Risser (1973). Més endavant, s'ha trobat que per algunes varietats, aquests dos gens confereixen resistència al patogen. Concretament, s'ha trobat que la varietat *Doublon* té el gen Fom-1 que li confereix resistència a les races 0 i 2, i que la varietat CM 17187 té el gen Fom-2 que li confereix resistència a les races 0 i 1 (Herman R et al. 2007). Més tard, s'identifica de manera general, és a dir no només per unes varietats concretes, aquesta resistència associada als dos gens Fom-1 i Fom-2. (Oumouloud et al. 2012).

1.2.2 Melon Necrotic Spot Virus (MNSV)

El virus "de les taques necròtiques de meló" o MNSV, de la família *Tombusviridae* del gènere *Carmovirus*, afecta a cultius de meló, de síndria i de cogombre. En meló, els símptomes són visibles a les fulles amb lesions necròtiques donant aspecte de necrosis dels nervis. Al coll de la tija s'observen estries necròtiques que poden provocar la mort per dessecació . Al fruit rarament s'observen símptomes.

La resistència a MNSV al meló ve donada per la regió cromosòmica del gen *nsv* que ha demostrat ser efectiu per a totes les races de virus excepte per la MNSV-264 que és capaç de superar aquesta resistència. Aquesta resistència s'observa a nivell cel·lular (MAPAMA 2018).

1.2.3 Oïdi

L'oïdi és una malaltia important en meló causada per *Podosphaera xanthii* i per *Golovinomyces cichoracearum*. Afecta en diverses àrees del món donat que colonitza en qualsevol estació de l'any i de manera indiscriminada a qualsevol sistema de cultiu (López et al. 2005). Les races 1,2 i 5 de *P.xanthii* són les que més afecten al sud d'Europa (Lebeda et al. 2011)

Fins avui s'han utilitzat molts tractaments químics per tal de controlar el creixement d'aquest fong però l'ús indiscriminat d'aquests fungicides ha resultat en el desenvolupament de

resistència a aquests productes. Tot i així aquests productes es segueixen utilitzant. La preocupació per la salut pública augmenta i la necessitat de desenvolupar cultius resistents sembla la opció més adequada per controlar aquesta patologia (Yuste-Lisbona *et al.* 2011a).

1.3 Aplicació de la biotecnologia

1.3.1 PCR: Polymerase Chain Reaction

La tècnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica de biologia molecular desenvolupada per Kary Mullis l'any 1986 que té com a objectiu amplificar, és a dir, copiar en grans quantitats un fragment d'ADN per tal d'identificar la presència o absència d'aquest en el genoma d'un individu (M S Bartlett *et al.* 2003).

Els passos bàsics de la PCR són:

1- Desnaturalització (95°C): S'aplica calor fins a arribar a la temperatura anomenada de desnaturalització per separar, o desnaturalitzar, les cadenes d'ADN. D'aquesta manera obtenim els motlles de cadena senzilla pel següent pas.

2- Anellament (T_a): es disminueix la temperatura de reacció a la temperatura d'anellament T_a específica de l'encebador per a què aquest es pugui unir a les seqüències complementaries al motlle d'ADN de les cadenes senzilles.

3- Extensió (72 °C): s'augmenta la temperatura de la reacció per tal que l'enzim polimerasa sintetitzi o expandeixi les noves cadenes d'ADN.

D'aquesta manera, repetint 35 vegades els passos 1,2 i 3 obtenim un gran número de còpies a partir de les poques còpies inicials de la regió objectiu. (M S Bartlett *et al.* 2003).

La temperatura d'anellament de l'encebador ve donada per la temperatura de fusió d'aquest per la fórmula següent:

$$T_a = T_m - 3^\circ\text{C}$$

On T_m depèn de la quantitat de bases G,C, A i T de l'encebador. Aquesta temperatura no és fixa i caldrà optimitzar-la per a cada un. A més, el temps al qual mantenim les mostres a la temperatura d'elongació, 72 °C, també és determinant i caldrà optimitzar-lo (M S Bartlett *et al.* 2003).

Els encebadors tenen com a funció detectar marcadors, és a dir seqüències del genoma, que poden ser RAPDs (Random amplified polymorphic DNA) o SCARs (Sequence Characterized Amplified Region) entre altres. Els RAPDs són marcadors que permeten detectar polimorfismes o mutacions amplificant de manera aleatòria fragments del genoma amb encebadors de seqüència curta i arbitrària. D'aquesta manera comparant els patrons de multibandes de diferents individus es poden detectar bandes de tamany diferencial. Els SCARs són marcadors que es desenvolupen a partir dels RAPDs. Els encebadors que s'utilitzen són específics i amplifiquen la seqüència de mutació que és d'interès. (Picó Sirvent and Pérez de Castro 2008)

En algunes ocasions, per detectar diferents al·lels d'interès entre els cromosomes s'utilitza la tècnica dels CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences). En aquesta, els enzims de restricció aprofiten seqüències de reconeixement de restricció tallant o digerint l'ADN de manera que resulten dos fragments de mides diferents detectables en la lectura del gel d'agarosa al 2,5% després d'electroforesi (Figura 2) (Konieczny and Ausubel 1993).

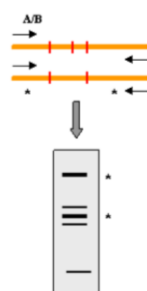


Figura 2: Esquema de l'ADN i les seqüències de reconeixement i de la lectura del gel d'agarosa al 2,5% d'electroforesi posteriors a una digestió amb enzim de restricció. Adaptat de (Konieczny and Ausubel 1993).

1.3.2 Resistència a patògens

S'han utilitzat marcadors moleculars per cada resistència al patògen estudiada i les seqüències dels encebadors per determinar-ne la seva presència o no en les varietats estudiades (Taula 1). L'espècie vegetal utilitzada és la mateixa per a tots els patògens estudiats, és a dir *Cucumis melo*.

Taula 1: Marcadors moleculars associats a regions gèniques que confereixen resistència a patògens.

Patògen	Marcador molecular	Seqüència de l'encebador	Enzim de restricció	Referència
<i>Fusarium oxysporum</i> (races 0 i 2)	SB17 ₆₄₅	5'AGGGAACGAGTTGAGAGAGCTAGA3' 5'CGAGGATTCTTAAGTAGCATGGA3'	-	(Oumouloud et al. 2008)
<i>Fusarium oxysporum</i> (races 0 i 2)	SV01 ₅₇₄	5'TGACGCATGGAATGAAATAAA3' 5'GCAYGCCCAAGGTCCAATA3'	-	(Oumouloud et al. 2008)
<i>Fusarium oxysporum</i> (races 0 i 1)	Fom2-S ₃₄₂	5'ATGAAAAGAAAAGATAACGACGA3' 5'ATTGCTCTAAGTTGATCATATTCTG3'	-	(Oumouloud et al. 2012)
<i>Fusarium oxysporum</i> (races 0 i 1)	Fom2-R ₄₀₈	5'GAGAAATTTGCAATGGGTGG3' 5'TTACTATTATTGCTCAACTTGC3'	-	(Oumouloud et al. 2012)
<i>Fusarium oxysporum</i> (races 0 i 1)	Marker F/f	5'TGTGGATGGCACAAGGT3' 5'CAATGGTCCAATTCAATAA3'	BclI	(Gao et al. 2015)
MNSV	M29	5'CATCAATTAAGACGACACACAGG3' 5'TCGAGAACCTTTTTATTATTGATGG3'	Afl III	(Morales et al. 2005a)
<i>Podosphaera xanthii</i> (raça 2F)	CMBR120	5'CTGGCCCCCTCCTAAACTAA3' 5'CAAAAAGCATCAAAATGGTTG3'	-	(Zhang et al. 2013)
<i>Podosphaera xanthii</i> (raça 2F)	CMBR8	5'TTTCACTTTTTCCCGCCG3' 5'AATGAAAAGGGGAAGTGCAA3'	-	(Zhang et al. 2013)

<i>Podosphaera xanthii</i> (races 1,2 i 5)	MRGH5	5'CATCTTTCTGGGTCTTCT3' 5'CGATTCTTAACCATGCAA3'	-	(Yuste-Lisbona et al. 2011b)
<i>Podosphaera xanthii</i> (races 1,2 i 5)	MRGH63	5'GAACATCTCATCCCTCAAGTT3' 5'GGAAGAACAGAGCCAAAGAA3'	-	(Yuste-Lisbona et al. 2011b)
<i>Podosphaera xanthii</i> (races 1,2 i 5)	Marker E	5'CCTTAGAAGAAGATGAAGTCTCCC3' 5'CTCCTCAGCAATTGGTAGGTGCC3'	-	(Yuste-Lisbona et al. 2011b)
<i>Podosphaera xanthii</i> (races 1,2 i 5)	Marker D	5'AACAACCTTAGAACCATCTCCCAGC3' 5'GTTGTTGAGAGCAATAGTGTACCC3'	-	(Yuste-Lisbona et al. 2011b)
<i>Podosphaera xanthii</i> (raça PxCh1)	SCAR0305	5'CCCTATGCTCATTAACCTCG3' 5'GCTGCATAATGCCTAGCTA3'	-	(Liu et al. 2010)

2 Objectius

Les condicions de PCR són diferents segons cada laboratori, segons els reactius i protocols utilitzats. Cadascun dels autors citats utilitzen un laboratori diferent al d'aquest treball, així com protocols d'extracció i de PCR diferents. És per això que aquest treball té com a objectiu estandarditzar la temperatura d'anellament, i quan ha sigut necessari el temps d'elongació de les PCR utilitzant els marcadors que han utilitzat aquests mateixos autors, en les condicions de treball del laboratori on s'ha dut a terme i per a les varietats estudiades.

Així doncs, l'objectiu principal d'aquest treball és l'optimització dels paràmetres de PCR per determinar la presència o absència de regions gèniques vinculades a la resistència a patògens en el cultiu del meló.

L'objectiu específic del treball és:

Optimitzar els paràmetres de PCR com la temperatura d'anellament, els gradients d'aquestes i el temps d'elongació.

Entre totes les consideracions que influeixen en el bon desenvolupament de la PCR, la concentració de Mg^{2+} i/o la manipulació de la temperatura d'anellament són les dues que més favorablement solucionen la majoria dels problemes. (Lorenz 2012). En aquest treball s'ha optat per fer modificar les condicions del cicle en comptes de modificar els reactius, manipulant la temperatura d'anellament. Lorenz 2012 recomana manipular la temperatura d'anellament combinant-ho amb altres modificacions del cicle. Per això en aquest treball s'ha modificat el temps d'elongació per alguns marcadors a més de la temperatura d'anellament, quan la manipulació d'aquesta no ha donat resultats concluints.

3 Materials i mètodes

3.1 Material Vegetal

Les varietats utilitzades de meló (*Cucumis melo*) van ser les 1, 2 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 i 13 i van estar proporcionades per Rocalba S.A.

3.2 Extracció de l'ADN

La metodologia d'aquest protocol va ser adaptada d'una adaptació de Borges *et al.* (2009) i establerta en funció del tampó d'extracció MATAB (100 mM de TRIS-HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% MATAB, 1% PEG 6000 i 0.5 % sulfit de sodi) (Doyle & Doyle 1987). La quantitat de plantes utilitzades va ser en funció de la necessitat de volum de mostra d'ADN utilitzat en les PCR i del gasto d'aquest. Les plantes utilitzades van ser *in vitro*. A mesura que s'anava utilitzant el volum de mostra d'ADN per a les PCR, es preveia una sembra de llavors de les varietats per a les quals faltava volum de mostra amb una setmana d'antelació i posteriorment a l'extracció les plantes eren descartades.

Es van prendre dos discs de fulles de meló de 1 cm de diàmetre i es van posar en un tub Eppendorf de 2 mL amb dues boles de vidre i es va afegir aproximadament 0,05 g de PVP. Mitjançant un triturador de boles es va triturar les mostres. Es va addicionar 0,9 mL de tampó MATAB (100 mM de TRIS-HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% MATAB, 1% PEG 6000 i 0.5 % sulfit de sodi) prèviament escalfat a 70°C i es va deixar incubant durant 1h a 74 °C. Es va homogeneïtzar cada 15 minuts amb el vòrtex. Seguidament, es va afegir 0,9 mL de cloroform (IAA 24:1) i centrifugar 5 min a 13000 rpm a 10 °C. Es va transferir el sobrenedant a un nou tub de 2 mL i afegir 5 µL de RNAsa. Es va incubar durant 30 minuts a 37 °C. Després, es va afegir 1 mL de cloroform i es va centrifugar 5 min a 13000 rpm a 10 °C. Es va transferir el sobrenedant aquesta vegada a un tub Eppendorf de 1,5 mL i es va afegir 0,6 mL d'isopropanol. Es va centrifugar 5 min a 13000 rpm a 10 °C i es va afegir 0,4 mL d'etanol al 70% i 10 µL d'acetat de sodi 3M. Es va centrifugar 5 min a 13000 rpm a 10 °C i es va abocar el contingut del tub suaument i es va deixar assecant durant 24 hores. Finalment, es va re suspendre l'ADN en 50 µL d'aigua miliQ estèril en agitació durant 2 hores. Per comprovar que l'extracció es va haver fet adequadament, es va fer un gel de qualitat al 1% d'agarosa amb les mostres extretes.

3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.3.1 Procés d'amplificació

El procés d'amplificació ve donat per dues etapes: la preparació de la mescla de reactius i l'etapa de reacció al termociclador.

La primera etapa consisteix en afegir en ordre els reactius indicats (Taula 2) en un tub Eppendorf de 1,5 mL en gel per mantenir una temperatura baixa. Després afegir els 2 µL d'ADN i portar a centrifugar a 2000 rpm durant 15 segons a 10 °C. S'efectuarà un control negatiu en cada PCR utilitzant 2 µL de H₂O miliQ autoclavada en comptes de l'ADN.

Taula 2: Reactius i quantitats.

Reactius	Quantitats (μL)
H ₂ O miliQ autoclavada	14.6
Tampó de reacció Paq5000 (10x)	2
dNTP Mix (10mM cadascun)	0.4
Encebador FWD 10 uM	0.4
Encebador REV 10 uM	0.4
Paq5000 DNA Polimerasa (5U/ μL)	0.2
Mostra ADN	2
Volum Total	20

Seguidament portar al termociclador (Taula 3). Aquí és on es dona l'amplificació dels fragments d'ADN.

Taula 3: Temps i temperatura del programa d'amplificació del termociclador.

Temps	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
5 min	94
30 seg	94
30 seg	$T_{\text{anellament}}$
$t_{\text{elongació}}$	72
5 min	72
10 min	4

} x35

3.3.2 Optimització de paràmetres

Les temperatures d'anellament s'han testat inicialment al gradient $\pm 1^{\circ}\text{C}$, és a dir un grau per sobre i un grau per sota, de la temperatura d'anellament de referència degut a que la temperatura d'anellament és de 3° a 5°C inferior a la temperatura de fusió. En alguns casos s'ha donat que $\pm 1^{\circ}\text{C}$ no era adequat i s'ha modificat en funció del resultat amb el primer test .

Taula 4: Marcadors moleculars i raça del patògen associat ,temperatures d'anellament teòriques i testades i referències d'aquests.

Marcador molecular	Temperatura d'anellament de referència (°C)	Temperatures d'anellament testades (°C)	Referència
SB17645 (Fom 1)	65	64 65 66	(Oumouloud et al. 2008)
SV01574 (Fom 1)	64	63 64 64,5 65	(Oumouloud et al. 2008)
Fom2-R408 (Fom 2)	61	60 61 62	(Oumouloud et al. 2012)
Fom2-S342 (Fom 2)	60	59 60 61	(Oumouloud et al. 2012)
Marker F/f (Fom 2)	50	48 49 50	(Gao et al. 2015)
M29 (MSNV)	61	60 61 62	(Morales et al. 2005b)
SCAR0305 (Px.1)	55	54 55 56	(Liu et al. 2010)
CMBR120 (Px.2)	54	53 54 55	(Zhang et al. 2013)
CMBR8 (Px.2)	55	54 55 56	(Zhang et al. 2013)
MRGH5 (Px.5)	52	51 52 53	(Yuste-Lisbona et al. 2011a)
MRGH63B (Px.5)	52	51 52 53	(Yuste-Lisbona et al. 2011a)
Marker D (Px.5)	52	51 52 53 54 55	(Yuste-Lisbona et al. 2011c)

En alguns casos, en vista de que els resultats no eren els esperats tot i testat les diferents temperatures d'anellament, s'ha modificat el temps d'elongació alhora que es testaven les diferents temperatures. El temps d'elongació ve determinat per l'enzim polimerasa utilitzada. Es va utilitzar la Paq5000 que segons el prospecte triga 30 segons per kilobase per polimeritzar. Pels marcadors Pm-8, CMBR8 i Marker D es volia amplificar un fragment de 124 parells de bases o pb:

$$\frac{30 \text{ segons}}{1000 \text{ parells base}} * 124 \text{ bases} = 3,72 \text{ segons} \approx 4 \text{ segons}$$

De la mateixa manera, pel Marker E es volia amplificar un fragment de 644 pb i pel Marker F/f es volia amplificar un fragment de 776 pb.

Taula 5: Marcadors moleculars i temps d'elongació teòrics i testats corresponents.

Marcador molecular	Temps d'elongació teòric	Temps d'elongació testats
Pm-8	90s	90s ; 4s
CMBR8	30s	30s ; 2 min; 4s
Marker D	2 min	2min; 4s
Marker E	2min	2min; 20s
Marker F/f	1min	1min; 24s

3.4 Electroforesi

Es prepara el gel d'agarosa al 2,5 % (2,5g d'agarosa per 100 mL de TAE) afegint l'agarosa al TAE (242,28 g Tris , 57,1 mL Acid Acètic glacial , 200 mL EDTA, H₂O miliQ fins a 1 L) en un matràs de 250 mL. Per dissoldre l'agarosa s'escalfa al microones , agitant el matràs cada 1 minut, fins que la mescla es pot veure transparent. S'afegeix l' intercalant Redsafe al 5%. Es disposa a la cubeta d'electroforesi i es deixa gelificar.

Afegir 4 µL de tampó de càrrega blau a les mostres que s'han amplificat al termociclador. Re-suspendre amb la pipeta i carregar els 20 µL a cada pouet del gel al 2,5% d'agarosa. Afegir a l'últim pouet 3,5 µL de marcador de pes molecular. Fer córrer el gel a 90 V durant aproximadament 90 minuts. Es llegeix el gel al fotodocumentador que detecta la senyal quimioluminiscent de l' intercalant Redsafe mitjançant el software Image Lab.

3.5 Digestió

En el cas d'haver-hi digestió amb un enzim de restricció, el procediment inicial a seguir és el mateix, únicament augmentant el volum inicial de mescla per la posterior digestió (Taula 6). Després de la primera lectura es digereixen les mostres que han aparegut positives (Taula 7) al termociclador. El programa utilitzat és de 60 minuts a 37 °C, de manera general, depenen de l'enzim de restricció. Seguit de 5 minuts a 65 °C i finalment 20 minuts a 80 °C. Després es porta a electroforesi. En aquesta no caldrà utilitzar tampó de càrrega blau (veure 3.3) ja que el tampó de reacció de la "mescla 2" ja porta tampó de càrrega verd. Finalment es porta el gel d'agarosa al 2,5% a la segona lectura.

Taula 6: Reactius i quantitats de la mescla per a posterior digestió.

Reactius	Quantitats (µL)
H ₂ O miliQ autoclavada	19,5
Tampó de reacció Paq5000 (10x)	2
dNTP Mix (10mM cadascun)	0.4
Encebador FWD 10 uM	0.4
Encebador REV 10 uM	0.4
Paq5000 DNA Polimerasa (5U/µL)	0.2
Mostra ADN	2
Volum Total	25

Taula 7: Reactius i quantitats de la "mescla 2" per digestió.

Reactius	Quantitats (µL)
H ₂ O miliQ autoclavada	17
Tampó de reacció	2
Enzim de restricció	1
Producte PCR	10

4 Resultats i discussió

Es van donar per correctes els resultats de les PCR quan les bandes apareixien amb una intensitat notable, no hi havien inespecificitats (bandes d'altres pesos moleculars), les bandes apareixien al pes molecular adequat i el control negatiu amb H₂O apareixia negatiu. La temperatura d'anellament òptima es va determinar en base als resultats de l'avaluació fenotípica (Annex 1 : Avaluació fenotípica) en comparació amb els resultats de les PCR i les referències bibliogràfiques.

4.1 *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*

Per al marcador SB17645 es va observar en un inici, al provar el gradient ± 1 de la temperatura d'anellament de referència, que la temperatura més òptima semblava 65 °C (Figura 3 A) i es va fer una segona PCR per tal de corroborar-ho. Al fer-la, es va fer evident que la temperatura de 66 °C en l'anterior PCR mostrava menys inespecificitats (Figura 3 B). Per tal d'eliminar-les es va fer una tercera PCR a 66 °C, que efectivament va presentar menys inespecificitats però que a la vegada les bandes no van coincidir amb les dues PCR's anteriors (Figura 3 C).

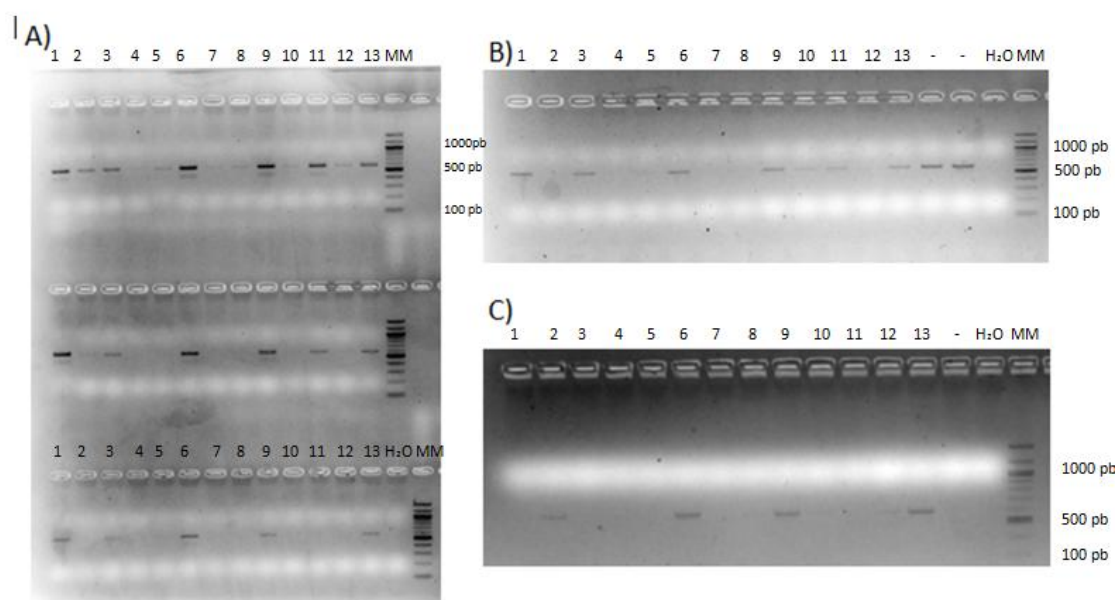


Figura 3: Lectures pel marcador SB12645 en gel d'agarosa al 2,5%. Banda a 649 pb (parells de bases). A) De dalt a baix, les temperatures d'anellament són : 64 °C , 65 °C , 66 °C . B) 65 °C. C) 66 °C.

Amb el marcador SV01574 es va veure que en un inici al provar el gradient ± 1 de la temperatura d'anellament de referència mostrava bandes amb moltes inespecificitats per sota de la referència, a 63 °C, i en seguia mostrant a la temperatura de referència, 64 °C (Figura 4 A,B)). Per sobre d'aquesta temperatura, a 65 °C les bandes mostraven una baixa intensitat (Figura 4 D)). Es volia buscar un entremig entre eliminar les inespecificitats i tenir bandes d'alta intensitat, de manera que es va provar amb 64,5 °C i es va obtenir aquest entremig desitjat (Figura 4 C)).

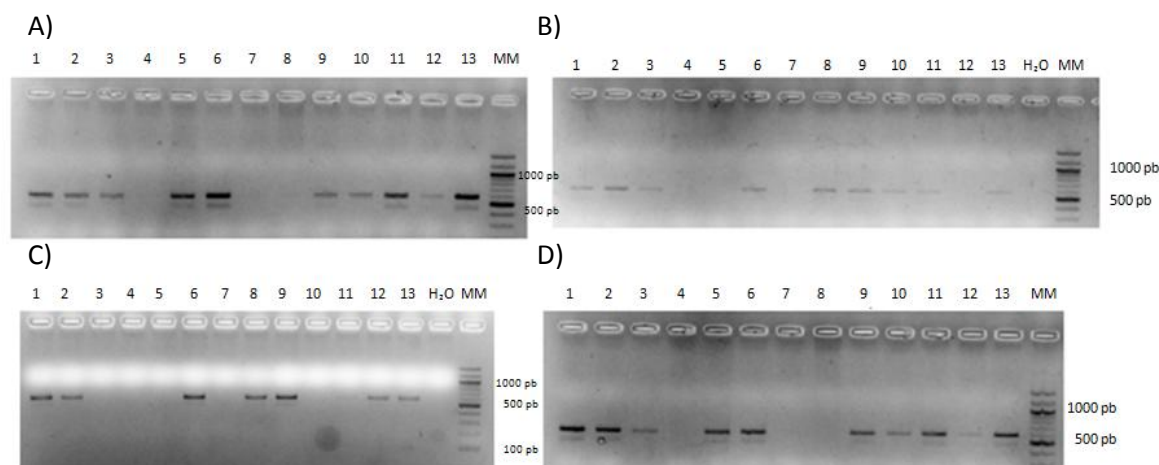


Figura 4: Lectures pel marcador SV01574 amb diferents gradients de temperatura d'anellament en gel d'agarosa al 2,5%. Banda a 649 pb. Les temperatures corresponents són : A) 63 °C , B) 64 °C, C) 64,5 °C , D) 65 °C.

Per a la raça 1 de *F.oxysporum* es considera que els nivells 1 i 2 son resistents (R), i 3,4 i 5 son susceptibles (S) (veure 5.1.1). Els resultats presentats en la Taula 8 indiquen que els dos marcadors SCAR (veure 1.3.1), SB17645 i SV01574, no separarien totes les varietats estudiades segons el seu fenotip de resistència. El fragment amplificat pel marcador SB17645 va ser observat en tres de deu varietats resistents , alhora que una varietat de les susceptibles també va amplificar. El fragment amplificat pel marcador SV01574 va ser observat en cinc de deu varietats resistents , alhora que la varietat susceptible així com per SB17645 també va amplificar.

La discrepància entre resistència / susceptibilitat i presència / absència de la banda també s'ha identificat amb aquests dos marcadors en diverses varietats de meló. Aquesta discrepància podria recolzar la hipòtesi de que diferents genotips tenen diferents al·lels de resistència per les races 1 i 2 de *F.oxysporum* que es van originar independentment en diferents llinatges de la filogènia del meló (Oumouloud *et al.* 2008). També es posa en evidència que un altre gen, a més a més del ja esmentat Fom-1 (veure 1.2.1), anomenat Fom-3 podria conferir resistència a les races 0 i 2 de *F.oxysporum* (Zink and Gubler 1985) el que podria explicar els resultats. Doncs una varietat podria tenir el gen Fom-3 i presentar resistència a l'hora de l'avaluació fenotípica però a l'hora d'efectuar la PCR no hi hauria amplificació degut a que cap dels dos marcadors SCAR són específics per aquest gen. Per altre banda, (Oumouloud *et al.* 2008) exposen que ambdós marcadors no estan altament vinculats al gen de manera que esdeveniments de recombinació podrien ser la causa de que no s'hagi genotipat correctament. És per això que en aquest treball per tal d'explorar la hipòtesi de l'existència de diferents al·lels de resistència (Oumouloud *et al.* 2008) s'han analitzat diversos marcadors per a una mateixa raça del patogen.

Es considera interessant realitzar futurs estudis mitjançant l'ús d'un gran ventall de marcadors per una mateixa raça del patogen en qüestió, per les varietats que s'han pogut observar fenotípicament resistents, per tal d'identificar-ne més concretament la o les regions que els hi confereixen tal resistència. Per les varietats 2,6 i 9 (Taula 8) podem deduir-ne que és el gen *Fom-1* el que els hi confereix la resistència a *F.oxysporum*. Per la varietat 12 és possible que esdeveniments de recombinació com va exposar Oumouloud *et al.* (2008) siguin la causa de la presència dels marcadors SB17645 i SV01574 però que s'observi sensibilitat. En altres paraules, el marcador SB17645 o SV01574 pot estar present en el genoma però el gen de resistència *Fom-1* al haver-se recombinat pot ser que no hi sigui present, el que faria que presentés resistència però amplifiqués en la PCR. Donat els resultats i considerant els estudis d'altres autors i autores, es considerarà com a òptima la temperatura d'anellament per als marcadors SB17645 i SV01574 (Taula 12). No obstant es tindrà en compte que els marcadors Fom2-R408 i Fom2-S342, pels resultats i per la bibliografia, semblen ser més adequats per detectar resistència a *F.oxysporum* (veure a continuació).

Taula 8: Resultats de les PCR i de les avaluacions fenotípiques per *F.oxysporum* .

Varietats	Avaluació fenotípica per Fom 1*	SB17645 (Fom 1)**	SV01574 (Fom 1)**
1	R	-	+
2	R	+	+
3	R	-	-
4	R	-	-
5	R	-	-
6	R	+	+
7	S	-	-
8	R	-	+
9	R	+	+
10	R	-	-
11	S	-	-
12	S	+	+

*R : resistent ; S : susceptible . ** + : presència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%; - : absència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%.

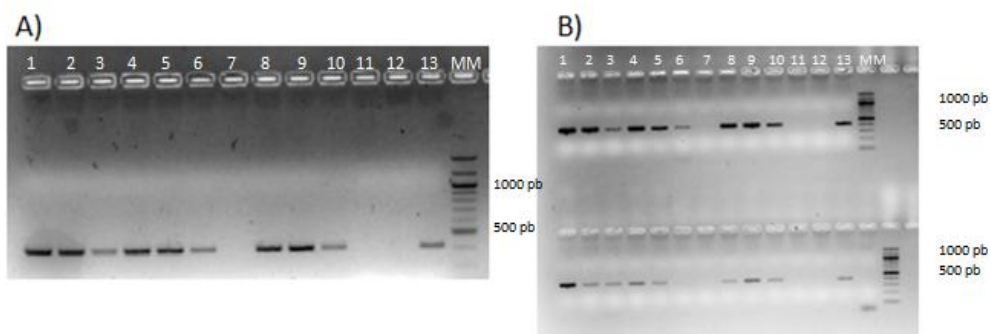


Figura 5: Lectures pel marcador Fom2-R408 amb diferents gradients de temperatura d'anellament en gel d'agarosa al 2,5%. Banda a 408 pb. Les temperatures corresponents són : A) 60 °C , B) De dalt a baix: 61 °C ,62 °C. D

La lectura per al marcador Fom2-R408 va presentar a 61 °C les bandes de pes molecular esperat, sense inespecificitats i amb control negatiu, de manera que es va establir 61 °C com a temperatura d'anellament (Figura 5).

Per al marcador Fom2-S342 al fer el gradient ± 1 °C es van obtenir bandes sense inespecificitats a 60 °C però el control apareixia positiu (Figura 6 A)). Per tant es va repetir únicament a 60 °C i es van obtenir resultats correctes amb el control negatiu (Figura 6 B)).

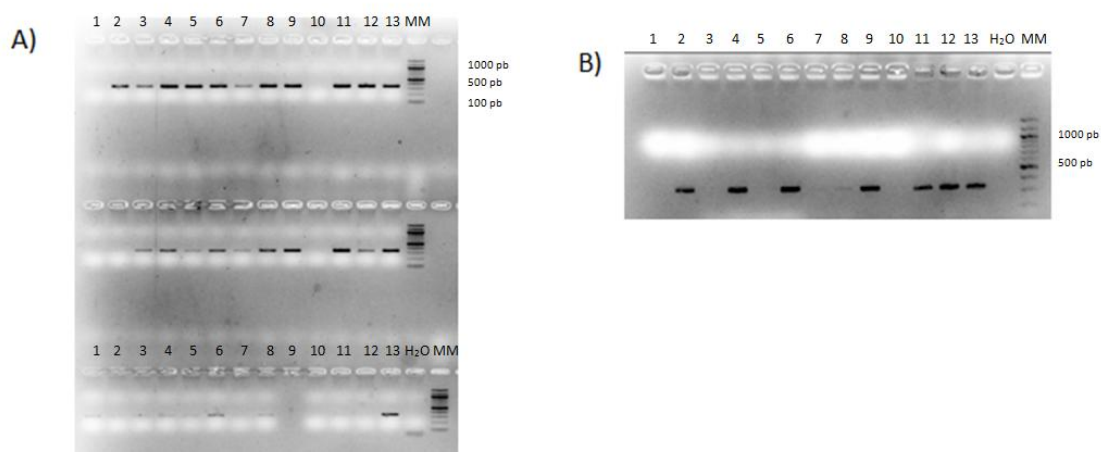


Figura 6: Lectures pel marcador Fom2-S342 amb diferents gradients de temperatura d'anellament en gel d'agarosa al 2,5%. Banda a 408 pb. A) De dalt a baix: 59 °C , 60 °C ,61 °C. B) 60 °C.

Els resultats presentats en la Taula 9 indiquen que el fragment amplificat pel marcador Fom2-R408 va ser observat en deu de les dotze varietats resistents , alhora que no ho va ser en la varietat susceptible. En el cas del marcador Fom2-S342, en set de les tretze varietats resistents es va poder observar el fragment amplificat i en la varietat susceptible no va aparèixer amplificació. Oumouloud *et al.* (2012) defineix ambdós marcadors com a *Functional Markers* (FMs), que són altament predictius del fenotip donat que tenen com a objectiu el polimorfisme funcional dins un gen desitjat i també perquè superen el problema esmentat per Oumouloud *et al.* (2008) de la recombinació/llogam. Per tant es dona per establerta la temperatura d'anellament òptima per als marcadors Fom2-R408 i Fom2-S342 (Taula 12).

Taula 9 :Resultats de les PCR i de les avaluacions fenotípiques per *F.oxysporum* .

Varietats	Avaluació fenotípica per Fom 2*	Fom2-R408 (Fom 2)**	Fom2-S342 (Fom 2)**
1	R	+	-
2	R	+	+
3	R	+	-
4	R	+	+
5	R	+	-
6	R	+	+
7	S	-	-
8	R	+	+
9	R	+	+
10	R	+	-
11	R	-	+
12	R	-	+

*R : resistent ; S : susceptible . ** + : presència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%; - : absència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%.

Per al marcador Marker F/f, els resultats van aparèixer correctament per la fase d'amplificació (Figura 7 A) però per la fase de digestió no es van obtenir resultats concloents (Figura 7 B).

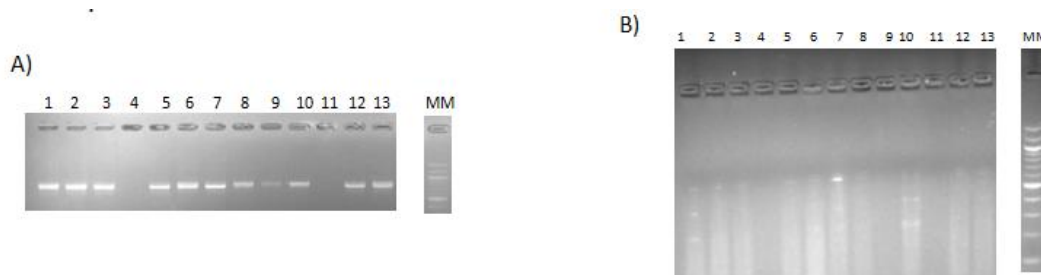


Figura 7: Lectures pel marcador Marker F/f . A: Lectura després de l'amplificació , banda 776 pb. B: Lectura després de la digestió, banda a 512/264 pb (ff) o 776/512/264 pb (Ff).

Els resultats obtinguts pel marcador Marker F/f no poden ser objecte de discussió donat que no es van obtenir resultats concloents en la fase de digestió. En la fase experimental es va seguir el protocol de digestió esmentat en el 3.5, on la digestió amb l'enzim *BclI* es donava a 37 °C durant 60 minuts. Gao *et al.* (2015) proposa 55 °C durant 12 hores, amb el que va obtenir resultats satisfactoris. Així va poder distingir els al·lels de *Fom-2* que conferissin resistència i per tant va poder establir una relació entre el marcador Marker F/f i la resistència. Per tant no serà possible definir una temperatura d'anellament òptima per aquest marcador.

4.2 Melon Necrotic Spot Virus (MNSV)

Per al marcador M29 es van obtenir lectures amb resultats correctes per a l'amplificació però no per a la digestió (Figura 8). D'aquest fet resulta que no es podrà determinar la temperatura d'anellament òptima per aquesta PCR.

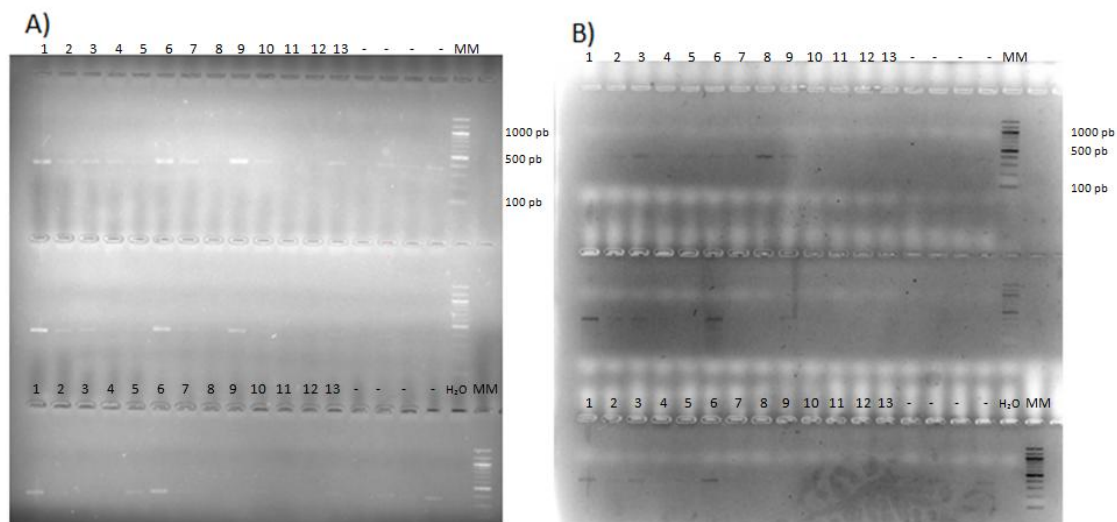


Figura 8: Lectures pel marcador M29 . A: Lectura després de l'amplificació , banda a 191 pb. B: Lectura després de la digestió, banda 191/174 pb si resistent.

Els resultats obtinguts pel marcador M29 no poden ser objecte de discussió donat que no es van obtenir resultats en la fase de digestió. En la fase experimental es va seguir el protocol de digestió esmentat en el 3.5, on la digestió amb l'enzim *AflIII* es donava a 37 °C durant 60 minuts. Aquest enzim requereix una temperatura de reacció de 37 °C i deixar incubant durant la nit (un temps d' aproximadament 12 hores). En un estudi s' ha pogut relacionar aquest marcador amb la presència de l'al·lel de resistència *nsv* mitjançant la digestió amb *AflIII* del producte de PCR de 360 bp. Es va obtenir un patró de dues bandes de 191 i 174 bp per l'al·lel resistent i un patró d'una banda de 360bp, és a dir no digerit, per l'al·lel susceptible (Morales et al. 2005b). En aquest treball no serà doncs possible establir la temperatura d'anellament òptima per al marcador M29.

4.3 Oïdi

Per als marcadors CMBR120 ,MRGH5 i MRGH63B es va provar el gradient ± 1 °C i es va poder observar en la lectura que les bandes apareixien correctament per a una temperatura d'anellament de 54 °C per a CMBR120 (Figura 9 A)) i de 52 °C per a MRGH5 i MRGH63B (Figura 9B) i C) respectivament).

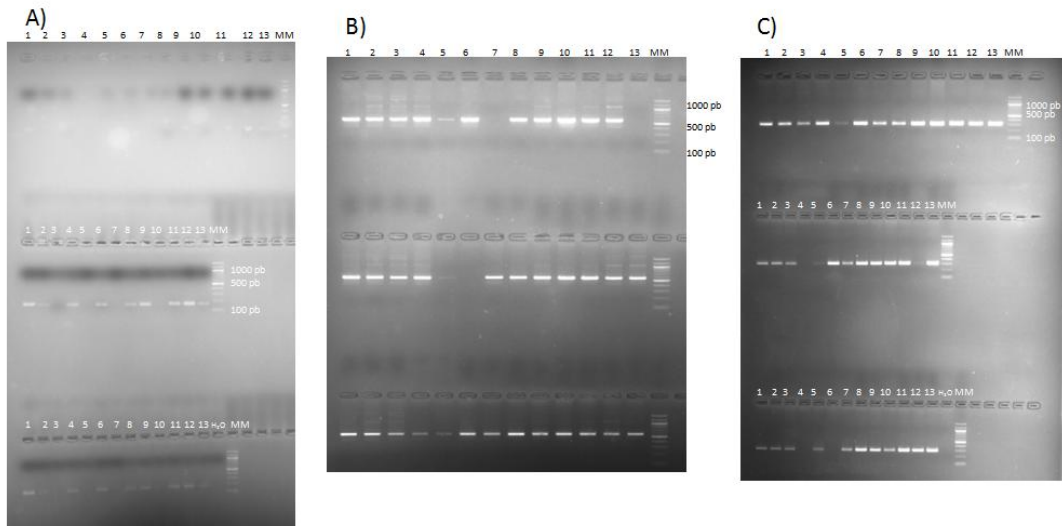


Figura 9: Lectura pel marcador CMBR120 (A) banda 124 pb ,MRGH5 (B) i MRGH63B (C) banda 500 pb, amb diferents gradients de temperatura d'anellament en gel d'agarosa al 2,5%. Les temperatures corresponents són de dalt a baix: A) 53 °C, 54 °C ,55 °C; B) i C) 51 °C, 52 °C ,53 °C.

El temps d'elongació òptim es va determinar amb els mateixos criteris que la temperatura d'anellament òptima. Pels marcadors Pm-8, CMBR8 i Marker D es va fer una primera prova amb el gradient ± 1 °C de la temperatura d'anellament de referència i amb el temps d'elongació de referència ,el que va donar resultats amb moltes inespecificitats (Figura 10). Per tal de corregir-ho es va disminuir el temps d'elongació d'acord amb els càlculs fets (veure 3.2.2) (Figura 11).

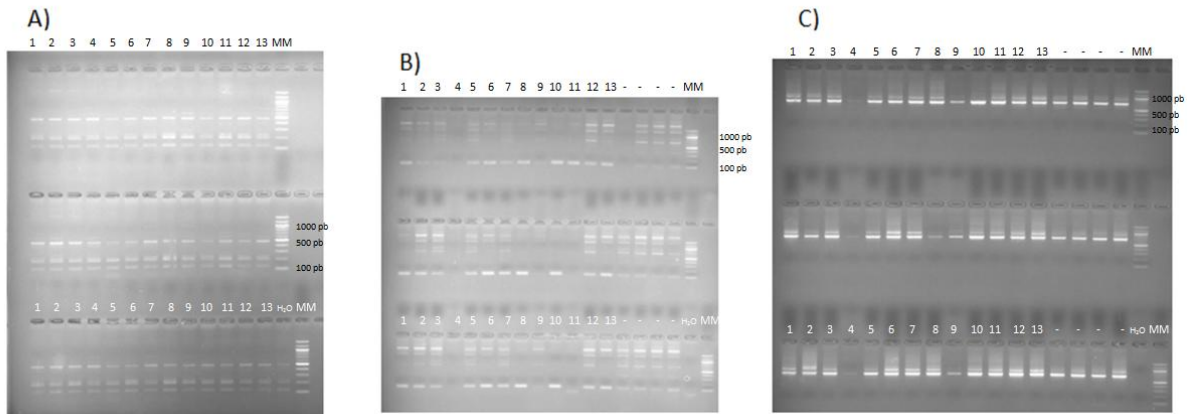


Figura 10: Lectura pels marcadors Pm-8 (A) , CMBR8 (B) i Marker D (C) amb diferents gradients de temperatura d'anellament en gel d'agarosa al 2,5%. Les temperatures corresponents són de dalt a baix: A) i B) 54 °C, 55 °C ,56 °C, C) 51 °C, 52 °C, 53 °C.

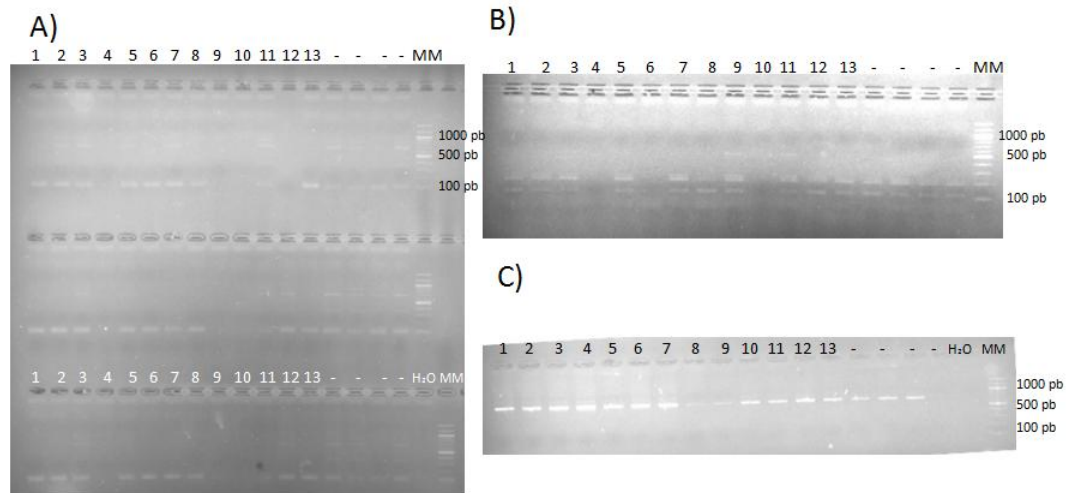


Figura 11: Lectura pels marcadors CMBR8 (A) banda a 124 pb, Pm-8 (B) banda a 124 pb i Marker D (C) banda 500 pb amb diferents gradients de temperatura d'anellament en gel d'agarosa al 2,5%. Les temperatures corresponents són A) de dalt a baix: 54 °C, 55 °C, 56 °C, B) 55 °C, C) 54 °C.

El marcador associat al gen dominant de resistència a *P.xanthii* es localitza en una regió no codificant que es troba entre els gens MRGH5 i MRGH63B. Es dedueix que ambdós gens son part d'un *cluster* o grup de gens que confereixen resistència a les races 1,2 i 5 de *P.xanthii* (Yuste-Lisbona *et al.* 2011b). Els resultats obtinguts i presentats en la Taula 10 indiquen que pel marcador MRGH5 vuit de onze de les varietats resistents van presentar banda d'amplificació, i que pel marcador MRGH63B van ser nou de onze. Aquests resultats i l'estudi de Yuste-Lisbona *et al.* (2011) suggereixen que efectivament es poden associar ambdós marcadors a la resistència a les races 1,2 i 5 de *P.xanthii* i per tant es poden establir unes temperatures d'anellament òptimes per a la reacció de PCR.

Per altre banda, el fragment amplificat pel marcador Marker D va ser observat en sis de les onze varietats resistents (Taula 10). Anteriorment s'ha trobat que diversos marcadors, entre els quals el Marker D, es localitzen en la mateixa regió genòmica que el QTL (Quantitative Trait Locus) que confereix resistència a les races 1,2 i 5 de *P.xanthii* (Yuste-Lisbona *et al.* 2011c). Anteriorment s'han trobat marcadors també vinculats a QTL de resistència, com els marcadors CMBR120 i CMBR08 (veure a continuació) per Fukino *et al.* (2008). D'aquesta manera s'ha deduït que el Marker D pot ser utilitzat per identificar aquesta resistència en les varietats estudiades i es dona per validada la temperatura d'anellament i el temps d'elongació de la PCR en les condicions del laboratori.

Taula 10 : Resultats de les PCR i de les avaluacions fenotípiques per oïdi.

Varietats	Avaluació fenotípica per Px.5*	MRGH5 (Px.5)	MRGH63B (Px.5)	Marker D (Px.5)
1	R	+	+	+
2	R	+	+	+
3	S	+	+	+
4	R	+	-	-
5	R	+	+	+
6	R	-	+	-
7	R	-	+	+
8	R	+	+	
9	R	+	+	+
10	R	+	+	
11	S	+	+	+
12	S	+	-	+
13	R	+	+	+

*R : resistent ; S : susceptible . ** + : presència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%; - : absència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%.

El fragment amplificat pel marcador SCAR0305 va ser observat en vuit de les dotze varietats resistents (Taula 11). En un estudi focalitzat en desenvolupar marcadors, entre els quals el SCAR0305, Liu *et al.* (2010) van trobar que aquests marcadors estan relacionats amb un locus, anomenat Pm-8, que confereix resistència a les races 1 i N1 de *P.xanthii*. Al estar relacionats es dedueix que podien ser possibles candidats per detectar varietats resistents. Aquest estudi va obtenir resultats en els que 73 de les 74 varietats resistents estudiades presentaven banda per al marcador SCAR0305 i cap de les 34 susceptibles presentaven banda, demostrant que el marcador SCAR0305 és una eina útil en el desenvolupament de varietats resistents. Donats els resultats i l'estudi efectuat per Liu *et al.* (2010) el marcador SCAR0305 podrà ser utilitzat per identificar aquesta resistència en les varietats estudiades i es dona per validada la temperatura d'anellament i el temps d'elongació de la PCR en les condicions del laboratori (Taula 12).

Els marcadors CMBR120 i CMBR08 trobats primer per Ritschel *et al.* (2004) i després per Fukino *et al.* (2008) es van confirmar no relacionats amb *Pm-8* (Liu *et al.* 2010) però amb el gen *Pm2-F* (Zhang *et al.* 2013). En aquest últim, Zhang *et al.* (2013) exposa que els marcadors CMBR120 i CMBR08 estan vinculats al gen *Pm2-F*, gen que efectivament confereix resistència a l'oïdi. En aquest treball no s'ha efectuat avaluació fenotípica per la raça 2F de *P.xanthii*, Px.2. En l'estudi de Zhang *et al.* (2013) s'efectua l'avaluació fenotípica de tretze varietats, subjectes a confidencialitat, el que no permet comparar l'avaluació fenotípica de l'estudi amb els resultats de les PCR d'aquest treball. Per tant no serà possible establir una temperatura d'anellament òptima ni temps d'elongació òptim per a la reacció de PCR per ambdós marcadors en les condicions del laboratori.

Taula 11: Resultats de les PCR i de les avaluacions fenotípiques per oïdi.

Varietats	Avaluació fenotípica per Px.1*	SCAR0305 (Px.1)
1	R	+
2	R	+
3	R	+
4	R	-
5	R	+
6	R	-
7	R	+
8	R	+
9	R	+
10	R	-
11	S	+
12	R	+
13	R	+

*R : resistent ; S : susceptible . ** + : presència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%; - : absència de banda en electroforesi en gel d'agarosa al 2,5%.

Taula 12 : Resum de resultats

Marcadors Moleculars	Temps d'elongació òptim (s)	T _a òptima (°C)	Referència
SB17645 (Fom 1)	-	66	(Oumouloud et al. 2008)
SV01574 (Fom 1)	-	64,5	(Oumouloud et al. 2008)
Fom2-R408 (Fom 2)	-	61	(Oumouloud et al. 2012)
Fom2-S342 (Fom 2)	-	60	(Oumouloud et al. 2012)
Marker F/f (Fom 2)	-	NO*	(Gao et al. 2015)
M29 (MSNV)	-	NO*	(Morales et al. 2005b)
MRGH5 (Px.5)	-	52	(Yuste-Lisbona et al. 2011a)
MRGH63B (Px.5)	-	52	(Yuste-Lisbona et al. 2011a)
CMBR8 (Px.2)	-	56	(Zhang et al. 2013)
CMBR120 (Px.2)	-	NO*	(Zhang et al. 2013)
SCAR0305 (Px.1)	4	55	(Liu et al. 2010)
Marker D (Px.5)	4	54	(Yuste-Lisbona et al. 2011c)

*Per aquests marcadors no ha sigut possible establir la temperatura d'anellament.

5 Conclusions

L'objectiu principal d'aquest treball ha sigut l'optimització dels paràmetres de PCR per determinar la presència o absència de regions gèniques vinculades a la resistència a patògens en el cultiu del meló (*Cucumis melo*). Els resultats obtinguts han permès identificar com a vàlids alguns dels marcadors estudiats per tal de detectar resistència. Aquests marcadors vàlids han sigut: per *Fusarium oxysporum* SB17645 , SV01574, Fom2-R408 i Fom2-S342; per MSNV no ha sigut possible ; per *Podosphaera xanthii* MRGH5, MRGH63B, CMBR8, SCAR0305 i Marker D.

L'objectiu específic del treball ha sigut optimitzar els paràmetres de PCR com la temperatura d'anellament, els gradients d'aquestes i el temps d'elongació. Aquest objectiu s'ha pogut assolir amb els marcadors validats, pels quals s'ha establert la temperatura d'anellament per cadascun d'ells i el temps d'elongació per alguns, en les condicions de treball del laboratori (Taula 12). Establir aquests paràmetres òptims per les PCR permetrà que es puguin seleccionar entre les varietats d'interès quines seran les més favorables a passar a la fase següent del projecte. Aquesta selecció suposa un estalvi de temps i de recursos important, pel que aquest treball contribueix a l'estalvi.

Bibliografía

- Borges A, Rosa M, Recchia G, et al (2009) CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Sci Agric* 66:529–534. doi: 10.1590/S0103-90162009000400015
- Dong YQ, Zhao WX, Li XH, et al (2016) Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Rep* 35:1991–2019. doi: 10.1007/s00299-016-2018-7
- Fukino N, Ohara T, Monforte AJ, et al (2008) Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 118:165–175. doi: 10.1007/s00122-008-0885-1
- Gao P, Liu S, Zhu QL, Luan FS (2015) Marker-assisted selection of Fusarium wilt-resistant and gynoecious melon (*Cucumis melo* L.). *Genet Mol Res* 14:16255–16264. doi: 10.4238/2015.December.8.16
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, et al (2012) The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:11872–11877. doi: 10.1073/pnas.1205415109
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4:403–10.
- Lebeda A, Křístková E, Sedláková B, et al (2011) Gaps and perspectives of pathotype and race determination in *Golovinomyces cichoracearum* and *Podosphaera xanthii*. *Mycoscience* 52:159–164. doi: 10.1007/s10267-010-0098-8
- Liu L, Chen Y, Su Z, et al (2010) A sequence-amplified characterized region marker for a single, dominant gene in melon PI 134198 that confers resistance to a unique race of *Podosphaera xanthii* in China. *HortScience* 45:1407–1410.
- López F, Fernández D, Cánovas I, et al (2005) Control químico del oídio de cucurbitáceas. *Vida Rural* 50–54.
- Lorenz TC (2012) Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* e3998. doi: 10.3791/3998
- Morales M, Orjeda G, Nieto C, et al (2005a) A physical map covering the nsv locus that confers resistance to Melon necrotic spot virus in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 111:914–922. doi: 10.1007/s00122-005-0019-y
- Morales M, Orjeda G, Nieto C, et al (2005b) A physical map covering the nsv locus that confers resistance to Melon necrotic spot virus in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 111:914–922. doi: 10.1007/s00122-005-0019-y
- Morales Germán M (2005) IDENTIFICACIÓN DE UN CANDIDATO PARA EL GEN nsv QUE CONFIERE RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS MANCHAS NECRÓTICAS DEL MELÓN (MNSV) MEDIANTE CLONAJE POSICIONAL.
- Oumouloud A, Arnedo-Andres MS, Gonzalez-Torres R, Alvarez JM (2008) Development of molecular markers linked to the Fom-1 locus for resistance to Fusarium race 2 in melon. *Euphytica* 164:347–356. doi: 10.1007/s10681-008-9664-y
- Oumouloud A, Mokhtari M, Chikh-Rouhou H, et al (2012) Characterization of the Fusarium wilt resistance Fom-2 gene in melon. *Mol Breed* 30:325–334. doi: 10.1007/s11032-011-9622-6
- Périn C, Hagen LS, De Conto V, et al (2002) A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theor Appl Genet* 104:1017–1034. doi: 10.1007/s00122-002-0864-x
- Picó Sirvent MB, Pérez de Castro AM (2008) Marcadores moleculares basados en PCR : Marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA). Fragmentos de ADN

- polimórficos amplificados al azar. 1–10.
- Ritschel PS, Lins TCL, Tristan RL, et al (2004) Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol* 4:9.
- Vázquez JG, Marquina JCT (2000) Presencia de la raza 1-2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en Almería. *Bol San Veg Plagas* 26:27–33.
- Yuste-Lisbona FJ, Capel C, Gómez-Guillamón ML, et al (2011a) Codominant PCR-based markers and candidate genes for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 122:747–758. doi: 10.1007/s00122-010-1483-6
- Yuste-Lisbona FJ, Capel C, Gómez-Guillamón ML, et al (2011b) Codominant PCR-based markers and candidate genes for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 122:747–758. doi: 10.1007/s00122-010-1483-6
- Yuste-Lisbona FJ, Capel C, Sarria E, et al (2011c) Genetic linkage map of melon (*Cucumis melo* L.) and localization of a major QTL for powdery mildew resistance. *Mol Breed* 27:181–192. doi: 10.1007/s11032-010-9421-5
- Zhang C, Ren Y, Guo S, et al (2013) Application of comparative genomics in developing markers tightly linked to the Pm-2F gene for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). *Euphytica* 190:157–168. doi: 10.1007/s10681-012-0828-4

Annex 1 : Avaluació fenotípica

5.1 Avaluació fenotípica

L'avaluació fenotípica esmentada a continuació es va dur a terme per integrants de l'equip d'investigació del Dr. Salvador Nogués Mestre , es va fer abans d'aquest treball i formarà part d'una publicació que es farà properament. És a dir, el que s'explica a continuació no forma part de la fase experimental d'aquest treball, però els resultats d'aquesta avaluació fenotípica es consideren una part important per tal de contrastar els resultats d'aquest treball. Degut a que tal avaluació encara no s'ha publicat i per tant no es pot citar en aquest treball, s'explica de manera resumida com es va dur a terme per posar en context els resultats d'aquesta.

5.1.1 Avaluació de *Fusarium oxysporum*

Es van avaluar les races de 0, 1 i 2 de *F.oxysporum* per a la susceptibilitat o resistència en meló. Per a l'avaluació es va utilitzar material fúngic provinent de BCCM (Bèlgica). Les plantes van créixer en hivernacle fins que la tercera fulla verdadera es va expandir. Es van retirar les plantes del substrat , es van rentar les arrels amb aigua de l'aixeta i es van banyar durant 30 segons en una solució aquosa de $3 \cdot 10^6$ espores/mL . 30 dies després les plantes es van avaluar segons els símptomes usant una escala de 1 a 5: 1, la planta no presenta patologia , com la planta control; 2, baixos nivells de "wilting" i "yellowing" de les fulles; 3, les fulles estan altament afectades ; 4, totes les fulles es troben en afectades; 5, planta morta. El nivell 1 i 2 són considerats com a resistència, el 3 a 5 com a susceptibles. Es va efectuar un test chi - quadrat per comprovar la resistència o susceptibilitat per cada raça de *Fusarium oxysporum* (Taula 13).

Taula 13: Avaluació fenotípica de les varietats en funció del patogen. Graduació de l'1 al 5 de menys a més afectació. En groc les susceptibles.

Patogen \ Varietats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fom 1	1,6	2,2	1,8	1,2	2,0	1,0	5,0	2,0	1,0	1,0	5,0	5,0
Fom 2	1,4	1,6	1,6	1,6	1,8	1,8	5,0	1,0	1,2	1,8	2,0	2,0

5.1.2 Avaluació de MNSV

Les plantes van créixer en hivernacle fins que la tercera fulla verdadera es va expandir. L' inoculació mecànica es va fer al cotiledó amb una solució de 0,03 M Na_2HPO_4 , 0,2 % DIECA, 75 g/L de carbur de silici i 1 g de fulla infectada amb MNSV. Un cop l' inoculació va ser feta, les plantes van créixer a 22 °C i 50-70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ de llum fluorescent sota un fotoperíode de 16/8 h de dia/nit. El nivell 0 i 1 es consideren resistents, els nivells 2 a 4 es consideren susceptibles (Taula 14).

Taula 14: Avaluació fenotípica de les varietats en funció del patogen. Graduació de l'1 al 5 de menys a més afectació. En groc les susceptibles.

Patogen \ Varietats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MSNV	1,8	1,8	2,2	2,3	2,2	2,4	2,3	1,7	2,2	2,3	2,7	2,2

5.1.3 Avaluació de Oïdi

Es van avaluar les races 1,2,3,3.5 i 5 de *Podosphaera xanthii* per determinar-ne la resistència o susceptibilitat en meló. El material fúngic va ser provinent de GEVES (França). Les plantes van créixer a l' hivernacle fins que la tercera fulla verdadera es va expandir. Es van prendre discs de fulla de 9 cm de diàmetre de la primera fulla verdadera i es van desinfectar en una solució aquosa al 20% d'hipoclorit amb 4 gotes/L de Tween 20, durant 20 segons. Es van fer 2 rentats amb aigua destil·lada estèril i plaquejats en plaques de Petri (sterilin LTD, Cambridge). El medi d'avaluació de *P.xanthii* consistia en 25 mg/L de Benzimidazol i 1,6 g/L d'agar. Els discs de fulla van ser inoculats manualment amb 5 conidiòfors. Després de 15-25 dies, els discs van ser fenotípicament avaluats d'acord amb el nivell d'esperulació utilitzant una escala de 0 a 4: 0, no hi ha esporulació; 1, hi ha presència de hifes però no de conidiòfors i el disc té un color groc; 2, hi ha hifes i fins a 20 conidiòfors ; 3, de 20 a 100 conidiòfors; 4, més de 100 conidiòfors. El nivell 0 i 1 es consideren resistents, els nivells 2 a 4 es consideren susceptibles. El test de chi - quadrat es va efectuar per comprovar la resistència o susceptibilitat a cada raça de *P.xanthii* (Taula 15).

Taula 15: Avaluació fenotípica de les varietats en funció del patogen. Graduació de l'1 al 5 de menys a més afectació. En groc les susceptibles.

Patogen \ Varietats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Px.1	0,11	0,22	1,25	0,25	0,13	0,38	0,33	0,40	0,33	0,25	2,50	1,88	0,11
Px.5	0,60	0,50	2,11	0,30	0,56	0,44	1,44	1,50	1,20	0,44	3,44	2,80	0,10