

ORANGE



ORANGE

EL GEN
QUE
DETERMINA



PSEUDÒNIM:
BOMBER

2N BATXILLERAT *
2019 - 2020
Tutor/a: *****

Als meus pares per sempre facilitar-me, tant com els
és possible, el camí que em condueix als meus somnis.

Vull donar les gràcies als meus pares pel recolzament rebut en tot moment; a la meua tutora per la seva paciència, la seva disponibilitat i els consells que m'ha donat durant l'elaboració del treball; a tots els organitzadors del programa internacional *Barcelona International Youth Science Challenge* per fer possible aquesta magnífica experiència; als científics del Centre d'Investigació de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) i del Centre de Recerca per l'Agricultura Genètica (CRAG), que han col·laborat amb el programa internacional *Barcelona International Youth Science Challenge* (BIYSC), per haver-me ensenyat i demostrat que els bons científics són els que es formulen preguntes constantment; finalment, als meus 7 companys del *BIYSC Challenge* per haver-me ajudat a viure una de les millors setmanes de la meua vida al seu costat i, inconscientment, a créixer com a persona dins i fora dels laboratoris.

Our characters were imperfect, but that's life.

Els nostres caràcters eren imperfectes, però això és vida.

James D. Watson

RESUM:

L'objectiu principal del present treball de recerca consisteix en explicar com des de la biotecnologia es pot descobrir i localitzar les regions del genoma del meló on resideixen els gens responsables del color taronja de la polpa dels vegetals, el qual està estretament relacionat amb els alts continguts de provitamina A. Aquest primer objectiu condueix a un segon objectiu el qual es basa en descobrir si és possible la producció d'un meló de la varietat Pell de Gripau (de color blanc) amb un alt contingut de carotenoides (pigments del color taronja), fent ús de marcadors genètics. Aquesta nova varietat de meló s'anomenaria Meló d'Elit i, avui dia, encara és inexistent. Els objectius descrits comporten una recerca científica, la qual es troba dividida en cinc fases. Les dues primeres estan estretament relacionades amb l'estudi del fenotip dels melons mentre que les tres darreres fases es centren en l'estudi del seu genotip. D'una banda, els resultats més rellevants obtinguts mostren que el gen responsable del color taronja de la polpa es localitza entre dos marcadors genètics del cromosoma 9 del genoma del meló. D'altra banda, mostren que l'altre gen, responsable del color blanc i/o verd de la polpa, se situa entre dos marcadors que formen part del cromosoma número 8. Finalment, els darrers resultats obtinguts en la genotipificació del meló revelen que la proteïna codificada pel gen responsable del color taronja de la polpa i de l'alt contingut de carotenoides s'anomena Orange-Orange. A més a més, verifiquen la possibilitat d'introduir aquest gen en altres varietats i espècies per tal d'obtenir melons o altres vegetals que continguin una elevada quantitat de provitamina A. La conclusió final que s'extreu d'aquesta recerca científica diu que el color de la polpa del meló (taronja, verd o blanc) depèn de la interacció que existeix entre els al·lels de dos gens, els quals es troben sota una epístasis dominant. És a dir, que l'expressió d'un dels gens depèn de l'expressió del segon gen. Per aquest motiu, existeixen diferents varietats de meló pel que fa a la contenció de carotenoides i al color de les respectives polpes.

Paraules clau: meló, polpa de color taronja, vitamina A, varietats, mutació, fenotip, genotip, Meló d'Elit

ABSTRACT:

The main aim of this Treball de Recerca is to discover and locate the regions where the genes for the orange colour of the vegetables' flesh and the high levels of vitamin A reside in the melon genome. This first aim drives into the second aim which consists in discovering if it is possible to produce high carotenoid content Piel de Sapo by using Plant Biotechnology tools. This new melon's variety is called Elite Melon and, nowadays, it doesn't exist yet. The methodology followed to achieve these aims includes a scientific research, which in itself, is divided into different phases. The first two phases are focused on melons' phenotyping study, whereas the last ones are engaged in the melons' genotyping study. On the one hand, the most relevant results show that the gene responsible for the orange flesh colour is located between two genetic markers called 21429600 and 21754707. On the other hand, they show that the other gene, which is responsible for the white/green flesh colour is located between two different markers known as 31996217 and 32122602. All of these genetic markers are part of the melon's genome. Finally, the last result revealed that the protein, which is synthesized by the gene responsible for the orange flesh colour, is called Orange-Orange. Moreover, it verifies the possibility of introducing this gene to other varieties and species to produce melons and other vegetables with high carotenoid content. The conclusion reached in this research is that the flesh colour in melons (orange, white or green) depends on the interaction between alleles from two different genes which are under dominant epistasis.

Keywords: melon, orange flesh colour, vitamin A, varieties, mutation, phenotyping, genotyping, Elite Melon

ÍNDIX DE CONTINGUT

PART TEÒRICA

0. INTRODUCCIÓ	9
1. INTRODUCCIÓ HISTÒRICA: DE L'AGRIGULTURA DE SUBSISTÈNCIA A L'ENGINYERIA GENÈTICA.....	12
1.1. L'enginyeria genètica i el canvi climàtic en el món actual	15
2. MÈTODES EMPRATS PER MODIFICAR EL GENOMA DE LES PLANTES.....	17
2.1. Plantes transgèniques	18
2.1.1. Creació d'una planta transgènica.....	18
2.1.1.1. <i>Inserció de gens</i>	<i>20</i>
2.1.1.1.1. <i>Mètodes d'inserció de gens en cèl·lules eucariotes vegetals</i>	<i>21</i>
2.1.2. Selecció i regeneració.....	22
2.1.3. Mètode de cultiu i regulació a nivell legal	23
2.2. Edició genètica o CRISPR-Cas9.....	24
2.2.1. Funcionament de la tècnica CRISPR-Cas9	24
2.2.2. Legislació, cultiu i comercialització	26
2.3. “Plant breeding program” o programa de millora de plantes: creuaments entre diferents varietats d'una mateixa espècie de plantes.....	26
2.3.1. En què consisteix	26
2.3.2. Empreses involucrades en el programa de millora de plantes.....	27
2.3.3. Marcadors moleculars	30
2.3.4. Relacions entre al·lels.....	31
2.3.5. Tipus de poblacions.....	34
2.3.6. Regulació a nivell legal.....	36
3. ESTUDI D'UN GEN RESPONSABLE D'UN CARÀCTER VEGETAL CONCRET .	37
4. ESTUDI DEL GEN RESPONSABLE DEL COLOR TARONJA DELS VEGETALS, ESPECÍFICAMENT EN EL MELÓ	38
4.1. La vitamina A.....	39

4.1.1.	Què és la vitamina A	39
4.1.2.	Composició química de la vitamina A	39
4.1.3.	Funcions de la vitamina A	41
4.1.4.	Vitamina A en usos mèdics	42
4.1.5.	Falta o excés de vitamina A	43
4.1.6.	Fonts per obtenir vitamina A.....	43
4.1.7.	Deficiència de vitamina A	45
4.2.	Els carotenoides	46
4.2.1.	Què són els carotenoides?	46
4.2.2.	Composició química	46
4.2.3.	Biosíntesi dels carotenoides.....	47
4.2.4.	Biodisponibilitat i metabolisme dels carotenoides en humans.....	47
4.3.	El beta-carotè i la vitamina A.....	50
4.3.1.	Propietats químiques del beta-carotè.....	51
4.3.2.	El beta-carotè en la dieta humana: beneficis i inconvenients.....	51
	4.4. El meló	52
4.4.1.	Procedència i propietats nutricionals	52
4.4.2.	Origen i desenvolupament històric	53
4.4.3.	Varietats de meló: Pell de Gripau i Vedrantaís	54
4.4.4.	Els melons i el descobriment del gen responsable del color taronja propi de molts vegetals	55
	4.4.4.1. <i>Els melons, l'estudi del gen responsable del color taronja dels vegetals i els encreuaments artificials</i>	56
	4.4.4.2. <i>Importància de la mutació del gen</i>	57
	4.4.4.3. <i>L'epístasi del meló</i>	58
	4.4.4.4. <i>Melons homozigots</i>	59

PART PRÀCTICA

1.	EN QUÈ CONSISTEIX L'EXPERIMENT?.....	61
----	--------------------------------------	----

2.	OBJECTIUS	65
3.	PROCÉS	66
3.1.	Fase 1: Plantació, germinació i pol·linització de les llavors homozigots	66
3.2.	Fase 2: Recol·lecta als hivernacles de la torre Marimon	71
3.3.	Fase 3: Fenotipificació dels melons	76
3.4.	Fase 4: Genotipificació dels melons	86
3.4.1.	Emmagatzematge i conservació de les mostres	88
3.4.2.	Extracció de DNA	89
3.4.3.	Test: qualitat i quantitat de DNA	97
3.4.4.	Genotipificar	104
3.5.	Fase 5: Resultat final de l'experiment: quin és el gen responsable del color taronja? ¹¹⁸	
3.5.1.	Del genotip al fenotip	118
3.5.2.	Melonomics	124
4.	MAPA GENÈTIC I QTL ANÀLISI (experiment portat a terme pels investigadors del CRAG)	129
4.1.	Genotipificació	129
4.1.1.	Anàlisi dels dos genotips	131
4.2.	Mapa genètic	133
4.3.	QTL anàlisi	135
4.3.1.	Anàlisi de les dades del fenotip	136
4.3.2.	Creació i resultats de l'anàlisi QTL	137
5.	VALIDACIÓ DEL GEN CANDIDAT: CRISPR-CAS9	141
5.1.	CRISPR-Cas9: transformació de les llavors del meló via <i>A. Tumefaciens</i> 144	
6.	CONCLUSIONS DE L'EXPERIMENT	153
7.	UNA NOVA VARIETAT DE MELÓ, RICA EN VITAMINA A	157
7.1.	Mètode: creuaments artificials	157
7.2.	Quina utilitat i quina repercussió dins la societat causaria aquesta nova varietat de meló?	159

7.3. Comercialització i legalització.....	160
8. CONCLUSIONS FINALS.....	161
9. FONTS CONSULTADES.....	166
ANNEX I. CÀLCULS SOLUCIÓ BUFFER	175

0. INTRODUCCIÓ

Tot i semblar impossible, la modificació genètica de les plantes té els seus orígens en l'etapa del neolític, quan els homes comencen a seleccionar les millors varietats de les espècies que cultiven. Conseqüentment, aquests homes primitius, amb les seves accions inconscients, causen una alteració del material genètic de les futures generacions i això provoca que moltes varietats naturals desapareguin per sempre més. Actualment, moltes espècies vegetals pateixen l'impacte del canvi climàtic provocat per les accions de l'home, les quals generen un increment de les temperatures globals del planeta, condicions meteorològiques extremes, la reducció de les capes polars i variacions en el nivell del mar. L'única manera de reconduir la situació i recuperar aquestes espècies desaparegudes consisteix en fer ús de la biotecnologia. No obstant, encara avui dia, la majoria de la població tem a les tecnologies que permeten estudiar i modificar el DNA dels éssers vius. Sembla ser que són vistes com una amenaça envers els cicles vitals naturals, però... què passaria si en un futur, no gaire llunyà, la supervivència humana depengués, en gran part, del coneixement i de l'ús adequat d'aquestes tecnologies?

El treball que es presenta a continuació tracta sobre la importància de localitzar, mitjançant tècniques emprades en biotecnologia, en quina regió del genoma del meló resideix el gen responsable del color taronja de la polpa dels vegetals, el qual està estretament relacionat amb l'alt contingut de carotenoides (provitamina A). Localitzar aquest gen és important per a poder inserir-lo en altres varietats i espècies de vegetals que contenen una baixa quantitat de carotenoides ja que el cos humà no és capaç de sintetitzar vitamina A i, per tant, els éssers humans, moltes vegades, pateixen malalties relacionades amb la deficiència d'aquesta vitamina. D'altra banda, localitzar el gen i crear noves espècies és interessant des del punt de vista evolutiu i d'adaptació al canvi climàtic ja que si augmenta el nombre d'espècies vegetals comestibles amb un alt contingut de carotenoides, la desaparició d'algunes d'elles no constitueix un gran perill per a la vida humana.

La motivació principal per a l'elecció d'aquest tema fou poder descobrir quines maneres existeixen per lluitar contra el canvi climàtic i adaptar-se a les noves condicions de vida a través de l'enginyeria genètica. La societat actual es desenvolupa de forma ràpida i canvia constantment. Les persones viuen sota una rutina, mogudes pel capital i pel propi benestar. Generalment, intenten evitar l'angoixa que els hi provoquen els problemes i, per aquest motiu, es desenten de les desgràcies que creuen que no les afecten directament. El canvi

climàtic, la necessitat de reduir la quantitat de residus i els combustibles fòssils, les epidèmies i malalties provocades per dietes precàries en poden ser clars exemples.

No fa gaire més d'un any, es va anunciar pel telenotícies del canal català Tv3, la creació d'una poma resistent al canvi climàtic, havia estat creada per l'empresa d'Investigació de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) a partir de tècniques biotecnològiques. Veure aquesta notícia, rebre informació d'aquesta empresa, la innovació i les ganes d'investigar van ser el principal motor del treball de recerca en qüestió. Uns mesos més tard, la casualitat va portar l'oportunitat d'entrar dins el programa internacional "Barcelona Internacional Youth Science Challenge" i va permetre portar a terme la recerca presentada en el treball, amb la tutoria dels investigadors capdavanters sobre genètica de plantes en un laboratori amb tecnologia puntera.

Els objectius principals d'aquest treball són localitzar en quina regió del genoma del meló es troba el gen responsable del color taronja de la polpa i de l'alt contingut de carotenoides, idear la creació i producció d'una nova varietat de meló anomenada meló d'Elit, la qual conté tot el genoma de la varietat de meló Pell de Gripau a excepció del gen responsable del color taronja, procedent del genoma de la varietat Vedrantaïs, i veure quin impacte tindria, a nivell social, la creació d'aquest meló modificat genèticament. També conèixer la diferència entre un aliment transgènic i un creat a partir d'encreuaments artificials, així com aprendre a realitzar una correcta extracció de DNA i, a partir d'aquesta, un mapa genètic del genoma complet del meló. Finalment, a través de la fenotipificació i genotipificació de 12 melons homozigots, aprendre a relacionar les mutacions genètiques que presenten amb les seves respectives característiques físiques per a poder arribar a localitzar un gen candidat.

La metodologia emprada per localitzar el gen responsable de l'elevat contingut de carotenoides en els vegetals es basa en una recerca científica portada a terme als laboratoris del centre d'Investigació de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Aquesta recerca científica consta de cinc fases, les quals corresponen a cinc experiments diferents. En primer lloc, la plantació, la germinació i la pol·linització de les llavors de meló homozigots; en segon lloc, la recol·lecta del fruit i de les fulles de la melonera a La Torre Marimon; en tercer, la fenotipificació de 12 melons; en quart lloc, la genotipificació i, en darrera posició, la resolució final de la recerca. Aquests cinc experiments, si s'uneixen i es comparen, permeten localitzar el gen que es busca. No obstant, cal seguir el mètode científic, els protocols de laboratori i, sobretot, cal fer un ús adequat de les tècniques innovadores que permeten estudiar el DNA dels vegetals i modificar-lo.

El conjunt del treball s'ha dividit en dos grans blocs. El primer bloc és el bloc teòric, el qual consta de quatre grans apartats. El primer punt és una breu introducció històrica de la modificació genètica de les plantes, la qual es remunta a l'etapa del neolític; el segon apartat tracta sobre els mètodes útils per a la modificació del genoma de les plantes; el tercer sobre l'estudi d'un gen responsable d'un caràcter vegetal concret i, el darrer, tracta sobre l'estudi del gen responsable del color taronja dels vegetals, específicament en el meló, ja que com s'ha dit anteriorment, l'experiment es porta a terme a partir de l'estudi del genoma i del fenotip d'aquest fruit. D'altra banda, el segon bloc és totalment pràctic i consta de l'explicació detallada de la recerca científica portada a terme als laboratoris del centre d'Investigació de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), així com dels passos seguits, els materials utilitzats i els resultats obtinguts. Cadascun dels experiments realitzats es consideren una fase diferent de la recerca i posseeixen els seus propis objectius, resultats, observacions i conclusions.

PART TEÒRICA

1. INTRODUCCIÓ HISTÒRICA: DE L'AGRIGULTURA DE SUBSISTÈNCIA A L'ENGINYERIA GENÈTICA

L'agricultura de subsistència és un sistema d'agricultura en el qual la producció que s'obté d'una superfície només serveix per satisfer el consum propi dels treballadors de la terra, és a dir, no disposa de producció excedent que es pugui comercialitzar. Aquest tipus d'agricultura apareix fa uns 10 mil anys (en l'etapa del neolític, altrament coneguda com a revolució agrícola) quan la població humana deixa de ser nòmada per establir-se de manera definitiva en una localitat concreta i neix el sedentarisme. En aquest moment les persones deixen de dependre del que la natura els ofereix, de les estacions de l'any i dels cicles biològics ja que abandonen la caça, la pesca i la recol·lecció de fruits per endinsar-se en el món de l'agricultura.

Aquest canvi de sistema de vida només és possible gràcies a la modificació genètica d'algunes plantes i animals portada a terme per l'acció, absolutament inconscient, de l'ésser humà. Aquesta modificació genètica és el que avui dia es coneix com a selecció natural o automàtica. Segons Charles Darwin (1808-1882), tenint en compte que hi ha variacions entre els individus de la mateixa espècie i que en neixen molts més que no en sobreviuen, tenen més oportunitat de perpetuar l'espècie els individus que tenen algun avantatge i són destruïts els que presenten variacions en sentit contrari. Es diu que les variacions que representen algun avantatge (i que tenen, per tant, més èxit) han estat seleccionades per un procés natural. És a dir, les diferents variacions tenen un valor de supervivència divers enfront de les circumstàncies més o menys hostils en què viuen tots els organismes. Aquesta supervivència dels individus que posseeixen unes qualitats més adequades a l'ambient on viuen, pot ser modificada per l'home, només fa falta alterar certs factors de l'entorn (per exemple, utilitzant la tècnica del rec en una superfície de terra àrida).

Si any rere any, es continua sembrant part de collita de la sembra anterior (es seleccionen les llavors de les plantes més grans, bones de gust, resistents, etc), es produeix una selecció que té com a conseqüència el pas d'una espècie silvestre a una altra cultivada que no creixeria de forma natural sense la intervenció de l'acció humana. Tots aquests canvis que pateixen les plantes són genètics i, com que s'altera la informació hereditària, les modificacions produïdes en les plantes es transmeten als descendents, els quals es van

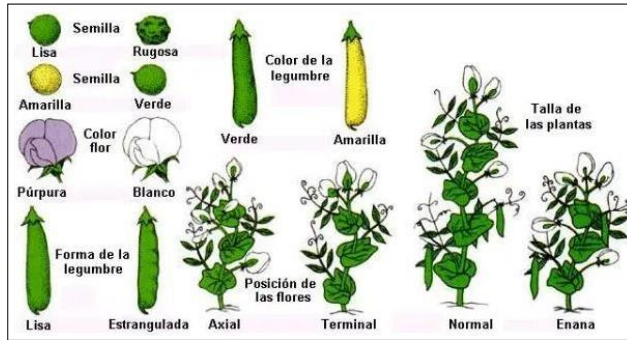
“domesticant”. Per tant, l’agricultura i la genètica estan estretament vinculades gràcies a la selecció natural i a les modificacions de l’entorn realitzades per l’home. L’agricultura només és possible de portar a terme amb plantes modificades genèticament. Així, solament, cal seguir el cicle indicat per tal que la planta es modifiqui genèticament amb la finalitat d’obtenir una major producció i una major resistència a les condicions ambientals, objectius principals de l’agricultura.

Durant molts segles, el conreu de cultius es millora, es perfecciona i es tecnifica, però durant milers d’anys la producció de noves varietats és possible, únicament, gràcies a la selecció simple. Aquest mètode no té una base científica sinó que sorgeix de la pura intuïció humana i els resultats obtinguts, ja siguin bons o dolents, permeten a l’agricultor canviar i/o perfeccionar els seus criteris de selecció. Aquesta selecció és la que provoca les alteracions genètiques d’una espècie i la que comporta la desaparició de la biodiversitat d’una espècie ja que les varietats que no serveixen per satisfer les necessitats humanes es deixen de conrear i, moltes d’elles, acaben extingint-se.

En plena revolució industrial (s.XVIII), es comença a aplicar el mètode científic en el camp de l’agricultura, el qual la sotmet a l’anàlisi científica: en separa els seus components i els estudia un per un per comprendre el seu paper. Aquest nou mètode d’investigació es basa en la recol·lecció d’evidència empírica, observable i mesurable, i l’ús del raonament lògic (raó). D’aquesta manera es propicien els descobriments i el desenvolupament independent dels diferents elements que fins aleshores havien format part d’un tot (neix el monocultiu). És en aquesta etapa de la història quan es diferencia la ramaderia de l’agricultura, apareixen pràctiques adequades a la fertilització (tècnica del guaret, adobs...), així com la mecanització, la producció intensiva, etc.

Durant la revolució industrial també apareix l’encreuament artificial, el qual es basa amb la pol·linització encreuada o hibridació de dues varietats diferents d’una mateixa espècie i permet la producció de noves varietats, amb millors característiques que les anteriors. Per tant, és la primera vegada que l’home crea una nova varietat agrícol·la voluntàriament, a partir dels coneixements adquirits en els darrers anys.

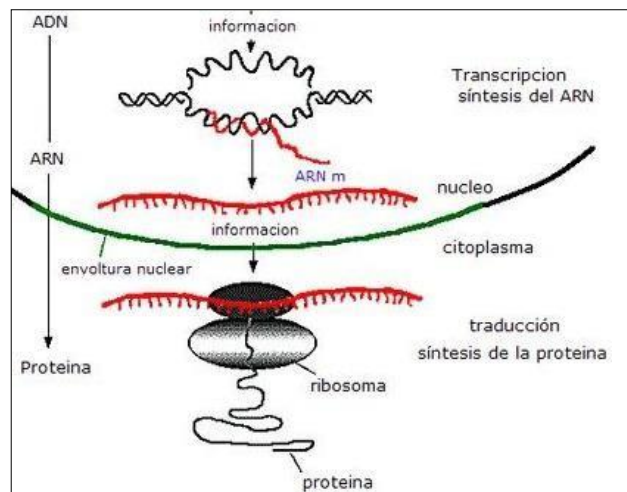
Al 1860, Gregor Mendel, porta a terme un dels experiments més importants en el món de la genètica de plantes. L'objectiu del seu experiment consisteix en descobrir com es transmeten de generació en generació les característiques dels pèsols. Per arribar a una conclusió, encreua diferents tipus de pèsols homozigots que posseeixen colors, formes,



Il·lustració 1. Caràcters fenotípics del pèsol estudiats per Mendel

mides i rugositats diferents. Gràcies a l'experiment estableix unes lleis de transmissió genètica, formulant la teoria de l'herència. A conseqüència d'aquesta teoria, els encreuaments realitzats a posteriori es porten a terme seguint uns criteris genètics molt més racionals per obtenir les característiques desitjades en les varietats desitjades.

A l'any 1953, els científics Watson i Crick descobreixen l'estructura del DNA, una estructura de doble hèlix localitzada al nucli de les cèl·lules eucariotes. Aquesta hèlix consta de fragments de DNA que aporten informació per un caràcter concret, anomenats gens. Aquestes seqüències de DNA (formada per nucleòtids, amb les seves respectives bases nitrogenades) es llegeixen en la fase de transcripció i, a partir d'aquesta lectura, es sintetitza àcid ribonucleic missatger (RNAm). Aquest RNAm surt del nucli de la cèl·lula cap al citoplasma i els ribosomes sintetitzen proteïnes gràcies a la informació genètica que aporta el RNAm. Aquesta síntesi de polipèptids es porta a terme en l'etapa de traducció. Amb aquest descobriment s'inicia una nova etapa de la biologia ja que neix la biologia molecular. Al llarg del s.XX es descobreixen noves tècniques per aïllar determinats gens de l'estructura de DNA.



Il·lustració 2. Transcripció i traducció genètica

A partir dels anys 60 del segle XX, gràcies als coneixements que l'home ha adquirit al llarg de la història, neix l'enginyeria genètica i la biotecnologia, altrament coneguda com a la

tècnica del DNA recombinant. Arribats en aquest moment, l'agricultura busca la creació de noves espècies inexistents amb anterioritat. La biotecnologia és el conjunt de tècniques que permet modificar estructures biològiques preexistents a través de la manipulació del DNA: permet transferir un únic gen o parts d'aquest, independentment de quin sigui l'organisme donant i quin el receptor.

A partir d'aquests experiments, l'agricultura pateix canvis importants i es comença a parlar d'aliments transgènics, és a dir, organismes modificats genèticament (GMO). Actualment, els científics no es conformen amb seleccionar les llavors de les millors plantes per obtenir collites amb les característiques desitjades. Avui dia són capaços de ficar-se dins el nucli de les cèl·lules i transferir gens d'una espècie a una altra per crear-ne una de nova amb un breu període de temps (el que es tarda a obtenir una nova generació descendent).

1.1. L'enginyeria genètica i el canvi climàtic en el món actual

En la societat actual, a causa del canvi climàtic i de les modificacions que pateix el planeta Terra, les quals provoquen la desaparició de diverses espècies vegetals, es dona molta importància a la recuperació de varietats d'espècies que s'han perdut al llarg dels anys com a conseqüència de la Revolució Verda (període en què els agricultors seleccionen les llavors dels fruits que millor s'adapten a les seves necessitats i, per tant, s'aboleix la diversitat de l'espècie). Els aliments transgènics també es coneixen com a "divergènics" ja que es pretén ressaltar la importància de la diversitat genètica a l'hora de representar-la com una mena de riquesa biològica que ha d'estar a l'abast de tots els éssers humans i ha de ser una font de benestar col·lectiu.

Per tal d'utilitzar la biotecnologia per crear noves espècies capaces de resistir als canvis climàtics, prèviament, s'ha de fer un estudi per esbrinar com les plantes s'han adaptat a les variacions climàtiques del passat. Aquesta informació dona pistes als científics per saber què està passant en el present amb les plantes que estan desapareixent i què succeirà en un futur no gaire llunyà. Segons els estudis de l'investigador Brian Enquist, en un període de menys de 50 anys desapareixeran el 45% d'espècies vegetals del planeta Terra.

El millor mètode per aturar la pèrdua d'espècies vegetals consistiria en abolir el canvi climàtic ja que és el principal motor d'aquesta situació. No obstant, aquest mètode, posat a

la pràctica, és un dels més complicats. Si una cosa està clara és que s'ha de lluitar per disminuir els rebuigs produïts, les emissions de gasos tòxics, etc., però, mentre no s'aconsegueix reconduir aquesta situació, els ambients van canviant i les plantes van desapareixent. Per aquest motiu cal crear noves espècies amb característiques concretes. Aquestes noves plantes cal que tinguin un bon rendiment, resistència a estressos, qualitat suficient, cal que siguin capaces d'adaptar-se i, sobretot, que el seu aport nutricional dins la dieta humana sigui suficientment alt com per poder substituir el de les espècies actuals, a mesura que aquestes van desapareixent. A l'hora de produir noves espècies s'ha de tenir en compte que els principals estressos, per a les plantes, associats al canvi climàtic són la tolerància a la sèquia, la resistència a altes temperatures i la resiliència.

2. MÈTODES EMPRATS PER MODIFICAR EL GENOMA DE LES PLANTES

Actualment, la modificació del genoma de les plantes és útil per obtenir noves recombinacions genètiques que en la natura són inexistent i, per tant, varietats vegetals amb millors característiques fisiològiques. La modificació genètica es pot portar a terme seguint diferents metodologies emprades en els camps de Biotecnologia, Enginyeria Genètica i Biologia Molecular. Aquestes tècniques o mètodes són els següents: la creació de plantes transgèniques, els creuaments entre diferents varietats d'una mateixa espècie i, en darrer lloc, la tècnica CRISPR-Cas. Aquestes metodologies emprades no posseeixen un rellevant nombre de característiques comunes, sinó que es diferencien les unes de les altres en la majoria d'aspectes (cost econòmic, mètode de cultiu, impacte sobre l'organisme modificat...).

El principal aspecte en el qual es diferencien les tècniques fa referència a la legislació comercial del producte. Fora de la Unió Europea, malgrat el fet de que tots els mètodes emprats comparteixen l'objectiu comú d'obtenir un organisme final amb les característiques genètiques desitjades (tots serveixen per alterar el material genètic de la planta), no tots els organismes creats són considerats organismes genèticament modificats (GMO). És a dir, depenent del mètode seguit, l'organisme resultant es considera que és una planta genèticament modificada o no s'ho considera. Si el mètode seguit és una inserció de gens externa, la planta es considera que ha estat genèticament modificada però si els nous gens han estat adquirits per via sexual (reproducció, encreuaments artificials) no es considera una planta genèticament modificada. Aquest fet, com es veurà a continuació, té una forta repercussió a l'hora d'introduir el producte dins el mercat. No obstant, pel que fa al territori europeu, l'any 2018, té lloc una sentència de la Cort Europea de la Justícia, la qual especifica que tot organisme manipulat genèticament (tant per via externa com per encreuaments), ha d'estar obligatòriament sotmès a la mateixa regulació que els transgènics (GMO).

Un segon aspecte que diferencia els mètodes esmentats anteriorment fa referència al tipus de mutació i d'impacte que produeixen aquests sobre la planta. Si l'impacte és de caràcter específic, el mètode emprat ha de ser el CRISPR-Cas o, bé, els creuaments artificials mitjançant marcadors moleculars. D'altra banda, si l'impacte és "random", és a dir,

que no és específic i no se sap quina base nitrogenada ha estat modificada, el mètode seguit consisteix en la creació d'una planta transgènica.

2.1. Plantes transgèniques

El concepte de planta transgènica fa referència a aquelles plantes que han estat modificades genèticament, és a dir, creades artificialment a partir de la manipulació dels seus gens. L'objectiu de la creació de plantes transgèniques consisteix en dotar-les de característiques avantatjoses per a la humanitat (millorar les seves característiques fisiològiques o augmentar el rendiment del seu cultiu).

Cal tenir molt present que la inserció del material genètic als cromosomes de les cèl·lules es dona de forma no específica, és a dir, no és un mètode específic en el qual l'home és qui insereix el gen en una posició exacte del genoma de la planta.

2.1.1. Creació d'una planta transgènica

La creació de plantes transgèniques, consisteix en la modificació de la seqüència de nucleòtids del seu DNA afegint-hi segments nous, denominats gens, que aporten informació per un caràcter concret. La planta inicial (abans de ser genèticament modificada) no posseeix aquest caràcter que es vol aconseguir. Per tant, el nou gen introduït en el genoma de la planta prové d'una espècie no emparentada amb la planta que es vol modificar o, bé, d'una varietat diferent de la mateixa espècie. No obstant, la planta transgènica també pot ser creada eliminant o alterant gens propis del seu genoma.

Pel que fa a la metodologia emprada en la creació de transgènics és rellevant que, a més a més de permetre la introducció del material genètic exogen (material genètic provinent d'un organisme extern), també permeti la seva integració de manera estable i funcional dins del nou genoma. Tanmateix, és necessari que permeti la seva transmissió genèticament als futurs descendents. Per tant, és important introduir el gen responsable de l'expressió del caràcter que interessa però també ho és la inserció de la seqüència que promou l'expressió del gen en qüestió.

En primer lloc, s'aïlla el gen d'interès, conegut també com a DNA passatger o exogen, el qual porta la informació pel caràcter que es vol aconseguir que posseeixi la planta modificada. Per fer-ho, és necessària l'ajuda dels enzims de restricció, els quals són propis dels bacteris i són capaços de tallar el DNA en punts concrets i així separar-ne els segments que interessin.

Seguidament, s'identifiquen els promotors, és a dir, les regions d'aquest gen que tenen com a funció fer-ne possible la seva expressió en el lloc adequat del genoma. Dit d'una manera diferent, el promotor és l'element que regula l'expressió del gen en qüestió. La suma d'aquests dos elements (gen+promotor), dona lloc a una seqüència de DNA.

Un altre punt que s'ha de tenir present a l'hora d'introduir un gen dins una cèl·lula eucariota vegetal és el fet de que, a més a més de controlar el promotor, també s'ha d'incloure una seqüència de finalització que assenyali el final del gen per tal que no es continuï llegint la seqüència de DNA que no forma part del gen. Aquesta seqüència s'anomena triplet de pausa o de "stop".

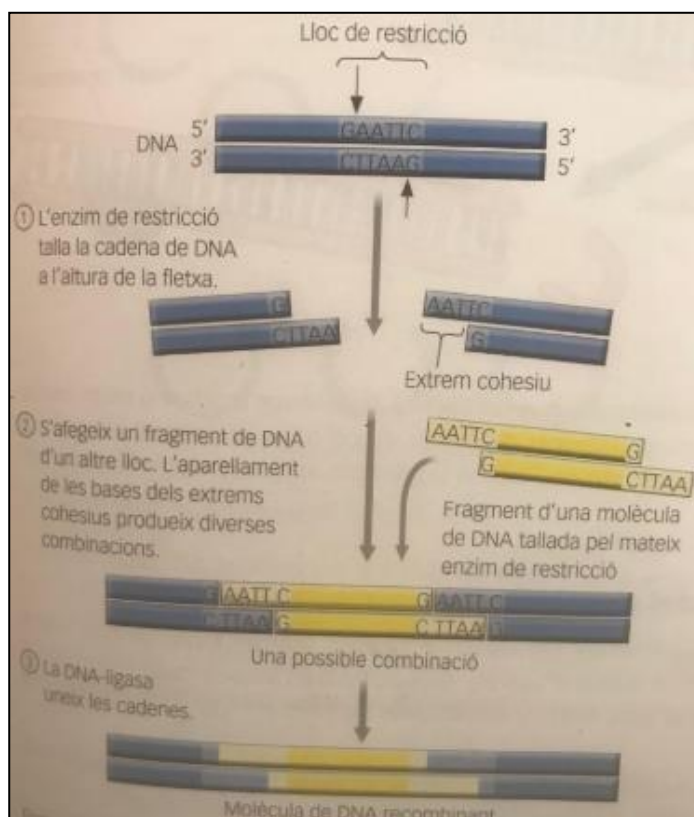
En el cas de la creació de les plantes transgèniques, el primer pas consisteix en multiplicar aquesta seqüència, formada per la suma del gen que causarà la transformació genètica més el respectiu promotor, i obtenir-ne milions de còpies idèntiques. Perquè això sigui possible, s'introdueix la seqüència dins de bacteris amb l'ajuda d'un vector (fragment de DNA capaç d'unir-se un altre fragment aliè i transferir-lo al genoma d'altres organismes). Els bacteris tenen la capacitat de reproduir-se de manera molt ràpida si es troben en el medi de cultiu idoni, de manera que s'aconsegueixen milions de còpies idèntiques en una franja de temps molt curta ja que tots els bacteris creats contenen el gen d'interès. Aquest procés rep el nom de clonació.

Una vegada s'obtenen les còpies, es preparen per a obtenir una seqüència lineal de DNA, la qual sigui apte per a ser introduïda en les cèl·lules de la planta que es vol modificar.

2.1.1.1. Inserció de gens

Per fer possible la inserció de DNA passatger o exogen al DNA vector (molècula d'ADN circular de doble cadena pròpia dels procarïotes, que és utilitzat per introduir un gen específic dins una cèl·lula), cal tallar-los tots dos amb el mateix enzim de restricció. Aquest enzim talla una seqüència d'entre quatre i deu parells de bases nitrogenades que presenten simetria segons la complementarietat de les bases (la citosina amb la guanina i l'adenina amb la timina). Aquestes seqüències s'anomenen seqüències palindròmiques i ambdues posseeixen la mateixa informació genètica.

Les endonucleases de restricció (enzim que talla les cadenes) no acostumen a tallar la seqüència per la meitat. D'aquesta manera, deixen un oligonucleòtid curt a cada banda del tall, de manera que un és complementari de l'altre. Aquests segments complementaris s'anomenen cohesiu i faciliten la formació del DNA recombinant a partir dels dos DNA tallats pel mateix enzim de restricció. Finalment, la DNA-ligasa és qui acaba d'unir els dos DNA. Aquest DNA recombinant és el que s'introdueix a la cèl·lula eucariota vegetal.



Il·lustració 3. Formació d'un DNA recombinant a partir de dos fragments de DNA (DNA passatger i vector) tallats pel mateix enzim de restricció

2.1.1.1.1. *Mètodes d'inserció de gens en cèl·lules eucariotes vegetals*

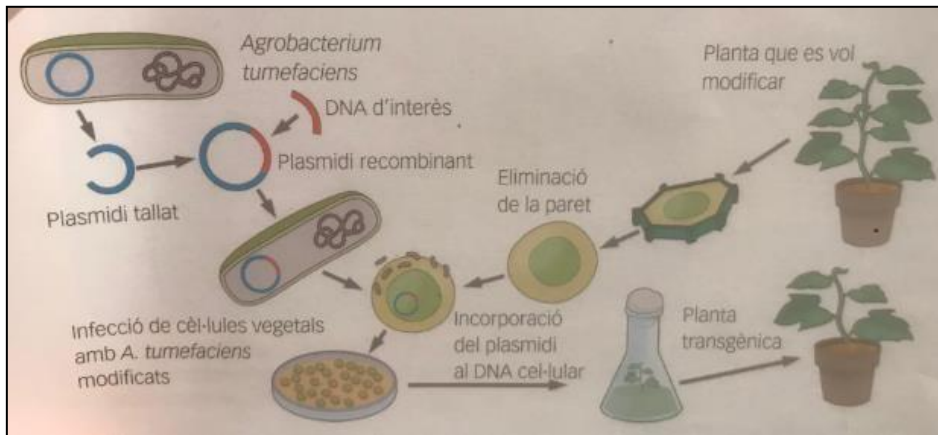
Els principals mecanismes d'introducció de gens en cèl·lules eucariotes vegetals són els plasmidis i els mecanismes no biològics:

- **PLASMIDIS.** Un plasmidi bacterià és un petit DNA circular de doble hèlix que es duplica autònomament. A causa de la lisi dels bacteris, aquests plasmidis poden quedar lliures al medi i poden penetrar dins d'altres bacteris, sempre i quan la membrana d'aquests sigui suficientment permeable. Aquest procés s'anomena transformació.

Aleshores, aquest bacteri que ha introduït el plasmidi dins seu, adquireix les propietats dels gens que conté el plasmidi.

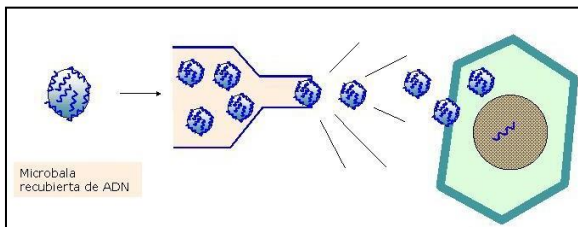
Els plasmidis bacterians no són útils per a introduir gens en cèl·lules eucariotes vegetals. No obstant, sí que existeix un bacteri capaç d'introduir gens en les cèl·lules eucariotes vegetals. Aquest bacteri es troba al sòl i rep el nom de *Agrobacterium tumefaciens*. Presenta un plasmidi anomenat Ti (de l'anglès: Tumor inducer), el qual consta d'un sector anomenat T-DNA que és el responsable de provocar tumors en les plantes i que és capaç de penetrar en les cèl·lules vegetals i d'inserir-se en un dels cromosomes.

Una vegada s'ha integrat al genoma de la planta, promou la divisió cel·lular sense control, de manera que causa el tumor. Per tant, l'*Agrobacterium* és un mecanisme d'infecció natural, el qual ha estat utilitzat com a vehicle eficient per a transformar plantes de manera artificial. Per tal de portar a terme aquesta transformació artificial, és necessari respectar i no remoure els senyals que indiquen el punt o inicia i on acaba el segment de DNA que s'insereix a la planta (vires del T-DNA) però cal substituir els gens responsables de la formació del tumor per a altres seqüències de gens que aporten informació pel caràcter que interessa. D'aquesta manera, l'*Agrobacterium tumefaciens*, contingut en el material genètic bacterià, es pot usar com a vector de gens que s'han intercalat prèviament a dins seu.



Il·lustració 4. Utilització del plasmidi Ti com a vector de gens en plantes

- **ELS MECANISMES NO BIOLÒGICS.** Els principals mecanismes no biològics són l'electroporació, la microinjecció i el tret de microbales.
 - **Electroporació.** Es porta a terme sotmetent la cèl·lula a un alt voltatge durant un període de temps molt breu. Això causa uns petits forats temporals a la membrana que poden servir per a introduir-hi el DNA exogen.
 - **Microinjecció.** El DNA s'injecta directament a la cèl·lula per mitjà d'un capil·lar de només 1,5 µm.
 - **Tret de microbales.** El DNA es troba al voltant de microbales de metall que són disparades directament cap a la cèl·lula amb una pistola.



Il·lustració 5. Tret de microbales

2.1.2. Selecció i regeneració

Una vegada es finalitza el procés d'inserció de gens, els teixits de la planta són introduïts dins un medi selectiu que conté una antibiòtic o un herbicida. Només les plantes que expressen el gen marcador (inserir prèviament al plasmidi que actua com a vector) sobreviuen en aquest medi. Això permet escollir adequadament els teixits transformats amb èxit, és a dir, aquelles plantes que han integrat amb èxit el gen extern.

2.1.3. Mètode de cultiu i regulació a nivell legal

Les plantacions i els cultius de plantes transgèniques han anat creixent de manera exponencial des de la seva introducció al mercat l'any 1995 fins avui dia. No obstant, per tal de cultivar una planta modificada genèticament és indispensable disposar del consentiment dels organismes encarregats de l'avaluació i el control. La màxima autoritat encarregada d'aquestes qüestions a nivell europeu és l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària, a nivell espanyol ho és la Comissió Nacional de Bioseguretat i a nivell de Catalunya la Comissió Catalana de Bioseguretat.

A més a més, les mesures que es prenen a l'hora de cultivar plantes transgèniques són molt estrictes ja que no es poden posar mai en contacte amb plantes d'espècies naturals. Això és degut al fet de que les plantes transgèniques poden traspasar informació genètica artificialment modificada en un laboratori, a les altres espècies d'origen natural. És per aquest precís motiu que els investigadors han de vestir amb roba aïllant (màscara, guants, botes, etc), quan entren en un d'aquests recintes on es cultiven transgènics. A causa de les mesures preventives que s'han de prendre, el cost econòmic és molt elevat i, per això, es porten a terme menys experiments i estudis amb plantes transgèniques dels que seria possible realitzar si el cost econòmic fos més reduït.

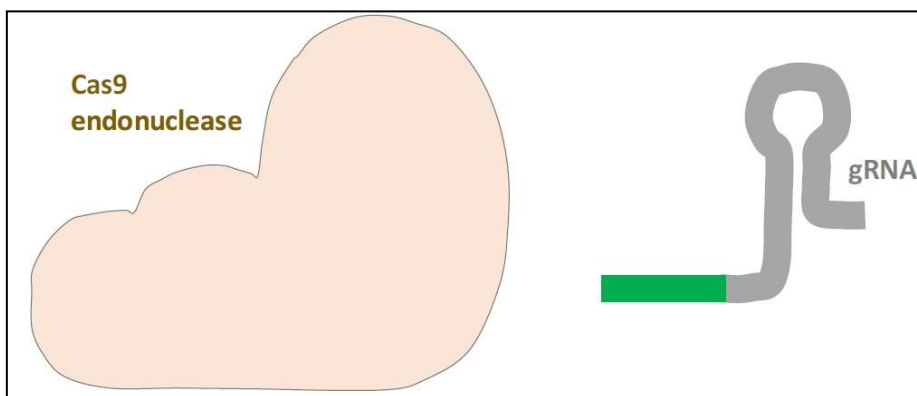
Pel que fa a les plantes transgèniques dins del món comercial, des de la seva primera creació s'ha imposat i s'ha anat modificant una normativa reguladora a aquests nous productes agroalimentaris per fer-ne possible la seva compra i venda, sempre tenint en compte els possibles riscos de contaminació ambiental que podrien comportar.

L'any 1997 s'aprova el primer reglament sobre aquests nous productes (Reglament núm. 258/97, del Parlament Europeu i del Consell de 27 de gener de 1997). Aquesta normativa preveu que els aliments als quals se'ls hi aplica el Reglament han de ser sotmesos a una avaluació prèvia a la seva comercialització. A més a més, és obligatori etiquetar explícitament aquells productes que contenen transgènics. Això és degut a la sensibilització de la població respecte els organismes genèticament modificats i al dret que posseeixen els ciutadans a l'hora de saber el que consumeixen.

2.2. Edició genètica o CRISPR-Cas9

El CRISPR-Cas9 o edició genètica és un mètode emprat des de l'any 2013 per modificar genomes. Com es pot veure, és un mètode recent però consta d'un gran nombre d'aplicacions ja que permet executar canvis molt específics i precisos sobre les bases nitrogenades del genoma. Si es compara amb la creació d'una planta transgènica, s'observa que el nombre d'aplicacions de la tècnica CRISPR-Cas9 és molt més elevat ja que, a banda d'introduir una seqüència de DNA exogen a l'organisme, permet portar a terme canvis molt més precisos en el genoma de la planta com, per exemple, l'eliminació d'una única base nitrogenada.

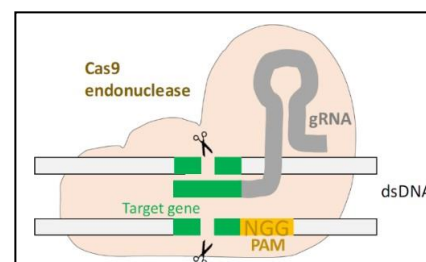
El CRISPR-Cas9 és una tècnica que consta de dos elements principals, una seqüència de RNA, anomenada RNA guia i una proteïna Cas9, capaç de tallar un fragment de DNA determinat.



Il·lustració 6. Proteïna Cas9 i RNA guia

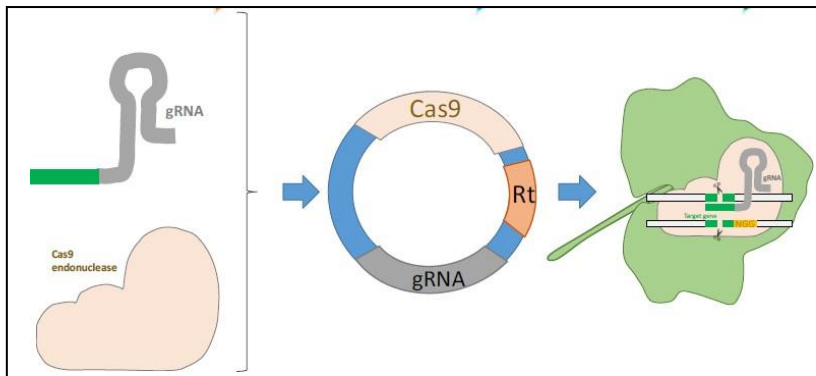
2.2.1. Funcionament de la tècnica CRISPR-Cas9

Es diu que aquest mètode és barat perquè la creació del RNA guia és molt ràpida i de baix cost. En primer lloc, és indispensable seqüenciar el genoma de la planta i estudiar quin és el gen que es vol modificar (tallar). Una vegada es coneix quin és el gen candidat, es crea, un RNA guia, la seqüència del qual és complementària a la seqüència del gen candidat. Finalment, només fa falta introduir el complex format per el RNA guia i la proteïna Cas9 dins la planta. Això es portat a terme gràcies a un vector (plasmidi), en el qual s'inserta el complex. El complex volta pel genoma de la planta sense actuar fins que el RNA guia, localitza el gen del qual és complementari. Llavors el RNA guia s'inserta entre les dues monocades que formen la doble



Il·lustració 7. La proteïna Cas9 talla el gen candidat

hèlix de DNA, les separa i, la proteïna Cas9, es la responsable de tallar el gen. D'aquesta manera, el Cas9 que acompanya el RNA guia posseeix la funció de tallar el gen que sigui complementari a la seqüència de RNA.



Il·lustració 8. Disseny del RNA guia i de la proteïna Cas9 endonucleasa, creació del plasmidi i inserció del plasmidi dins la cèl·lula eucariota vegetal

Una vegada ha estat tallat el gen, la cèl·lula necessita refer els danys causats en el material genètic. A partir d'aquí, la cèl·lula vegetal pot actuar de dues formes. La primera i més simple consisteix en unir novament les dues parts de la doble hèlix sense el gen que ha estat tallat. Aquest sistema no és efectiu ja que sovint, abans de que es reuneixin les dues parts, es perd o s'afegeix una base nitrogenada dels extrems. La seva utilitat es basa, bàsicament, en tallar el gen per demostrar que aquell gen era el responsable de l'expressió d'un caràcter concret del fenotip. La segona i més complexa consisteix en col·locar un fragment de DNA homòleg al gen tallat. Aquest fragment homòleg, en els organismes diploides (moltes plantes són diploides) pot provenir de l'altre cromosoma homòleg o, bé, es pot col·locar un fals fragment de DNA, és a dir, un fragment homòleg dels dos extrems al gen tallat però diferent en les bases del centre. D'aquesta manera, es pot col·locar, entre les dues parts de la doble hèlix per tal de que el forat quedi reomplert, un triplet de bases que codifiqui per un aminoàcid concret en la síntesi de polipèptids i així obtenir una proteïna desitjada.

En resum, es pot dir que el primer sistema per a refer els danys causats en tallar el gen es usat per la pròpia cèl·lula, perquè el genoma continuï sent funcional, quan la pèrdua del gen es produeix de manera atzarosa, per naturalesa. En canvi, el segon mètode és emprat pels investigadors que es dediquen a la recerca i a la creació de plantes editades genèticament ja que aquest segon sistema permet canviar una base, eliminar una base i, fins i tot, afegir-hi nou DNA exogen.

2.2.2. Legislació, cultiu i comercialització

Tota planta editada mitjançant la tècnica CRISPR-Cas9, igual que qualsevol planta transgènica, és considerada un organisme genèticament modificat. Per tant, tots dos segueixen la mateixa legislació i es troba sota les mateixes mesures de cultiu i de comercialització [explicades a l'apartat 2.1.3. Mètode de cultiu i regulació a nivell legal]. No obstant, sí que és cert que les plantes editades amb la tècnica CRISPR-Cas9 no acostumen a tenir una finalitat tan comercial com les plantes transgèniques, sinó que posseeixen una finalitat més d'estudi científic i genètic. No presenten variants legislatives amb els transgènics perquè els impactes causats sobre la planta són els mateixos amb els dos mètodes. L'única diferència es troba en què en el cas dels transgènics la transformació no és específica i, en canvi, en el CRISPR-Cas9 sí que ho és gràcies al complex format per el RNA guia i la proteïna Cas9, la qual talla una base concreta, seleccionada per l'investigador.

2.3. “Plant breeding program” o programa de millora de plantes: creuaments entre diferents varietats d'una mateixa espècie de plantes

2.3.1. En què consisteix

Actualment l'anomenat “plant breeding program”, conegut també com a programa de millora de plantes, és l'art o la ciència de canviar la genètica de les plantes per tal d'obtenir noves varietats dins d'una mateixa espècie.

Aquest programa de millora es pot portar a terme fent ús de diverses tècniques, des de la simple selecció de les plantes que contenen un caràcter que interessa propagar en les generacions futures, fins a mètodes que necessiten un coneixement més genètic, sobre el genoma, els cromosomes de l'espècie i tècniques moleculars complexes. En tots dos casos, però, la selecció de la varietat millorada es realitza a partir d'encreuaments artificials ja que mitjançant els encreuaments s'aconsegueix que una varietat determinada d'una espècie adquireixi un caràcter expressat en una varietat diferent de la mateixa espècie. Per tant en tot encreuament, com a mínim, una de les línies o varietats parentals que s'usen, ha de ser portadora, forçosament, del caràcter que es vol aconseguir que s'expressi en els descendents.

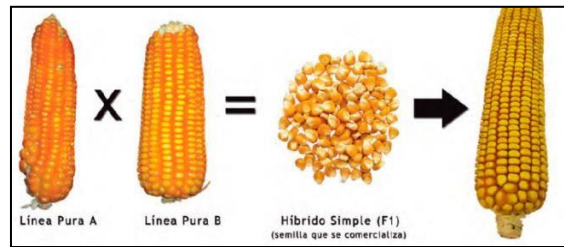
Tal i com s'ha vist, a diferència de les plantes transgèniques, les plantes creades amb el mètode "plant breeding", només poden adquirir trets de plantes que formen part de la seva mateixa família ja que es creen a partir dels creuaments per reproducció.

L'objectiu del "plant breeding" és obtenir plantes resistents a la sequera, a patògens i a bacteris; plantes adaptades a diferents ambients i a diferents condicions de creixement i augmentar el rendiment de la producció. Sobretot s'utilitza per millorar la qualitat de nutrició de plantes consumides pels humans i pels animals. Actualment, també té un paper molt important a l'hora de crear noves espècies adaptables al canvi climàtic.

2.3.2. Empreses involucrades en el programa de millora de plantes

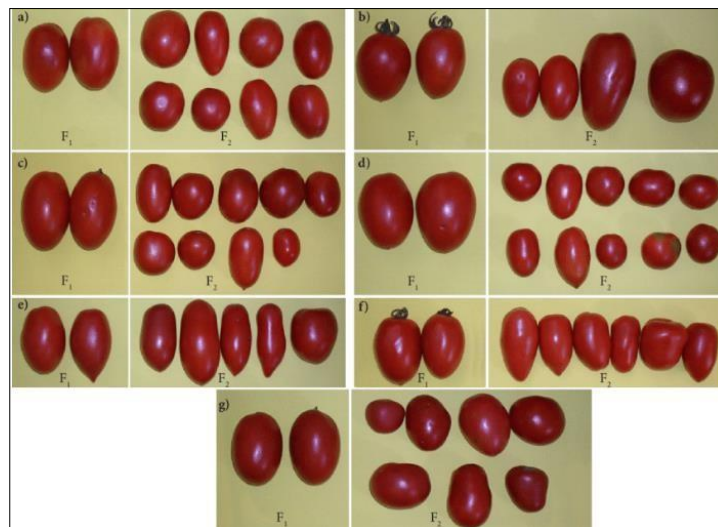
Com s'ha explicat anteriorment, per tal de portar a terme el conegut "plant breeding program", és necessari realitzar els encreuaments adequats entre dues varietats d'una mateixa espècie per tal d'obtenir la varietat desitjada, la qual és una varietat nova i millorada. Aquest procés és llarg i consta de tres fases ben diferenciades.

En primer lloc, es troben les empreses de llavors, les quals tenen un paper molt rellevant en el sector de millora genètica, producció i distribució de llavors d'espècies de plantes agrícoles i hortícoles. Aquestes empreses s'encarreguen de la creació de llavors de línies pures, és a dir, de llavors totalment homozigots. Per tal d'aconseguir una línia 100% pura són necessaris aproximadament vuit anys d'investigació ja que cal autopolinitzar-la durant varies generacions. Una vegada s'obté aquesta llavor de línia pura s'encreua amb una segona llavor també homozigot amb la finalitat d'aconseguir una llavor híbrida (F1). Les llavors híbrides només s'obtenen encreuant dues llavors de línia pura i, per tant, la seva creació només és possible de ser portada a terme per les empreses de llavors ja que són les úniques que disposen de les llavors homozigots. A més a més, el 50% dels gens de les llavors híbrides provenen d'una de les dues línies parentals i l'altre 50% dels gens provenen de l'altra línia parental o pura. Per tant, totes les llavors híbrides i, en conseqüència, totes les plantes que germinen d'aquestes llavors, són idèntiques.



Il·lustració 9. Creació d'un híbrid comercial a partir de dues línies

No obstant, la generació F₂, descendent de la F₁ híbrida, consta d'individus amb característiques molt diferents a la F₁ (amb moltes plantes mal formades, molt petites o poc productives) si no es cultiven en condicions de laboratori. Per aquest motiu i per tal de controlar el mercat i la producció privada de plantes, només es comercialitzen les llavors híbrides ja que quan es cultiva una llavor híbrida per obtenir la F₂, les plantes descendents no posseeixen característiques favorables i és necessari comprar llavors híbrides cada any (a les empreses de llavors).



Il·lustració 10. Variació dels fruits de la F₂ en relació amb la F₁ (híbrids), en set varietats de tomàquet

El fet de només comercialitzar les llavors híbrides, a més a més de comportar una forta dependència dels agricultors envers les grans companyies i empreses de llavors homozigots, també causa una enorme pèrdua de biodiversitat agrícola ja que milers de varietats (provinents de llavors tradicionals) es substitueixen per unes poques varietats comercials. Les grans empreses centren bàsicament la seva investigació i desenvolupament en aquestes llavors ja que no volen destinar recursos econòmics a varietats tradicionals que es poden autoreproduir. Salvaguardar les llavors tradicionals i la diversitat genètica queda

en mans dels bancs de llavors, els quals emmagatzemen les llavors tradicionals i van a la recerca de les que s'han perdut al llarg dels anys.

No obstant, actualment, a causa del canvi climàtic moltes espècies vegetals essencials en la dieta humana estan desapareixent i a través del “plant breeding program” es comença a crear noves espècies amb característiques nutricionals similars a les de les plantes extingides. A més a més, aquestes noves espècies també posseeixen característiques per resistir el canvi climàtic.

En segon lloc, es troben els anomenats “breeders”, agricultors que s'encarreguen d'observar el fenotip de les plantes, de tenir cura d'elles i de seleccionar les millors varietats segons l'aparença física. Cada “breeder” és especialista en una o més espècies concretes de plantes fins al punt de conèixer tots els trets fenotípics de totes les seves varietats. Per tant, són les persones capaces de seleccionar varietats millorades a partir d'elles, ja que s'aconsegueixen encreuant-les.

No obstant, si els “breeders” porten a terme el programa de millora d'una varietat sense l'ajuda d'eines biotecnològiques i d'enginyeria genètica, poden passar centenars d'anys fins que no aconseguen la varietat millorada ja que realitzen els creuaments només tenint en compte el fenotip. Per aquest motiu, és essencial l'ús d'eines moleculars que ajuden a accelerar el programa de millora. Aquí és on entra en joc el tercer àmbit que intervé en el “plant breeding program”: els enginyers genètics i els biotecnòlegs. Els científics no són tan especialistes en una espècie de planta com els “breeders” però són capaços de seqüenciar el genoma complet de les diferents varietats de l'espècie. Una vegada es seqüencia el genoma es poden comparar els genotips i observar quines són les bases nitrogenades que difereixen en una varietat respecte de l'altra. Llavors, mitjançant l'ajuda de marcadors moleculars és possible marcar aquestes bases nitrogenades i tenir-les controlades durant els creuaments. D'aquesta manera, es pot saber quin és el gen que aporta informació pel caràcter que es vol aconseguir en la nova varietat i, si es un marcador molecular es flanqueja a aquest gen, és impossible perdre'l durant els creuaments. Per tant, l'obtenció de la varietat desitjada és molt més ràpida.

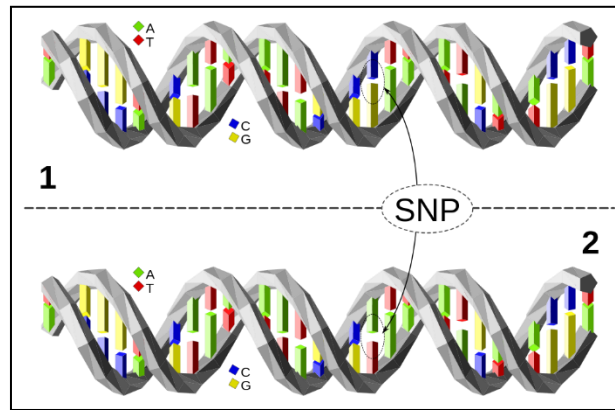
2.3.3. Marcadors moleculars

Els marcadors moleculars o marcadors genètics són fragments de la seqüència d'ADN que es localitzen molt a prop d'un gen específic que aporta informació per un caràcter concret. En general, la seqüència de nucleòtids del gen d'interès no és coneguda mentre que la seqüència del marcador sí que ho és, per tant, serveixen com punts de referència per controlar la transmissió d'un gen d'una generació a una altra. Així si un gen amb un al·lel X portat per un individu també el porta el seu pare però no la seva mare, l'individu l'ha rebut del seu pare. Per tant, en aquest cas, els marcadors moleculars flanquejats a aquest gen d'al·lel X permeten conèixer l'origen parental d'aquest gen.

La selecció assistida per marcadors moleculars (MAS, de l'anglès Marker Assisted Selection) consisteix en la selecció indirecta en el qual un caràcter d'interès és seleccionat en funció d'un marcador que es troba lligat al mateix caràcter d'interès. Aquest caràcter pot anar des de la productivitat i qualitat fins a la resistència a malalties i plagues i estressos biòtics. És un mètode molt utilitzat en programes de millora genètica de plantes ja que la selecció assistida per marcadors permet, per exemple, seleccionar plantes amb resistència a alguna plaga identificant al·lels de gens associats a marcadors, cosa que estalvia introduir les plantes a un medi selectiu que conté el patogen, per tal de seleccionar plantes resistents a la plaga. El MAS és útil a l'hora de seleccionar caràcters difícils de mesurar, que tinguin poca heretat i que s'expressin tard en el desenvolupament.

Actualment, existeixen molts tipus de marcadors moleculars però en la part pràctica del treball en qüestió, només s'usa un sol tipus de marcadors: el Polimorfisme de Nucleòtids Simples (SNP, de l'anglès Single Nucleotide Polymorphism).

El Polimorfisme de Nucleòtids Simples són polimorfismes (existència de múltiples al·lels d'un determinat gen dins una població) d'un gen que es donen per variació d'un únic nucleòtid de la seqüència de DNA. Per tal de que aquesta variació es reconegui com a Polimorfisme de Nucleòtids Simple, s'ha de donar a més d'un 1% de la població d'aquella varietat ja que sinó es considera una mutació espontània. Per aquest motiu els Polimorfismes de Nucleòtids Simple són idonis a l'hora de buscar les mutacions no espontànies que es donen en una sola base nitrogenada dels genomes de dues varietats diferents d'una mateixa espècie.



Il·lustració 11. Polimorfisme de Nucleòtids Simples

Un fet molt rellevant que cal tenir en compte a l'hora de modificar les plantes genèticament mitjançant encreuaments és que, cada un d'aquests SNP que es donen entre dues varietats, els quals acostumen a constituir el canvi d'una citosina per una timina, signifiquen que una varietat posseeix un al·lel diferent al de l'altra varietat i això pot causar que el gen no sintetitzi la mateixa proteïna en ambdues varietats i que, per tant, els respectius fenotips difereixin en algun aspecte. Per tant, es veu clarament que la mutació d'una sola base nitrogenada del genotip pot ocasionar canvis en el fenotip de l'organisme. S'observa que el fenotip depèn del genotip, en gran part (també depèn de l'entorn).

2.3.4. Relacions entre al·lells

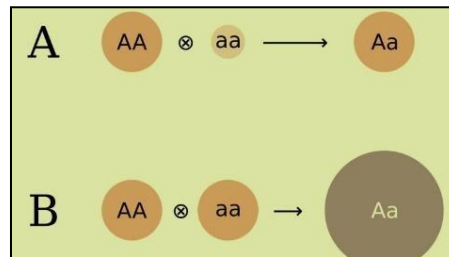
A l'hora de portar a terme el "plant breeding program", s'ha de tenir molt en compte les relacions que existeixen entre al·lells ja que és possible que un únic gen porti la informació pel caràcter que es busca, però també és possible que la informació l'aportin dos gens que es troben sota una epístasi o, bé, que el caràcter expressat tingui un gran nombre de variacions fenotípiques.

- **Relacions entre al·lells quan només hi ha un gen.**

Els gens són seqüències d'ADN que codifiquen productes cel·lulars (ARN, proteïnes), els quals es tradueixen en l'aparició d'un determinat caràcter. Cada gen pot existir en dues o més versions, responsables de la variació d'un caràcter. Aquestes versions reben el nom d'al·lells.

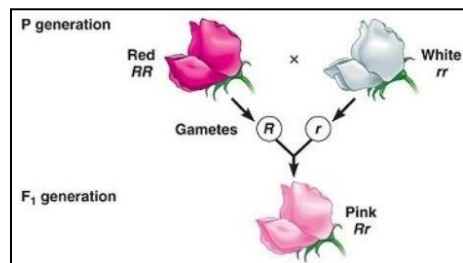
Els organismes diploides, independentment de les variants existents d'un gen, només pot heretar dues còpies del mateix, una de la mare i un altre del pare. Les seves còpies estan ubicades al mateix lloc (locus) dels cromosomes que formen el par dels homòlegs.

1. Dominància completa: implica que el genotip dominant s'expressa tant en la forma homozigot com en la forma heterozigot.



Il·lustració 12. En el cas A es dona una dominància completa i en el cas B un dominància incompleta

2. Dominància incompleta: el descendent presenta un fenotip diferent al dels progenitors. Cap dels dos al·lels (dominant ni recessiu) del gen que aporta informació pel caràcter és expressat en el seu fenotip. Aquest cas es dona quan les dues línies parentals són homozigots i la nova generació és heterozigot.



Il·lustració 13. Dominància incompleta

3. Codominància: es un model hereditari no mendelià en el qual en l'estat heterozigot no existeix cap gen recessiu sinó que ambdós es comporten com a dominants.

Per exemple, la codominància es dona quan es creua una planta A de flors de color vermell dominant amb una planta B de flors de color blanc també dominant. El resultat de l'encreuament és una planta amb una flor AB de color vermell amb taques blanques, per tant, presenta ambdues característiques dominants (A i B s'expressen a la vegada).



Il·lustració 14. Codominància en la flor de la Camèlia

- **Relacions entre al·lels quan hi ha dos gens**

Coneixem com a epístasis la interacció entre dos gens a l'hora d'expressar un únic caràcter fenotípic. En aquest cas, l'expressió d'un gen depèn de l'expressió d'un segon gen, i la seva acció també es veu modificada per l'acció del segon gen. D'aquesta manera, el gen que s'expressa en el fenotip s'anomena epistàtic mentre que el fenotip suprimit s'anomena hipostàtic.

L'epístasi està fortament relacionada amb la recombinació genètica (fenomen citològic de l'encreuament de cromosomes homòlegs o, dit en altres paraules, de l'intercanvi de fragments de cromosomes homòlegs durant la meiosi cel·lular) ja que si el gen epistàtic i el gen hipostàtic es localitzen al mateix locus, per tant, no són independents, les freqüències fenotípiques, esperades en el fenotip dels descendents, varien segons els afectes de la recombinació. Si dos gens es troben a una distància relativament propera, la possibilitat de recombinació entre ells és molt menys elevada que si es localitzen en extrems oposats del cromosoma. Per tant, es parla d'una freqüència recombinant (possibilitat que posseeixen de recombinar-se) del 100% quan la possibilitat de que es doni el fenomen de la recombinació genètica és màxima (quan els dos gens es troben un a cada extrem del cromosoma, el màxim d'allunyats possible l'un de l'altre).

- **Relacions entre al·lels quan hi ha més de dos gens: locus d'un caràcter quantitau (QTL)**

Els locus de caràcters quantitius (QTL, acrònim de l'anglès "quantitative trait locus") és un locus (posició fixa d'un gen en un cromosoma) on la variació dels seus al·lels està

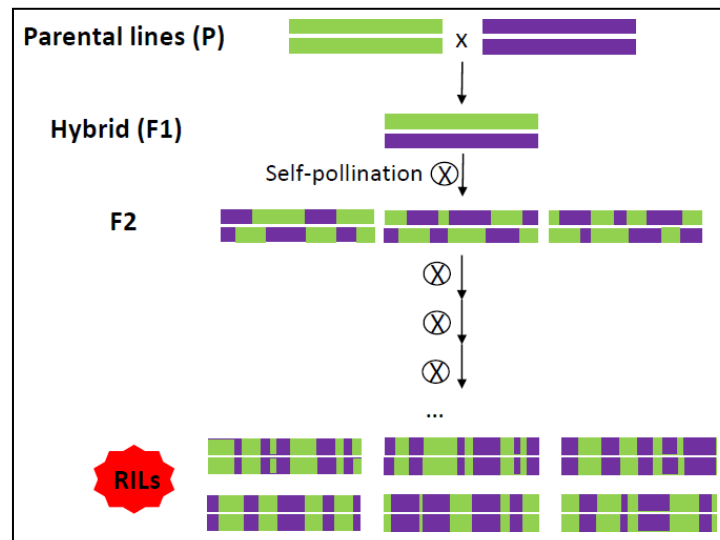
associada amb la variació d'un caràcter quantitatiu, és a dir, amb aquells caràcters quantificables que varien de forma contínua. Per tal de deduir la presència d'un QTL cal recórrer a la cartografia genètica (disciplina de la genètica que, mitjançant diverses tècniques, busca assignar als diferents gens d'un genoma el seu lloc físic en aquest), on la variació total per a un determinat caràcter es divideix en components associats a una o diverses regions cromosòmiques.

Els QTL són difícils d'identificar ja que, en aquest cas, l'observació del fenotip d'un únic individu no és útil i, a més a més, els efectes fenotípics de cada gen associat amb un caràcter quantitatiu són força petits. L'anàlisi dels QTL per a un caràcter es porta a terme escollint i creuant dues línies parentals que difereixin en un o més caràcters quantitatius i, posteriorment, analitzant el fenotip de la descendència per relacionar cada QTL amb un marcador genètic conegut, o un interval de marcadors (es relaciona el fenotip amb el genotip). De fet, els QTL es cartografien i, més tard, s'identifiquen quins marcadors moleculars (com ara SNP) es correlacionen amb el tret observat. El mètode modern utilitzat per localitzar i cartografiar els QTL implica buscar associacions entre marcadors d'ADN i fenotips. Per aquest motiu, les poblacions més aptes per mapejar QTLs són les derivades de l'encreuament de dues línies pures.

2.3.5. Tipus de poblacions

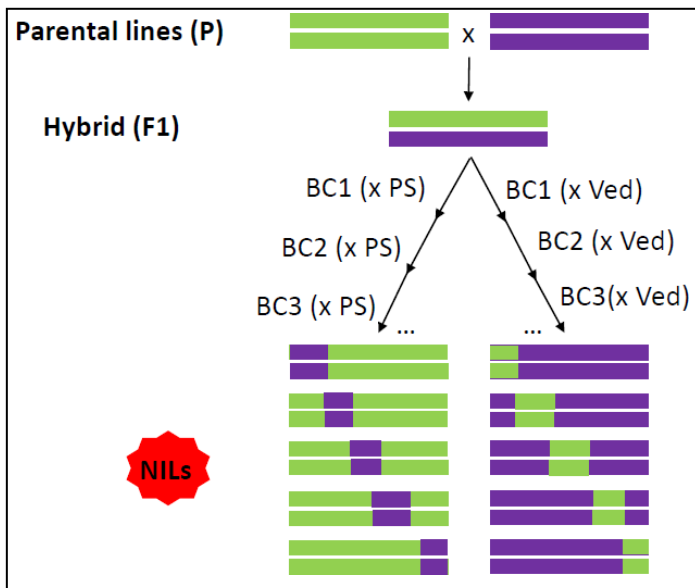
Quan es parla de tipus de poblacions del "plant breeding program" es fa referència al tipus d'encreuaments que es poden portar a terme.

D'una banda es troben les poblacions RILs, en les quals es crea un híbrid (F1) a partir de dues línies parentals pures. Aquest híbrid que està format per un 50% dels gens provinents de la primera línia parental i l'altre 50% del genoma provinent de la segona línia parental, s'autopol·linitza i s'obtenen descendents (F2) amb característiques genètiques molt diferents a la F1. Llavors aquests individus s'autopol·linitzen i donen lloc a nous organismes (F3) molt diferents els uns dels altres. Tots aquests individus de la F3 estan formats per gens provinents de les dues varietats parentals.



Il·lustració 15. Població de RILs. Cada organisme consta de dues línies de color

D'altra banda, existeixen les poblacions NILs, les quals es basen en “backcrosses”, és a dir, en encreuar l'híbrid (F1) amb una de les dues línies parentals a partir de les quals ha estat creat ell mateix. Una vegada s'obté la F2, la qual posseeix més gens de la línia parental pura que ha estat usada en el “backcross” amb l'híbrid, s'encreua de nou amb la mateixa línia parental, i així successivament. D'aquesta manera s'acaba obtenint una generació, els individus de la qual posseeixen tot el genoma idèntic al de la varietat parental que ha participat dels “backcrosses”, excepte un gen en concret de l'altra línia parental. Aquest gen en concret és el gen d'interès, és a dir, el que interessa que posseeixi la nova varietat de l'espècie i no s'ha perdut durant els “backcrosses” amb la línia parental que no posseeix aquest gen d'interès gràcies als marcadors moleculars que estan flanquejats al mateix gen.



Il·lustració 16. Població de NILs o de "backcrosses"

2.3.6. Regulació a nivell legal

Segons el que explica Montserrat Martín, investigadora del Centre de Recerca per a l'Agricultura Genètica (CRAG), fins a l'any 2018, una planta editada genèticament mitjançant un mètode de reproducció (encreuaments entre varietats d'una mateixa espècie), no es troba sotmesa a la mateixa regulació que les plantes transgèniques ja que no es considera un organisme genèticament modificat. D'aquesta manera, posseeix una lliure comercialització i no es troba sota cap control ni autoritat. No obstant, a causa de la sentència proclamada l'any 2018 per la Cort de Justícia Europea, tota planta alterada genèticament ha de seguir el mateix procés de comercialització que les plantes transgèniques. És a dir, que a Europa, si es vol comercialitzar una planta editada a partir d'encreuaments, l'empresa responsable ha de sotmetre's a llargs anys de burocràcia, revisions, comitès de vigilància, etc..., la qual cosa ho fa pràcticament impossible.

D'altra banda, la resta de territoris del món que no formen part de la Unió Europea, no segueixen aquesta regla imposada l'any 2018 i, per tant, actualment, en aquestes zones del planeta ja es comencen a comercialitzar plantes editades genèticament.

3. ESTUDI D'UN GEN RESPONSABLE D'UN CARÀCTER VEGETAL CONCRET

L'estudi genètic en poblacions de plantes permet localitzar i identificar gens que són responsables de caràcters d'interès agrònom. Alguns d'aquests gens identificats permeten augmentar el rendiment de producció al camp mentre que d'altres doten a les plantes d'una major estabilitat.

Les tecnologies de seqüència massiva, estan suposant una revolució en molts camps d'investigació de biologia ja que permeten seqüenciar el genoma sencer d'un gran nombre d'espècies. Després de seqüenciar el genoma sencer del vegetal que posseeix el caràcter que es vol millorar, cal fer ús d'un seguit de tècniques essencials per portar a terme l'estudi: els marcadors genètics o moleculars, un mapa genètic que mostra les posicions de tots els gens en cada cromosoma, l'anàlisi QTLs, la Reacció en Cadena de la Polimerasa per ampliar la mostra de DNA, entre d'altres.

Un dels punts més importants que s'ha de tenir en compte a l'hora d'estudiar un gen (localitzar-lo i identificar-lo) és la comparació i la relació que existeix entre el genotip i el fenotip de l'individu que posseeix el caràcter que s'estudia. Mitjançant l'estudi i la simple observació del fenotip es pot saber amb certesa si el gen localitzat és el que realment s'ha estat cercant durant tota la recerca. Això és degut a que si el gen candidat¹ és tallat, el caràcter fenotípic expressat gràcies a la informació genètica que aporta aquest gen candidat desapareix en les futures generacions perquè no és transmès per herència. Aquest procés de comprovació del gen candidat serveix per validar tot l'estudi portat a terme i és essencial per tal de poder fer públics els resultats de l'estudi.

¹ El gen candidat és aquell que es creu que és el responsable de l'expressió del caràcter que es vol millorar.

4. ESTUDI DEL GEN RESPONSABLE DEL COLOR TARONJA DELS VEGETALS, ESPECÍFICAMENT EN EL MELÓ

Estudiar el gen que provoca el color taronja de les fruites i dels vegetals és útil per afavorir la salut de la societat en general. Això és degut a que aquest gen també influeix en l'acumulació de carotenoides en les plantes, els quals són precursors de la vitamina A. Per aquest motiu, els vegetals que presenten un color ataronjat es relacionen amb la contenció de carotenoides. Aquest fet té una gran importància per a la vida i per a la salut humana ja que, a més a més de donar el color taronja a les fruites i verdures, els carotenoides també aporten més d'un 30% de la ingesta total de vitamina A d'una persona. Com que el cos humà no és capaç de fabricar aquesta vitamina, la qual té un paper essencial pel seu correcte funcionament, l'home ha de recórrer a fonts vitamíniques externes. És estrictament necessari mantenir una dieta rica en aliments que contenen precursors de la vitamina A per tal de no patir una deficiència vitamínica. Alguns clars exemples en són la pastanaga, el mango i el meló Vedrantaís.

L'objectiu principal de la recerca d'aquest gen és poder-lo localitzar dins del genoma vegetal, ja que, tal i com s'ha dit anteriorment, aquest mateix gen responsable del color taronja, també és el que provoca l'alt contingut de carotenoides, precursors de la vitamina A. Una vegada es localitza, es pot extreure amb la finalitat de ser injectat en altres aliments que no contenen carotenoides (el resultat final seria la producció d'aliments transgènics) o, bé, es pot flanquejar un marcador molecular en aquest gen i creuar l'aliment amb un altre que no contingui carotenoides per tal d'obtenir un descendent híbrid que sí que en contingui. En el segon cas és necessari que els dos individus que es creuen entre ells, tant el que conté el gen responsable del color taronja, com el que no el conté, formin part de la mateixa espècie, per una possible pol·linització. Per tant, a més a més de beneficiar la salut de milions de persones, l'estudi del gen permet crear noves espècies amb un alt contingut de vitamina A, mitjançant tècniques biotecnològiques. Aquest fet és important perquè, actualment, a causa del canvi climàtic moltes espècies riques en vitamina A estan desapareixent i cal reconduir la situació per no patir, en un futur, deficiència d'aquesta vitamina.

En aquest estudi, té una gran importància el coneixement i l'experimentació genètica. És necessari conèixer el genoma complet del vegetal que es manipula, extreure'n ADN i aïllar-

lo per tal d'estudiar-lo i, posteriorment, elaborar-ne un mapa genètic que mostri els cromosomes.

Tot i així, si només fos necessari conèixer els gens que constitueixen la fruita o la verdura per tal de trobar un gen específic, com ho és el que conté els carotenoides, no caldria tenir en compte el color taronja de l'aliment. L'experiment podria estar basat únicament en l'estudi del genoma del meló, i el color del vegetal no tindria una importància rellevant. No obstant, els carotenoides no són perceptibles a simple vista i únicament amb el genotip del vegetal, no és possible cercar el gen. Per portar a terme l'experiment és necessari comparar el genotip amb el fenotip. La part del fenotip que s'utilitza com a paràmetre ha de ser visible com, per exemple, la seva coloració. El color del vegetal (fenotip) és indispensable per saber on es crea la mutació en el genoma (genotip) que provoca que un vegetal sigui taronja i l'altre no o, dit d'una altra manera, que comporta que un contingui carotenoides i l'altre no.

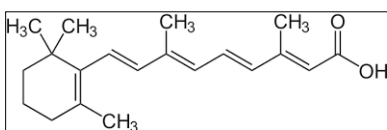
4.1. La vitamina A

4.1.1. Què és la vitamina A

La vitamina A és un grup de compostos orgànics insaturats (compostos químics formats per molècules de carboni les quals formen enllaços dobles i triples entre elles o amb molècules d'hidrogen) que posseeixen un enorme valor nutricional. Dins aquest grup s'hi troba el retinol, el retinal, l'àcid retinoic i varis carotenoides provitamina A (especialment el beta-carotè). Les diferents formes de la vitamina A són liposolubles, és a dir, que es dissolen en substàncies grasses i/o olioses.

4.1.2. Composició química de la vitamina A

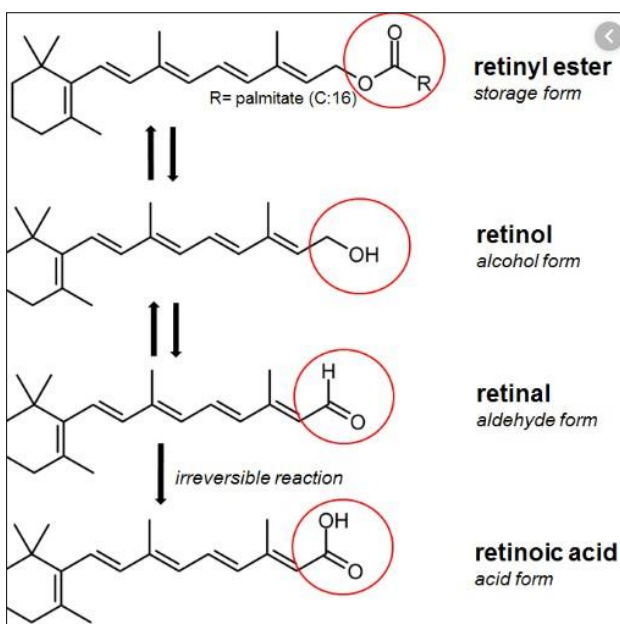
Químicament, totes elles consten d'un anell beta-ionona (prové de la degradació de carotenoides) el qual s'uneix a una cadena isoprenoide², anomenada grup retinil. Les dues estructures són necessàries per l'activitat de la vitamina.



Il·lustració 17. Estructura química de la Vitamina A

² L'isoprenoide és un compost orgànic líquid, incolor, volàtil i reactiu.

El cos humà obté les diferents formes de la vitamina A a través de la dieta i cadascuna prové d'una font vitamínica diferent. En els aliments d'origen animal, la principal forma de vitamina A és un èster ³(acetat o palmitat de retinil) el qual es converteix en retinol a l'intestí prim. El retinol és una substància groguenca i soluble en grassa. Químicament, aquesta nova forma que adquireix la vitamina A, és considerada un alcohol ja que conté un grup hidroxil (-OH) enllaçat a un àtom de carboni. La forma de retinol té la funció d'emmagatzemar la vitamina A i es pot convertir en retinal. Aleshores ja no es parla d'un alcohol sinó d'un aldehyd (consta del grup funcional -CHO). No obstant, la forma d'alcohol pur es molt inestable, de manera que la vitamina A es troba als teixits en forma d'èster de retinil.



Il·lustració 18. Estructura química del retinil, retinol, retinal i àcid retinoic

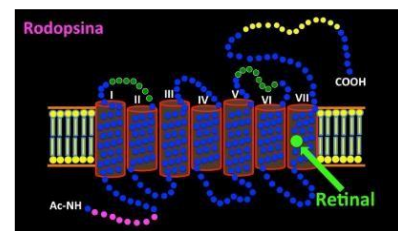
D'altra banda, la vitamina A es troba en forma de carotenoides (carotens i xantofil·les) en aliments vegetals. Solament els carotens alfa-carotè, beta-carotè, gamma-carotè i la xantofil·la beta-criptoxantina funcionen com a provitamina A en herbívors i animals omnívors, que posseeixen l'enzim beta-carotè 15,15'-dioxigenassa, el qual desintegra el beta-carotè en la mucosa intestinal i el converteix en retinal. Aleshores el retinal és reduït a retinol per la retinaldehid reductasa (un enzim intestinal) i part d'aquest retinol és esterificat a retinil plamitat. A partir d'aquí, part d'aquest retinil s'emmagatzema mentre que una altra part s'esterifica gràcies a una esterasa per tornar a obtenir retinol. Si el retinol format s'oxida, dona lloc a l'àcid retinoic. Per tal de que el retinol s'oxidi, és necessari que preferentment s'associï a una proteïna anomenada CRBP i doni lloc al complex retinol-CRBP. Llavors

³Els èsters són compostos orgànics en els quals un o més protons són substituïts per grups orgànics alquil.

l'enzim retinol deshidrogenasa converteix el retinol a retinaldehid i, aquest, mitjançant l'acció de l'enzim retinaldehid oxidasa, s'oxida a àcid retinoic. L'àcid retinoic s'uneix a albúmina⁴ per tal de ser transportat pel torrent sanguini i és un important factor de creixement, similar a una hormona.

4.1.3. Funcions de la vitamina A

La vitamina A desenvolupa un paper important en un gran nombre de funcions del cos humà. En primer lloc, la vitamina A té una paper rellevant en el cicle visual. La retina de l'ull necessita la vitamina A en forma de retinal. Dins de l'ull, l'11- cis -retinal s'uneix a la proteïna opsina per formar la rodopsina⁵. Quan la llum entra a l'ull, l'11- cis -retinal s'isomeritza a la forma tot-"trans". És aleshores quan s'envia una senyal nerviosa a través del nervi òptic fins el centre visual del cervell. Després, part del retinal es converteix novament en 11- cis -retinal i la resta es transforma en retinol, el qual s'emmagatzema en el pigment de les cèl·lules epitelials per ser reutilitzat quan sigui necessari. La rodopsina és la molècula que absorbeix la llum i és necessària per veure el color i les formes quan la llum és escassa.



Il·lustració 19. Rodopsina

La vitamina A, en forma d'àcid retinoic, regula la transcripció de gens mitjançant la unió a receptors nuclears⁶, els quals s'uneixen a l'ADN. A més a més, regulant l'expressió gènica, aconseguix millorar la producció d'ARN. A conseqüència d'aquest fet, la vitamina A també és essencial pel correcte metabolisme de les proteïnes.

Gràcies a l'àcid retinoic, el cos humà també és capaç de mantenir una salut normal de la pell i, moltes vegades, és utilitzat per el tractament de l'acne. Quan s'utilitza com a fàrmac, es coneix com a isotretinoïna i té com a funció reduir el nombre de bacteris tant en els conductes com a la superfície de la pell.

⁴ L'albúmina és una proteïna globular que es troba al plasma sanguini.

⁵ La rodopsina és una proteïna transmembrana que es localitza en els discs dels bastonets de la retina.

⁶ Els receptors nuclears són un tipus de proteïnes que es troben dins de cèl·lules i que són responsables de detectar certes molècules. Com a resposta a la unió a aquestes molècules, els receptors treballen conjuntament amb altres proteïnes per regular l'expressió de gens específics, controlant així el metabolisme de l'organisme.

Pel que fa a la reproducció humana, la vitamina A intervé en el cicle reproductiu masculí i femení ja que afavoreix la producció d'espermatozoides i els canvis que es produeixen en les cèl·lules durant el desenvolupament del fetus.

Per última però no menys important, es troba la funció immune que realitza la vitamina A en humans. Té un paper essencial en el sistema immunològic, sobretot en la diferenciació cel·lular⁷ i la proliferació⁸ de les cèl·lules T⁹. A més a més de promoure la proliferació de les cèl·lules T, la vitamina A també és important durant el procés de diferenciació d'aquestes cèl·lules. Això és degut a que si es troba present àcid retinoic, les cèl·lules dendrítiques¹⁰ de l'intestí poden convertir les cèl·lules T en cèl·lules T reguladores, les quals són importants per regular la força de la resposta immune i protegir l'individu. D'altra banda, la vitamina A s'encarrega de regular correctament la latència de les cèl·lules mare hematopoètiques. Aquest fet és necessari per mantenir el sistema immunològic en estat saludable ja que les cèl·lules mare hematopoètiques són les cèl·lules sanguínies encarregades de produir i diferenciar la resta de cèl·lules sanguínies, així com les immunes. La vitamina A també està fortament relacionada amb la resposta immune en els teixits de la mucosa¹¹. Les cèl·lules T que es dirigeixen a l'intestí poden afectar les cèl·lules dendrítiques i aleshores pot augmentar la secreció de immunologia A (IgA, anticòs), la qual és important per la resposta immune en els teixits de la mucosa.

Finalment, cal esmentar la importància que té la vitamina A en el procés de formació òssia, així com en l'enfortiment dels ossos i de les dents.

4.1.4. Vitamina A en usos mèdics

La vitamina A i els seus derivats són compostos químics molt utilitzats en el món de la medicina. Els retinoides, per exemple, estan relacionats químicament amb l'àcid retinoic i s'utilitzen per regular les funcions dels gens. El palmitat de retinil és, moltes vegades, el principal component de les cremes corporals ja que una vegada entra amb contacte amb la

⁷ La diferenciació cel·lular procés en el qual una cèl·lula poc especialitzada es converteix en una més especialitzada.

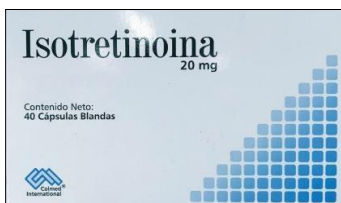
⁸ La proliferació és l'augment del nombre de cèl·lules com a resultat del creixement i la multiplicació cel·lular.

⁹ Les cèl·lules T són un tipus de glòbul blanc. Les cèl·lules T formen part del sistema immunològic i es formen a partir de cèl·lules mare en la medul·la òssia. Ajuden a protegir el cos de les infeccions i podrien ajudar a combatre el càncer.

¹⁰ Les cèl·lules dendrítiques són cèl·lules immunitàries que formen part del sistema immunitari dels mamífers.

¹¹ Els teixits de mucosa són teixits orgànics suaus i humits que recobreixen l'interior dels òrgans.

pell es converteix en retinol i, posteriorment, en àcid retinoic, el qual té una gran activitat biològica. Actualment, s'utilitzen productes farmacèutics, elaborats a partir de derivats de l'àcid retinoic, per a tractaments de càncer, del Síndrome d'Immunodeficiència Humana i dermatològics. La Isotretinoïna és un fàrmac utilitzat per l'acné sever però també és usat en tractaments cancerígens i dermatològics. En un primer moment va estar creada com un medicament de quimioteràpia per el càncer cerebral, pancreàtic, etc. Això és degut a que la isotretinoïna és un retinoide (derivat de la vitamina A), el qual té l'habilitat de matar cèl·lules de divisió ràpida.



Il·lustració 20. Isotretinoïna

4.1.5. Falta o excés de vitamina A

Per tal de determinar el nivell de vitamina A en sang, s'ha de recórrer a una anàlisi sanguínia. La falta de vitamina A pot provocar que la persona sigui més propensa a patir infeccions, problemes de ceguera, erupcions cutànies, cansament permanent, insomni i pèrdua de pes. Tanmateix, l'excés de vitamina A també pot provocar la pèrdua excessiva de pes, fins a causar un problema d'anorèxia (pèrdua de la gana). També són problemes comuns l'alopecìa (malaltia que causa la pèrdua anormal o rarefacció del cabell), els forts dolors de cap, les nàusees, la pèrdua de cabell, la somnolència, la febre, la sequedat de la pell i de les membranes mucoses, la icterícia (síntoma o signe que consisteix en la coloració groguenca de la pell i/o de les mucoses), algunes malalties congènites (defectes de naixement), la carotenodèrmia (decoloració taronja-groga de la pell) .

4.1.6. Fonts per obtenir vitamina A

La vitamina A es troba en una àmplia varietat d'aliments. Des d'hortalisses de fulla verda i fruites i verdures de color taronja com el meló i la pastanaga, fins a carns vacunes com el fetge de vaca; passant per làctics i cereals fortificats.

A més a més, també existeixen suplementes vitamínics, com l'acetat de retinil i el beta-carotè. No obstant, aquests suplementes no sempre són adequats per a totes les persones. Existeixen estudis que demostren la seva eficàcia en zones on la deficiència de vitamina A és un greu problema. Per exemple, a l'any 2006, La Organització Mundial de la Salut va estimar que la suplementació amb vitamina A, va evitar 1.25 milions de morts per deficiència de vitamina A en 40 països des del 1998. Malgrat aquests estudis sobre l'eficiència de la suplementació vitamínica, està demostrat que en les persones que mantenen una dieta rica i variada, els suplementes causen un efecte contrari al que acostuma a produir la consumició de vitamina A, perjudicial pel sistema immunològic, la salut de la pell, la visió nocturna, etc.

Les quantitats diàries de vitamina A recomanades varien segons l'edat de la persona. A més a més, hi ha situacions en les que la persona necessita consumir suplementes vitamínics a causa de les condicions en les que es troba. En són exemples els bebès prematurs durant el seu primer any de vida, les persones que pateixen fibrosis quística perquè la vitamina A afavoreix el tractament dels problemes intestinals causats per la malaltia i els celíacs pel simple fet de que els hi és més difícil absorbir les grasses en les quals s'hi troben dissolts els carotenoides. Les quantitats recomanades segons La Fundació Espanyola del Cor són les següents:

De 0 a 6 mesos: 300 micrograms

De 6 a 11 mesos: 350 micrograms

De 1 a 6 anys: 400 micrograms

De 7 a 10 anys: 500 micrograms

De 11 a 14 anys: 600 micrograms

Els homes de 15 anys i majors: 700 micrograms

És extremadament important que les dones embarassades i lactants no consumeixin un excés de vitamina A pel desenvolupament fatal normal i en la llet materna. Si durant l'embaràs, la mare ha patit una deficiència de vitamina A, està estrictament prohibida la ingesta de suplementes vitamínics en època postnatal.

4.1.7. Deficiència de vitamina A

La deficiència de vitamina A és present en la majoria de països subdesenvolupats i s'estima que afecta, aproximadament, a un terç dels nens menors de cinc anys en tot el món. Segons UNICEF, cada any causa la ceguera previsible d'entre 250.000 i 500.000 nens i, aproximadament, la mort de 650.000 menors de cinc anys. Abolir la deficiència de vitamina A és el quart dels "Objectius de Desenvolupament del Mileni de les Nacions Unides" ja que es creu que és fonamental per reduir la mortalitat infantil.

Existeixen dos tipus de deficiència de vitamina A. Anteriorment, s'ha parlat del primer tipus, la qual pateixen aquelles persones que no ingereixen una quantitat adequada de carotenoides provitamina A provinents de les hortalisses o bé de vitamina A preformada de productes animals i làctics. En aquests casos, la població acostuma a viure en terres àrides, en les quals és difícil conrear vegetals de fulla verda i fruites, de manera que la seva dieta es basa en cereals. Moltes vegades l'arròs és l'aliment base de la seva dieta. Als països asiàtics aporta entre un 32% i un 70% de l'energia diària que ingereix una persona. Per aquest motiu i buscant una solució a la manca de vitamina A en la dieta de les persones que habiten als països subdesenvolupats, l'any 1992, Ingo Potrykus, de l'Institute of Plant Sciences de Suïssa i Peter Beyer, de la universitat de Freiburg, varen iniciar un projecte basat en la biotecnologia i anomenat Golden Rice o Arròs d'Or. El projecte va ser publicat per primera vegada l'any 2000. L'arròs d'or és una varietat d'arròs produïda a través de la modificació genètica. El principal objectiu és obtenir un arròs capaç de produir beta-carotè, precursor de la vitamina A, en la part mengívola per als humans. A l'any 2005 es va produir l'anomenat arròs 2, el qual produeix 23 vegades més de carotenoides que l'arròs d'or.

El segon tipus de deficiència de vitamina A és el que pateixen aquelles persones que pateixen una mala absorció crònica de lípids, una baixa producció de bilis i una exposició crònica a oxidants, com el fum del cigarret. Això és degut a que la vitamina A és insoluble en aigua i soluble en grassa. La deficiència de zinc en pot ser un altre causant ja que pot afectar a la producció, transport i absorció de la vitamina A perquè és essencial per la síntesi de les proteïnes transportadores d'aquesta vitamina. A més a més, intervé en la conversió de la vitamina A en retinol a la retina de l'ull. En aquests casos, convé la ingesta de suplementes de vitamina A per tal d'aconseguir absorbir-ne la quantitat adient.

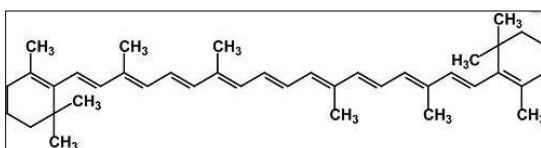
4.2. Els carotenoides

4.2.1. Què són els carotenoides?

Els carotenoides són un grup de pigments vegetals, responsables de la gran majoria dels colors groguencs, ataronjats i vermellosos presents en aliments vegetals, en bacteris, en fongs, en algues i en alguns animals com crustacis, peixos, aus i rèptils. Són pigments liposolubles, és a dir, que es dissolen en una altra substància (dissolvent). També posseeixen efecte antioxidant¹², gràcies al qual tenen un paper essencial a l'hora de protegir els organismes per tal que no pateixin danys durant la fotosíntesis, el procés de convertir la llum solar en energia química. A més a més de tenir una funció antioxidant, també són els precursors de la vitamina A i es poden dipositar en diversos teixits animals com en l'ull, el fetge, els músculs i la pell. S'estima que aproximadament un 10% dels carotenoides tenen valor com a vitamina A. Entre aquests s'hi troba el beta-carotè, l'alfa-carotè i el beta-criptoxantina, els quals també són els carotenoides més comuns de trobar en el plasma humà. El cos humà no és capaç de produir aquestes substàncies i les ha d'ingerir a través de la dieta o, bé, amb suplementes.

4.2.2. Composició química

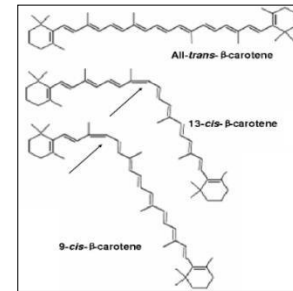
Aquests compostos, vistos des del punt de vista químic, pertanyen a la família dels terpens, és a dir, que estan formats per unitats de isoprè. Per ser més exactes, estan formats per vuit unitats de isoprè o, el que és el mateix, per 40 àtoms de carboni. D'aquesta cadena en pengen ramificacions de grups metil i consta d'enllaços dobles. Es coneixen 600 compostos d'aquesta família els quals es divideixen en carotens i xantofil·les, segons la seva estructura i la seva composició química. Normalment, els carotens aporten el color taronja o vermellós als organismes, mentre que les xantofil·les produeixen un color més groguenc.



Il·lustració 21. Estructura química carotenoides

¹² És una molècula capaç de prevenir una reacció química en la qual es realitza una transferència d'electrons d'una substància a un agent oxidant.

Una característica rellevant dels carotenoides és que es poden alterar per isomerització¹³. Aquesta alteració es pot produir per exposició a la llum, escalfament o de forma espontània en certs dissolvents. Els carotenoides naturals es troben sempre amb tots els dobles enllaços amb forma trans. La configuració trans dels dobles enllaços és la més estable, però a causa de les repulsions que indueixen els grups metil, els dobles enllaços poden adquirir configuració cis.



Il·lustració 22. Isomerització carotenoides

La presència d'un gran nombre de dobles enllaços provoca que els carotenoides s'oxidin fàcilment. En tots els casos d'oxidació, els carotenoides perden el seu color particular. El temps que tarden a oxidar-se té molta relació amb l'ambient en el qual es troben. Per exemple, els que trobem dins els aliments, són molt resistents a l'oxidació.

4.2.3. Biosíntesi dels carotenoides

En els vegetals verds es troben els cloroplasts i formen part del sistema de biosíntesi (procés catalitzador per enzims que es dona dins les cèl·lules dels organismes en el qual el substrat acaba donant un producte més complex) a partir de la llum solar i l'energia que aquesta proporciona.

La biosíntesi anual de carotenoides és d'uns 100 milions de tones en el regne vegetal i es produeix a partir de isopentenil pirofosfat. D'altra banda, els animals no poden sintetitzar aquest tipus de substàncies però sí que les poden transformar d'una a una altra.

4.2.4. Biodisponibilitat i metabolisme dels carotenoides en humans

Els carotenoides, altrament coneguts com a compostos pro-vitamina A, són derivats de la vitamina A que una vegada han estat ingerits pels humans, estan sotmesos a processos complexes d'absorció, metabolisme, transport i emmagatzemat. A la naturalesa existeixen 600 carotenoides diferents, però només 40 poden ser utilitzats per l'organisme humà.

¹³ Procés de reordenació interna dels àtoms d'una molècula per a obtenir un isòmer.

El procés d'absorció dels carotenoides s'inicia abans de la seva consumició ja que, en part, depèn de la gana que té la persona i de diversos factors psicològics, els quals regulen l'alliberació d'enzims digestius i els moviments del tracte gastrointestinal. La digestió de qualsevol aliment consumit comença a la boca de la persona, quan entra en contacte amb la saliva i és esmicolat amb les dents. Per tant, la masticació té un paper rellevant per la posterior alliberació dels carotenoides ingerits.

Una vegada l'aliment arriba a l'estómac, es comencen a alliberar carotenoides de la matriu¹⁴ gràcies al pH gàstric, a l'acció de diversos enzims i als moviments de l'estómac. La quantitat de carotenoides alliberats durant aquest procés, té relació amb el grau de processament de l'aliment consumit. Per exemple, l'aplicació de tractaments tèrmics o l'adició de grasses durant el processament de fruites i verdures, augmenta l'alliberació de carotenoides de la matriu ja que aquestes tècniques modifiquen les estructures subcel·lulars en les quals es troben els carotenoides. Són compostos lipofílics¹⁵ i, és per això, que una vegada han estat alliberats, es dispersen en la grassa de la dieta, la qual s'emulsiona¹⁶ amb els components aquosos.

Seguidament, la grassa emulsionada que conté els carotenoides arriba a l'intestí prim, on és digerida. Simultàniament, es formen les micel·les encarregades de transportar els carotenoides i altres compostos lipídics com el colesterol i els fosfolípids. Les micel·les també faciliten, de manera important, l'absorció dels carotenoides. En aquesta mateixa etapa hi intervenen secrecions de la vesícula biliar i del pàncrees. Primerament, la vesícula secreta sals biliars, gràcies a les quals, disminueix la mida de les gotes de grassa emulsionades i ajuda a la formació de micel·les¹⁷. En segon lloc, el pàncrees secreta bicarbonat de sodi. Aquest, neutralitza el pH i aporta els enzims digestius. Entre aquests enzims s'hi troba les lipases pancreàtiques, les quals hidrolitzen triacilglicèrids, èsters de colesterol i altres nutrients. La presència de la matèria grassa ingerida estimula les

¹⁴ La matriu extracel·lular és un producte de secreció de les cèl·lules que s'acumula més enllà de la membrana plasmàtica.

¹⁵ Capacitat que té un compost químic de dissoldre's en greixos, olis, lípids, i solvents no polars.

¹⁶ Acció de mesclar-se dos líquids immiscibles de manera més o menys homogènia.

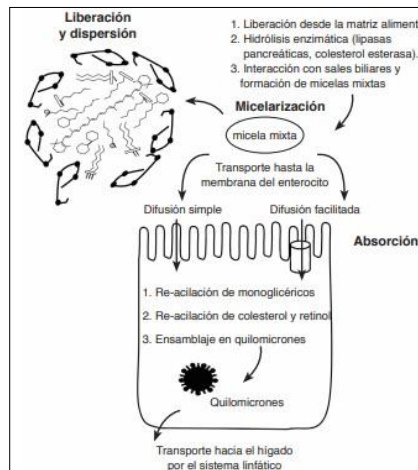
¹⁷ Les micel·les són les úniques membranes cel·lulars que estan formades per una sola capa lipídica. Un extrem dels àcids grassos que la formen és hidrofòbic (es repel·leix amb l'aigua) mentre que l'altre extrem és hidròfil (no es repel·leix amb l'aigua).

secrecions biliars i els nivells de lipases pancreàtiques, per tant, es creen més micel·les i augmenta la biodisponibilitat de carotenoides.

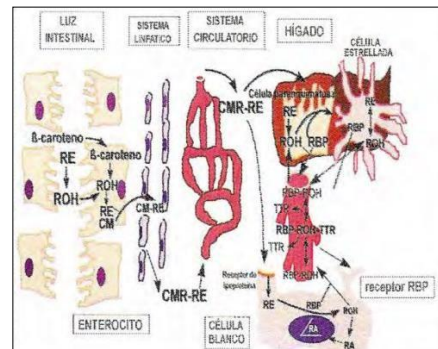
El següent pas es porta a terme quan les micel·les entren en contacte amb l'epiteli intestinal, un teixit que actua com a filtre selectiu de nutrients. Els carotenoides són absorbits per difusió facilitada¹⁸, és a dir, que hi ha receptors concrets responsables de l'absorció de carotenoides, altrament coneguts amb el nom de transportadors. Un clar exemple n'és la glicoproteïna transmembrana anomenada SR-BI (Scavenger Receptor class B type I). Una vegada ja s'ha finalitzat la difusió i el material lipídic ha estat interioritzat per les cèl·lules, s'empaqueta en lipoproteïnes anomenades quilomicrons. Aquests quilomicrons tenen el seu origen a l'Aparell de Golgi i s'excreten al sistema limfàtic per dirigir-se al fetge. Abans de que arribin en aquest òrgan, alliberen carotenoides i altres substàncies lipídiques a causa de l'activitat de la lipoproteïna lipasa. Aquestes partícules alliberades són absorbides pel teixit endotelial. No obstant, la major part dels carotenoides arriben al fetge a on s'empaqueten en lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) i, seguidament, es torna a excretar al sistema circulatori per ser dipositades en diferents teixits. Les VLDL, durant la seva circulació, es converteixen en LDL i, posteriorment, en lipoproteïnes d'alta densitat (HDL).

Els carotenoides apolars com el beta-carotè, experimenten un menor intercanvi amb altres proteïnes. Per això les LDL augmenten el seu contingut de carotenoides apolars i les HDL de carotenoides més polars com les xantofil·les. Aquest aspecte té una real importància a l'hora d'entendre perquè alguns teixits tenen preferència al dipòsit de carotens o xantofil·les. Tot depèn de la seva densitat de receptors per LDL o HDL.

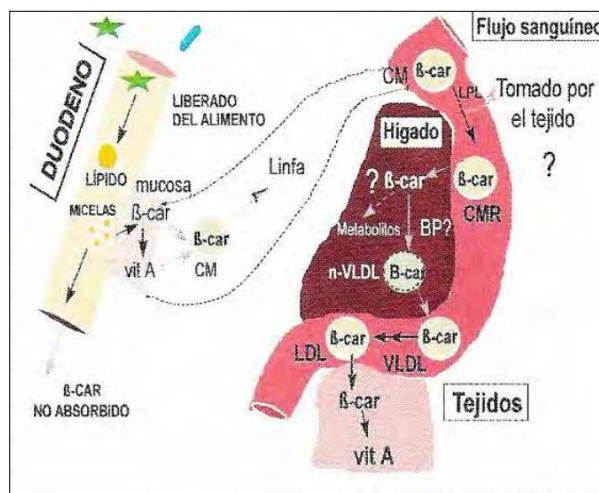
¹⁸ Procés de difusió o forma de transport passiu facilitada per proteïnes de transport.



Il·lustració 23. Procés d'absorció de carotenoides



Il·lustració 24. Metabolisme del beta-carotè i la seva activitat provitamina A



Il·lustració 25. Absorció i transport del beta-carotè

4.3. El beta-carotè i la vitamina A

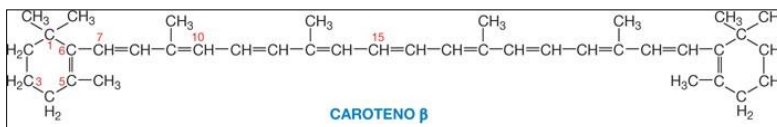
La paraula beta-carotè prové del mot llatí de la pastanaga, *Daucus carota*. Això és degut a que l'any 1831, Wackenroder, va aïllar el beta-carotè per primera vegada, de forma cristal·lina, a partir d'una pastanaga. D'aquesta manera va ser el primer carotenoide en ser purificat. El beta-carotè està present en fruites, verdures, gra i en alguns aliments animals. No obstant, també es pot fabricar artificialment al laboratori.

És un dels pocs carotenoides que té valor com a vitamina A. El seu valor vitamínic es troba al voltant d'una sisena part del valor del retinol, el qual és la forma metabòlica activa de

la vitamina A. Tot i així, el beta-carotè representa al voltant d'un 30% de la ingesta total de vitamina A d'una persona. Per tant, té un paper molt important en la dieta humana.

4.3.1. Propietats químiques del beta-carotè

La seva estructura química consta de 11 enllaços dobles conjugats, tots en configuració trans i formant dos anells, un a cada extrem.



Il·lustració 26. Estructura química del beta-carotè

Actualment, el beta-carotè té un rol rellevant dins el món dels colorants alimentaris. Una de les seves principals aplicacions és la decoloració de begudes i refrescos. No obstant, no és de fàcil ús ja que és insoluble en aigua i, per tant, s'ha d'esmicolar fins a aconseguir una pols extremadament fina. D'aquesta manera i amb l'ajuda d'un polisacàrid com la goma aràbiga, es pot dispersar per l'aigua. A més a més, durant el procés d'embotellament, igual que la resta de carotenoides, pot sofrir isomeritzacions. Sobretot, acostumen a formar-se els isòmers 9-cis i el 13-cis. Això comporta una pèrdua del valor com a vitamina A del beta-carotè. El valor vitamínic del beta-carotè quan es troba en forma isomètrica, es redueix a la meitat respecte el valor que posseeix en la seva forma natural, totalment trans. Tot i així, aquesta pèrdua queda compensada per la major biodisponibilitat i fàcil digestió del beta-carotè ja que quan es produeix la isomerització també es produeix la desnaturalització¹⁹ d'algunes proteïnes a les que es troba unit.

4.3.2. El beta-carotè en la dieta humana: beneficis i inconvenients

El beta-carotè és la principal font de vitamina A. És un gran antioxidant que protegeix el cos humà de l'oxidació cel·lular²⁰. A més a més, estimula la funció immunològica,

¹⁹ Canvi estructural de les proteïnes o àcids nucleics, on perden la seva estructura terciària i estructura secundària, per haver aplicat una força externa.

²⁰ L'oxidació cel·lular es dona per culpa de l'oxigen ja que és el responsable de la degeneració progressiva de les cèl·lules i de les modificacions orgàniques i funcionals que es produeixen en elles.

augmentant el número de glòbuls blancs i l'activitat de les cèl·lules naturals killers²¹. Alguns d'aquests efectes immunològics deriven de la quantitat de beta-carotè que no s'ha convertit en vitamina A. Una de les funcions més importants del beta-carotè en el cos humà és que facilita la comunicació cel·lular ja que estimula la síntesis de les proteïnes que formen la membrana de les cèl·lules. És un fitoquímic ²²anticancerigen que, a més a més, de prevenir el càncer de mama, d'ovaris, d'úter, d'estómac, d'intestí i de pell, també prevé malalties relacionades amb el sistema respiratori i redueix el dany causat per la radioteràpia. El beta-carotè es coneix sobretot per ajudar a alentir el desenvolupament d'una degeneració ocular associada a l'edat i a les cataractes, així com a la protecció de la pell.

El beta-carotè realitza diverses funcions favorables per l'organisme humà però per si sol no és un nutrient essencial, en canvi la vitamina A sí i, com s'ha dit anteriorment, aquest carotenoide és la principal font de vitamina A. Pel fet de que el cos humà no és capaç de sintetitzar aquesta vitamina, és important mantenir una dieta rica en aliments que continguin beta-carotè com, per exemple, albercocs, pastanagues, meló Vedrantaís, mango, alguns animals, etc. Fins i tot, existeixen suplementes alimentaris de beta-carotè. Cal dir que la seva consumició està totalment desaconsellada ja que quan s'aïlla un fitoquímic com si es tractés d'una substància única i aïllada, aquesta pot descompondre l'equilibri natural dels antioxidants. D'aquesta manera, en compte d'efectes beneficiosos, s'obtidria un resultat perjudicial per la salut. Prendre dosis altes de suplementes de beta-carotè podria augmentar el risc de patir càncer i la probabilitat de mort.

4.4. El meló

4.4.1. Procedència i propietats nutricionals

El meló és el fruit de la melonera, una planta que pertany a la família de les Cucurbitàcies, la qual inclou unes 850 espècies de plantes amb flor que acostumen a produir fruits grans com la carbassa, el meló i la síndria, entre d'altres. Dins d'aquesta família s'hi troben uns 118 gèneres. Els més coneguts són el *Cucurbita* (la carabassa), el *Citrullus* (la síndria), el *Cucumis* (el meló i el cogombre) i el *Momordica* (cogombre tropical).

²¹ Tipus de limfòcits citotòxics crítics per al sistema immune innat.

²² Compost químic produït per les plantes.

La melonera, altrament anomenada *Cucumis Melo*, necessita un mínim de 15 graus per a germinar. És fàcil de distingir ja que les tiges creixen de forma paral·lela a la superfície terrestre i, per tant, els fruits creixen arran de terra i les seves flors són solitàries i posseeixen una corol·la groga. La maduresa del fruit és difícil d'apreciar en la majoria de varietats de meló ja que no es desprèn del peduncle (tija que uneix el fruit amb l'esquelet de la planta i s'encarrega de fer arribar la saba a les flors) una vegada ja és comestible, a excepció de la varietat francesa Cantaloup. El 80% de la composició del fruit de la melonera és aigua i posseeix un contingut moderat de sucres, la qual cosa significa que aporta una quantitat escassa de calories a la dieta humana. El meló a més a més d'aigua i sucres conté beta-carotè. La quantitat de beta-carotè en cada meló varia i és perceptible a simple vista ja que aquesta depèn de la intensitat del pigment ataronjat de la polpa. El beta-carotè, una vegada ha estat ingerit, es transforma en vitamina A dins el cos humà, conforme aquest el necessita. Aquesta vitamina té un efecte antioxidant, intervé en la formació dels ossos i les dents i és necessàries pel bon funcionament del sistema immunològic, entre d'altres funcions. El meló també aporta vitamina C i els minerals que conté en major quantitat són el magnesi, el calci i el potassi, el qual és necessari per la transmissió de l'impuls nerviós, l'activitat muscular normal i la regulació per osmosi en les cèl·lules.

4.4.2. Origen i desenvolupament històric

L'origen dels melons no és del tot precís ja que alguns autors el situen al continent africà i d'altres a l'Àsia central. El que sí es pot confirmar és que s'ha descobert la presència de representacions gràfiques d'aquest fruit en tombes egípcies datades de l'any 2400 a.C..

Durant l'Edat Antiga, la població creu que és una fruita tan beneficiosa per a l'ésser humà com ho és el Sol i es coneix com a l'obra mestra d'Apolo. En el segle III els manuals d'horticultura comencen a donar lliçons sobre el seu mètode de cultiu i, ja a finals del segle XV, el meló arriba a França i comença a ser consumit en enormes quantitats per les persones privilegiades de la cort. Cristòbal Colón és qui l'introdueix a Amèrica. Aleshores, la seva mida és similar a la d'una taronja però al llarg dels segles augmenta tant en mida com en varietats. Actualment n'existeixen més de 800 varietats en tot el món, les quals es classifiquen en cinc grans grups: melons verds (Pell de Gripau, Rochel, Tendral, Villaconejos), Cantaloups (Vedrantais), melons grocs (Groc Rugós, Groc rodó Llis), Gàlia i Charentais.

4.4.3. Varietats de meló: Pell de Gripau i Vedrantaís

Com s'ha dit en anteriorment, la quantitat de beta-carotè és diferent en cada varietat de meló i es pot percebre a través del color ataronjat de la seva polpa. Per tal d'estudiar la contenció de carotenoides i localitzar el gen responsable del color taronja, s'haurien d'utilitzar dues varietats diferents de meló: Pell de Gripau (meló verd) que té la polpa blanca i és originari d'Espanya, i Vedrantaís (Cantaloup), el qual té la polpa de color taronja i prové de França. Ambdues varietats tenen propietats similars però no idèntiques. A continuació podem observar i comparar les característiques de cadascuna:

PELL DE GRIPAU	VEDRANTAIS
Temps de maduració llarg i insert: el fruit no es desprèn del peduncle que l'uneix a la melonera quan ja és comestible	Temps de maduració curt i visible: el fruit es desprèn del peduncle quan ja està madur i comestible
Aroma suau	Aroma fort
Polpa blanca	Polpa taronja
Baix contingut de carotenoides	Alt contingut de carotenoides
Llarga vida del fruit: aquesta varietat de meló pot estar emmagatzemada durant setmanes sense fer-se malbé	Curta vida del fruit: aquesta varietat de meló no es pot emmagatzemar durant un llarg període de temps, com a màxim una setmana
Dolç	Molt dolç
Polpa molt densa i dura	Polpa densa
Conté les vitamines B6, B1, C, àcid fòlic i pro-vitamina A en molt baixa quantitat	Conté les vitamines B6, B1, àcid fòlic i molta pro-vitamina A i C.

Taula 1. Diferències entre meló Vedrantaís i Pell de Gripau

Com es pot observar, el meló Vedrantaís conté una quantitat molt més elevada de carotenoides (pro-vitamina A) que el meló Pell de Gripau. Per aquest motiu un té la polpa taronja i l'altre de color blanc. Malauradament, la dolçor del Pell de Gripau és preferible per a la majoria de persones i el fet de que es pugui emmagatzemar durant més temps té com a conseqüència que aquesta varietat de meló sigui la més venuda al nostre País. La gran part de la població no és conscient de l'aportació nutricional que correspon a cadascuna de les dues varietats de meló i, per aquest motiu, consumeixen segons el gust que més els agrada.

4.4.4. Els melons i el descobriment del gen responsable del color taronja propi de molts vegetals

El fet de que una varietat de meló contingui una gran quantitat de carotenoides i l'altra no, és realment útil a l'hora d'estudiar, trobar i modificar el gen que provoca l'acumulació de beta-carotè en les plantes o, dit d'una altra manera, el seu particular color taronja.

Els colors (taronja i blanc) que diferencien una varietat de meló de l'altra són la clau de l'experiment portat a terme a la part pràctica del treball ja que permeten experimentar i comparar els respectius fenotips²³ i genotips²⁴. Els diferents fenotips dels melons (color) són els que fan que l'espècie del meló sigui una espècie prioritària, davant d'altres espècies vegetals que també contenen carotenoides com la pastanaga o la carabassa, a l'hora de realitzar l'experiment de descobrir quin és el gen responsable del color taronja d'alguns vegetals. Això és degut a que la gran majoria de pastanagues i carabasses comercialitzades són de color taronja i no permeten comparar els fenotips (tots són iguals) i relacionar-los amb els respectius genotips (tots són iguals). Per tal de localitzar el gen responsable del color taronja, és necessària l'existència d'una espècie, de la qual en formin part individus de color taronja i individus d'un color que no sigui taronja, com és el cas del meló, ja que d'aquesta manera posseeixen fenotips i genotips diferents (presenten mutacions en el genoma).

Per entendre millor l'experiment i quina relació es troba entre el genotip i el fenotip dels melons, primerament cal especificar que el genoma de les dues varietats de melons (Vedrantais i Pell de Gripau) són gairebé idèntics. No obstant, si es comparen, s'observa que en algunes zones d'alguns cromosomes dels seus mapes genètics, hi ha mutacions (la majoria de vegades és una única base nitrogenada). Com que els nostres ulls són capaços de distingir que un meló posseeix una polpa blanca i l'altra taronja, se sap que el gen responsable del color de la polpa ha de ser diferent en un genoma respecte en l'altre (hi ha d'haver una mutació en aquest gen responsable del color de la polpa).

²³ El fenotip és l'expressió del genotip modulada per la interacció amb el medi, és a dir, l'aparença externa d'un caràcter genètic.

²⁴ El genotip és el conjunt de gens d'un individu.

4.4.4.1. *Els melons, l'estudi del gen responsable del color taronja dels vegetals i els encreuaments artificials*

Els encreuaments artificials entre les dues classes de melons (Pell de Gripau i Vedrantaís) juguen un paper molt important a l'hora de localitzar el gen. De fet, es pot dir que són la base de la recerca que s'explica a la part pràctica del treball ja que són útils per aconseguir varietats de meló homozigots. No obstant, el procés d'encreuaments artificial és molt laboriós i demana molta dedicació i temps ja que consta de diversos passos.

En primer lloc, abans de realitzar cap encreuament, cal comparar la seqüenciació genòmica d'un Pell de Gripau homozigot amb la d'un meló Vedrantaís, també homozigot. En segon llocs, mitjançant l'ajuda de marcadors moleculars, cal marcar a on es troben les mutacions de les seqüenciacions genètiques. Aquestes mutacions genètiques són les que permeten diferenciar una varietat de l'altra a simple vista, és a dir, són les causants de que els dos fenotips no siguin idèntics (el color de la polpa, la dolçor, el temps d'emmagatzematge, etc). En tercer lloc, s'inicien els encreuaments. Primerament, s'encreua un Pell de Gripau i un Vedrantaís (homozigots) i s'obté un híbrid. Aquest híbrid té el 50% del genoma d'una varietat de meló i l'altre 50% provinent de l'altra varietat. Una vegada s'ha aconseguit l'híbrid, s'encreua amb un Pell de Gripau. Aquesta nova generació s'anomena F2 i conté més informació hereditària del Pell de Gripau que del Vedrantaís. Després aquest individu F2 s'encreua un altre cop amb un meló Pell de Gripau per aconseguir la generació F3, la qual, encara posseeix més informació genètica del Pell de Gripau que de Vedrantaís, en comparació amb la F2. Llavors, la F3 s'encreua amb un altre Pell de Gripau i així successivament fins a aconseguir la F7. El fet de realitzar un gran nombre de *backcrosses* amb el meló Pell de Gripau és degut a que per cercar el gen responsable del color taronja (provinent del Vedrantaís) és més simple i ràpid ja que, a mesura que es va repetint l'encreuament del meló obtingut amb un Pell de Gripau homozigot, el genoma es va modificant i va adquirint més informació genètica de Pell de Gripau i menys del Vedrantaís. Una vegada s'arriba a la generació 7 (F7) s'obté un meló que consta d'un 95%, aproximadament, d'informació genètica del Pell de Gripau i un màxim d'un 5% del Vedrantaís. Un cop finalitzats els *backcrosses*, cal autopol·linitzar set o vuit vegades el meló obtingut en la F7 per tal d'aconseguir un meló homozigot ja que fins ara s'havia estat treballant amb un meló heterozigot.

Cal tenir present que, com en qualsevol altre experiment, és necessari realitzar l'estudi amb un mínim de 100 melons per tal de que els resultats obtinguts al final siguin creïbles. Per tant, és indispensable repetir el procediment explicat anteriorment (encreuaments) un mínim de 100 vegades i, aleshores, s'aconsegueix un centenar de melons amb característiques i propietats diferents. No obstant, tots ells provenen d'un mateix híbrid (50% Pell de Gripau i 50% Vedrantaïs) i, per això, la major part dels gens dels seus genomes són idèntics.

Una vegada s'obtenen els 100 melons, es comparen els seus fenotips i els seus genotips entre ells i amb els dels pares (Pell de Gripau i Vedrantaïs). Mitjançant la informació que proporcionen els fenotips i els genotips és possible portar a terme la recerca del gen causant del color taronja de la polpa del meló. Per exemple, si un meló F7 és taronja (fenotip) i té una mutació (genotip) en la mateixa zona que el Vedrantaïs (una mutació respecte el Pell de Gripau), possiblement aquest gen mutat és el responsable del color taronja de la polpa del meló.

Una vegada finalitzada la recerca del gen, el color de la polpa del meló també permet validar el gen trobat i assegurar que és el que realment es volia trobar (aquets gen s'anomena gen candidat). Mitjançant la tècnica CRISPR, s'aconsegueix tallar el gen candidat. Si l'experiment és vàlid, quan el meló alterat genèticament (se li ha tallat el gen candidat) s'autopol·linitzi novament, els descendents ja no són de color taronja perquè el gen que aporta el color taronja ha estat tallat i ja no és transmès genèticament de progenitors a fills. Per tant, els nous individus ja no posseeixen un alt contingut de beta-carotè. En conclusió, si quan es talla el gen candidat, el meló descendent continua tenint la polpa de color taronja, l'experiment no és vàlid i el gen que ens es pensava que era el responsable del color taronja queda demostrat que no ho és.

4.4.4.2. *Importància de la mutació del gen*

A l'hora de realitzar l'experiment que s'explica a la part pràctica del treball, s'ha de tenir en compte el genoma del meló. Tots els melons, siguin de la varietat que siguin, posseeixen 12 cromosomes i 27000 gens, els quals, són els mateixos. En el cas estudiat anteriorment, tant el meló Pell de Gripau com el Vedrantaïs tenen el gen responsable del color taronja en el seu ADN. L'única petita diferència és que una de les bases nitrogenades que formen part de la seqüència de l'exó del gen, és diferent en Vedrantaïs respecte a Pell de Gripau.

Aquesta diminuta però significant mutació gènica provoca que la proteïna per la qual sintetitza aquest gen sigui funcional en Vedrantaís i no ho sigui en Pell de Gripau.

4.4.4.3. L'epístasi del meló

Un altre aspecte a tenir en compte a l'hora d'estudiar el gen que proporciona el color taronja a la polpa del meló és que la coloració de la polpa no depèn d'un únic gen sinó que depèn de dos gens. Els dos gens es troben sota una epístasi simple dominant, és a dir, que l'expressió d'un dels gens (anomenat recessiu o hipostàtic) depèn de l'expressió de l'altre gen (anomenat dominant o epistàtic) . Cada gen consta de dos al·lells (un dominant i un recessiu) ja que si es parla del meló es fa referència a un individu diploide. No obstant, els melons utilitzats en l'experiment són completament homozigots, per tant, els dos al·lells del gen han de ser dominants o, bé, tots dos recessius. Mai pot constar d'un al·lel dominant i un de recessiu ja que aleshores es parlaria d'un meló heterozigot.

El gen dominant és el responsable del color taronja mentre que el gen recessiu ho és del color blanc o verd. Per tant, si el gen dominant (taronja) té els dos al·lells dominants, el gen recessiu (blanc o verd) no s'expressarà en el fenotip, tot i que estigui format pels dos al·lells dominants. Aleshores, la polpa del meló serà de color taronja. En el cas contrari, si el gen dominant (taronja) consta de dos al·lells recessius, serà el gen recessiu el que s'expressarà en el fenotip. Si es dona aquesta situació, hi ha dues possibilitats: la primera és que la polpa del meló obtingut sigui de color blanc (al·lel dominant del gen recessiu) o, bé, de que la polpa sigui verda (al·lel recessiu del gen recessiu). Per tant, l'al·lel recessiu del gen recessiu (verd) s'expressa abans que l'al·lel recessiu del gen dominant, el qual no s'expressa mai (aquest al·lel indica que el meló segur que no serà taronja).

GEN A: TARONJA

Homozigot dominant	AA	Or/Or	}	Taronja
Heterozigot	Aa	Or/or		
Homozigot recessiu	aa	or/or	}	No Taronja

GEN B: BLANC/VERD

Homozigot dominant	BB	G/G	}	Blanc
Heterozigot	Bb	G/g		
Homozigot recessiu	bb	g/g	}	Verd

GENOTIPS I FENOTIPS DE LES DIFERENTS VARIETATS:

Vedrants (polpa taronja): AAbb o AABB ((Or/Or/g/g) o (Or/Or/G/G))

Pell de Gripau (polpa blanca): aaBB (or/or/G/G)

Meló amb polpa verda: aabb (or/or/g/g)

4.4.4.4. *Melons homozigots*

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, els melons són organismes diploides (consten de parelles de cromosomes homòlegs, que tenen la mateixa disposició de seqüència d'ADN). A més a més, també se sap que els melons utilitzats, a l'hora de realitzar els experiments de la part pràctica del present treball de recerca, han estat prèviament autopol·linitzats, per tant, no consten d'un al·lel recessiu i un de dominant. En tots els casos estan formats per dos al·lels recessius o, bé, dos de dominants. Si a aquest coneixement se li afegeix el fet de que el color de la polpa del meló depèn de dos gens (un de dominant responsable del color taronja i un de recessiu responsable dels colors blancs i verd) que es troben sota una epístasis dominant, es pot saber la proporció de melons que probablement s'obtidrà realitzant els encreuaments explicats anteriorment:

	AB	Ab	aB	Ab
AB	AABB: taronja	AABb: taronja	AaBB: taronja	AaBb: taronja
Ab	AABb: taronja	AAbb: taronja	AaBb: taronja	Aabb: taronja
aB	AaBB: taronja	AaBb: taronja	aaBB: blanc	aaBb: blanc
Ab	AaBb: taronja	Aabb: taronja	aaBb: blanc	aabb: verd

Taula 2. Genotips i fenotips dels melons

Aquesta taula mostra que la proporció dels fenotips dels melons obtinguts en l'experiment és:

2:1:1

Aquesta proporció és deguda a que el gen dominant és el responsable del color taronja i s'expressa en el fenotip abans que el gen recessiu.

PART PRÀCTICA

1. EN QUÈ CONSISTEIX L'EXPERIMENT?

Gràcies al programa internacional Barcelona International Youht Science Challenge 2019 (BIYSC), organitzat per la Fundació la Pedrera, aquest estiu s'ha tingut la gran oportunitat de treballar sota la supervisió d'investigadors del Centre de Recerca per a l'Agricultura Genètica (CRAG), localitzat a la UAB, durant un període de dues setmanes.

La 4a edició del *Barcelona International Youth Science Challenge* (BIYSC) ha tingut lloc a Barcelona i ha involucrat la participació de més de 100 estudiants, provinents de 45 països diferents, d'entre 16 i 18 anys. El programa ha estat fundat amb l'objectiu d'estimular el talent científic entre els alumnes de batxillerat i encoratjar el seu entusiasme per dedicar-se a la recerca científica i als graus universitaris de l'àmbit científic. Aquest 2019, el BIYSC ha comptat amb la participació de 12 centres d'investigació catalana, entre ells, el Centre de Recerca per l'Agricultura Genètica (CRAG). Els investigadors del CRAG es dediquen a la recerca capdavantera de les bases moleculars de caràcters genètics d'interès en plantes i animals de granja, així com en les aplicacions dels enfocaments moleculars per a la cria d'espècies importants per a l'agricultura i la producció d'aliments.

En aquest repte, s'ha tingut l'oportunitat d'aprofundir en la millora genètica de les plantes, estudiant l'ADN d'espècies hortícoles, concretament el meló, i utilitzant tècniques de biologia, genòmica i bioinformàtica, així com tecnologies per a l'edició genòmica (CRISPR). S'ha treballat als laboratoris del CRAG, juntament amb els investigadors de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) Ana Montserrat Martín-Hernández, Marta Pujol, Marta Riera i Irma Roig, i el personal investigador del CRAG Andrea Giordano, Carlos Mayobre, Núria Real i Miguel Santo Domingo.

L'experiment que s'ha portat a terme, ja havia estat realitzat i validat prèviament pels mateixos investigadors que han estat supervisant la nostra recerca al laboratori. No obstant, el resultat final no ha estat explicat pels investigadors en cap moment durant la recerca sinó que s'ha arribat a la conclusió idònia després de dues setmanes intenses d'experimentació. D'altra banda, cal dir que actualment la recerca continua portant-se a terme als laboratoris d'IRTA, per un grup d'investigadors.

La recerca científica en qüestió consisteix en localitzar el gen responsable del color taronja de la polpa del meló Vedrantaís. El color ataronjat és degut a una acumulació de pigments anomenats carotenoides. Aquests pigments actuen com a pro-vitamina A i, per tant, provoquen que el meló Vedrantaís posseeixi uns valors nutricionals més rics que els del meló Pell de Gripau, la polpa del qual és de color blanc. No obstant, el meló Pell de Gripau consta d'una dolçor i d'un temps d'emmagatzematge preferibles als de Vedrantaís, pels productors i consumidors. Per aquest motiu és el més venut al nostre país. La pregunta clau és què passaria si s'aconsegüís obtenir una varietat de meló amb un alt nombre de carotenoides pro-vitamina A i amb la resta de propietats idèntiques a les del meló Pell de Gripau? Actualment, aquesta varietat és considerada el meló d'elit i encara és inexistent. Mitjançant encreuaments entre melons Pell de Gripau i Vedrantaís, aquest experiment pretén localitzar el gen responsable del color taronja i obtenir les dades necessàries per la posterior obtenció del meló d'elit, el qual no és considerat un organisme genèticament modificat (GMO).

Per tal de que els resultats obtinguts es puguin validar, és necessari portar a terme la recerca del gen responsable del color taronja de la polpa del meló, amb una població d'un mínim de 100 melons. A més a més de fenotipificar el centenar de melons, és estrictament necessari l'estudi de tots els cromosomes que formen part dels respectius genomes. Aquest estudi i el mapa genètic, el qual es construeix després de genotipificar els melons, només són possibles d'aconseguir si s'empren i es flanquegen un mínim de 240 marcadors moleculars (20 a cada cromosoma). Per aquest precís motiu, és impossible finalitzar la recerca en un període de temps de dues setmanes ja que es necessiten anys d'experimentació al laboratori per trobar el gen. No obstant, per fer-ne possible la seva realització, els investigadors del centre CRAG, han facilitat un seguit de dades. A més a més, sense la seva col·laboració tampoc hauria estat possible la realització dels experiments ja que és necessari disposar de màquines i utensilis de laboratori esterilitzats, així com, també, d'una campana de fum i d'una sala destinada únicament a la manipulació d'organismes genèticament modificats.

En primer lloc, cal saber que els melons utilitzats (mostres) en la nostra recerca, han estat pol·linitzats i encreuats diverses vegades amb la varietat Pell de Gripau, pels mateixos investigadors ja que per tal d'obtenir els melons idonis per la recerca del gen, cal fer un mínim de 7 creuaments amb cadascun d'ells (el temps d'espera entre un creuament i el següent, és el temps de maduració de cada meló, el qual sol aproximar-se a un període de

sis mesos, en total, uns tres anys i mig). En segon lloc, la tasca que més han facilitat els investigadors per la nostra recerca i que ha permès realitzar l'estudi i aconseguir trobar el gen candidat, ha estat la selecció de 10 dels 100 melons utilitzats en el seu propi experiment, previ a la nostra recerca. Aquests 10 melons han estat seleccionats mitjançant l'ajuda dels marcadors moleculars ja que, tal i com es podrà observar a continuació, alguns d'aquests melons posseeixen la polpa de color taronja i d'altres no (la diversitat dels melons escollits està seleccionada expressament). Finalment, la fase de genotipificar (l'estudi dels marcadors moleculars en cadascun dels cromosomes), també ha estat modificada pels investigadors respecte l'experiment que va estar portat a terme per ells. Amb un període de temps de dues setmanes és impossible estudiar 240 marcadors moleculars i comparar-los amb els respectius fenotips de cada meló. Per aquest precís motiu, l'experiment en qüestió, només treballa amb marcadors moleculars flanquejats als gens dels cromosomes 8 i 9 (els investigadors van descobrir prèviament que el gen responsable del color taronja es troba en una regió indeterminada d'un d'aquests dos cromosomes, la qual es determina en la nostra recerca). D'aquesta manera, i adaptant l'experiment segons el temps del qual es disposa, la recerca del gen és possible de portar a terme amb un període de quinze dies.

El centenar de melons emprats en l'experiment, provenen de l'encreuament entre un meló de la varietat Pell de Gripau i un de Vedrantaís (les dues línies parentals han de ser totalment homozigots). Una vegada obtingut el centenar de melons en les condicions òptimes [veure apartat 4.4.4.1. Els melons, l'estudi del gen responsable del color taronja dels vegetals i els encreuaments artificials], és necessari estudiar el fenotip i el genotip de cada un dels individus. Per estudiar el fenotip és essencial recol·lectar el fruit i estudiar-ne l'aroma, el sucre, el color, la forma, el pes, la mida, entre d'altres paràmetres. En canvi, per tal d'estudiar el genotip i poder crear un mapa genètic de cada individu, és necessària l'extracció del DNA de la melonera. Per tal d'aconseguir una extracció eficient cal recol·lectar una altra part de la melonera: les fulles més petites i joves de la part superior de la planta. Aquest fet té una simple explicació, i és que aquestes fulles contenen una baixa quantitat de sucres i altres substàncies que no interessen a l'hora d'extreure el DNA, en comparació amb les arrels, la tija o el fruit de la melonera. A continuació, mitjançant el DNA extret i obtingut òptimament, i els marcadors moleculars, es crea el mapa genètic de cada individu, en el qual es veuen les seqüències genètiques. Amb l'ajuda d'un programa informàtic, es marquen les mutacions que existeixen entre les diferents línies de melons. És aleshores quan entra en joc de nou el fenotip. Es comparen els fenotips i els genotips dels diferents melons estudiats (incloent els de les dues línies parentals) i s'arriba a la troballa d'un gen candidat. En últim lloc, és estrictament necessari validar el gen candidat abans de fer públics

els resultats. Per tal de validar-ne la seva funció s'utilitza la tècnica recentment nova del CRISPR, avui dia molt utilitzada per a la creació de plantes transgèniques d'una forma específica i controlada.

La recerca del gen permet la posterior creació d'aliments transgènics (GMO). Una vegada localitzat el gen dins el genoma del meló, el pròxim graó consisteix en extreure el gen i introduir-lo en aliments vegetals que no contenen carotenoides, més específicament, que no contenen beta-carotè. No obstant, l'experiment portat a terme té com a finalitat, com s'ha dit anteriorment, obtenir el meló d'elit, el qual no es considera un aliment transgènic, gràcies a la seva creació a partir d'encreuaments artificials.

En conclusió, la recerca científica que es presenta a continuació pretén localitzar en quina regió dels cromosomes 8 i 9 del genoma del meló resideix el gen responsable del color taronja de la polpa dels melons i, per aconseguir-ho, consta de cinc fases diferents. En primer lloc, la plantació, la germinació i la pol·linització de les llavors de meló homozigots; en segon lloc, la recol·lecta del fruit i de les fulles a La Torre Marimon; en tercer, la fenotipificació; en quart lloc, la genotipificació i, en darrera posició, la resolució final de la recerca.

2. OBJECTIUS

L'objectiu principal de l'experiment consisteix en localitzar, en el genoma del meló, el gen responsable del color taronja i de l'acumulació de beta-carotè en els vegetals. A arrel d'aquest objectiu en sorgeix un de secundari, considerat una aplicació del primer: obtenir una nova varietat de meló considerada el meló d'Elit, la qual posseeix tota la base genètica de la varietat Pell de Gripau, a excepció del gen responsable del color taronja provinent del meló Vedrantaís.

No obstant, per tal d'aconseguir l'objectiu final, és necessari complir altres objectius, igual o més importants, en cada una de les cinc fases de l'experiment. Aquests objectius més específics estan estretament relacionats amb el fet d'entendre les bases de la variabilitat genètica, preveure el fenotip mitjançant la utilització de marcadors moleculars i identificar gens candidats per a importants caràcters vegetals.

Enmig de l'explicació detallada de cadascuna de les 5 fases o petits experiments de l'experimentat general es troben redactats acuradament cadascun d'aquests objectius específics de cada etapa. Un dels més rellevants, però, cal esmentar-lo i es basa en entendre en què consisteix la millora vegetal, coneguda popularment com a "plant breeding".

3. PROCÉS

3.1. Fase 1: Plantació, germinació i pol·linització de les llavors homozigots

Abans de portar a terme un experiment, sempre és necessària la preparació del material que s'utilitzarà. L'experiment realitzat té com a mostres bàsiques i essencials 12 melons. Entre aquests 12 melons, s'hi troben 2 progenitors. La resta provenen de l'encreuament entre ells.

El primer pas a executar és la plantació de les llavors homozigots de les dues línies parentals, una de la varietat Pell de Gripau i l'altra de la varietat Vedrantaís. Les llavors han de ser col·locades en plaques de petri, la qual cosa les permet germinar. Per tal de germinar, les llavors necessiten trobar-se en les condicions òptimes. La llum, la humitat, la temperatura i l'estrès provinent de patògens, el qual s'ha d'evitar, en són factors clau. Una vegada les llavors han germinat, cal plantar-les en torratxes, les quals continguin terra amb els nutrients necessaris pel creixement de les plantes. Cada planta necessita ser distingida de la resta per saber de quina de les dues línies parentals forma part i ha de ser regada amb aigua periòdicament. Una vegada adquireix una mida considerable, la planta és traslladada als hivernacles. Allí, es fan créixer de manera vertical ja que d'aquesta forma ocupen menys terreny i se'n poden conrear més. Aquest fet pot semblar estrany ja que a la natura les arrels de la melonera creixen expandint-se sobre la superfície terrestre.

La resta de melons utilitzats per portar a terme l'experiment, s'obtenen a partir de pol·linització artificialment, fecundant l'òvul d'una flor de la varietat Pell de Gripau amb el pol·len provinent de l'androceu ²⁵ d'una flor de la varietat Vedrantaís.

OBJECTIUS:

1. Aprendre com fer germinar plantes i evitar contaminacions
2. Familiaritzar-se amb el material emprat en els hivernacles i el protocol per a obtenir plantes de mida considerable
3. Conèixer els requisits específics necessaris per fer créixer meloneres
4. Aprendre a calcular el percentatge de llavors germinades

²⁵ Conjunt d'estams, que són els òrgans reproductors de la flor que generen les gàmetes mòbils

GERMINACIÓ: MATERIAL I MÈTODE**MATERIAL:**

- Plaques de Petri
- Paper de filtre
- Tisores
- Colador
- Merpan (solució)
- Guants de laboratori
- Bata de laboratori
- Bossa de llavors Pell de Gripau
- Bossa de llavors Vedrantaís

MÈTODE (al laboratori):

1. En primer lloc s'agafen 20 llavors de dins d'una de les dues bosses i es col·loquen acuradament dins la placa de Petri.



Il·lustració 27. Placa de Petri que conté 20 llavors de la varietat de meló Vedrantaís. (Fotografia pròpia)

2. A continuació, es cobreixen les llavors amb la solució de Merpan i es deixa reposar durant tres minuts. Aquesta solució ajuda a evitar patògens com els fongs, els virus i els bacteris.
3. Passats els tres minuts, s'aboca la placa de Petri dins el colador, deixant caure la solució amb les llavors. El colador retén solament les llavors.
4. El següent pas consisteix en netejar les llavors deixant caure un raig d'aigua dins el colador.
5. Per últim, cal preparar la placa de Petri de manera que les llavors es mantinguin a una humitat d'entre un 75% i un 90%. Per aconseguir-ho es mullen dos papers de filtre, els quals es col·loquen un a cada tapa de la placa de Petri.

6. Aleshores ja només falta col·locar les llavors separatament les unes de les altres i tancar la placa de Petri, la qual es deixa reposar quatre dies sobre una taula del laboratori.

Observació: cal seguir el mateix mètode per ambdós varietats de llavors.

PLANTACIÓ A L'HIVERNACLE DE LES LLAVORS GERMINADES: MATERIAL I MÈTODE

MATERIAL:

- Plaques de Petri amb les llavors germinades *in vitro*
- Plates per a posar les torratxes
- Torratxes (de plàstic i de mida petita)
- Container negre
- Guants de laboratori
- Etiquetes
- Substrat per fer créixer la melonera
- Terra

MÈTODE (a l'hivernacle):

1. El primer que cal fer és abocar el substrat i la terra dins el container negre, afegir-hi aigua i barrejar-ho tot.



Il·lustració 28. Substrat i terra necessaris per preparar la barreja. (Fotografia pròpia)

2. Cal col·locar les torratxes dins els forats de la plata i omplir-les amb la barreja elaborada anteriorment.



Il·lustració 29. Torratxes col·locades dins la plata i omplertes amb la barreja de substrat, terra i aigua. (Fotografia pròpia)

3. És necessari marcar cada torratxa amb una etiqueta per tal de saber si conté llavors Pell de Gripau o Vedrantaís.
4. A continuació, cal obrir amb cautela les plaques de Petri i calcular el percentatge de les llavors germinades.



Il·lustració 30. Placa de Petri que contés les llavors ja germinades. (Fotografia pròpia)

5. Una vegada és te el percentatge calculat, s'enterren les llavors germinades dins les torratxes i es dipositen les plates a l'hivernacle.

CÀLCUL DEL PERCENTATGE DE LES LLAVORS GERMINADES:

Varietats	Pell de Gripau	Vedrantaís
Total de llavors	20	20
Llavors germinades	18	4
Llavors no germinades	2	16
% de llavors germinades	90%	20%

Taula 3. En aquesta taula es mostra el total de llavors emprades de cada varietat, el nombre de llavors

RESULTATS I OBSERVACIONS:

Tal i com es pot observar, el percentatge de llavors germinades és molt més elevat el de la varietat Pell de Gripau. Es creu que aquest fet és degut a la humitat del paper de filtre ja que a l'hora de plantar les llavors germinades i obrir les plaques de Petri, el paper de vidre de les llavors de la varietat Vedrantaís no estava gens humit. Això significa que no es va humitejar suficientment abans de ser col·locat dins la placa de Petri.

La tria de les millors llavors per plantar, es basa en escollir aquelles que han germinat amb més facilitat ja que, segurament, també seran les que creixeran amb més facilitat.

Pel que fa al compliment dels objectius, s'ha après que per tal de que les plantes germinin *in vitro* és necessària molta humitat i llum. Abans de realitzar aquest experiment o fase 1 es creu que també són necessaris substrats que continguin nutrients però ha quedat demostrat que no és així. Referent als patògens que afecten a la melonera, s'ha après que n'hi ha tres tipus diferents i tots ells ataquen la planta en diferents moments del cicle vital. Per exemple, el fongs l'ataquen quan la planta ja ha crescut, els virus afecten a la plàntula i els bacteris en ambdues situacions. Per tal de prevenir qualsevol d'aquests possibles atacs, s'utilitza la solució de Merpan.

La primera vegada que s'entra a un hivernacle de cultiu de melones t'adones que la temperatura és càlida. Això és degut a que aquesta planta necessita una temperatura determinada per créixer. Normalment, el meló, el fruit de la melonera, està madur set mesos més tard d'haver estat plantat.

3.2. Fase 2: Recol·lecta als hivernacles de la torre Marimon

Per tal de portar a terme l'experiment, és necessari recol·lectar els fruits de les meloneres que han estat plantades durant un període aproximat de set mesos. Els melons utilitzats han estat cultivats als hivernacles de la Torre Marimon, un edifici d'IRTA destinat a cultivar plantacions per a estudis genètics.

En primer lloc, és necessari tallar el peduncle que uneix el meló amb la tija de la melonera. El posterior estudi d'aquest fruit permet obtenir les dades necessàries per fenotipificar-lo (mida, pes, aroma, gust...). D'altra banda, per tal de poder extreure DNA de la planta i estudiar el seu genoma, és essencial tallar una de les fulles més joves que es troben a la part superior de la planta. És cert que es podria extreure el DNA de qualsevol altra part, inclús del meló, però aquestes fulles contenen una baixa quantitat de sucres i altres substàncies que dificulten un extracció òptima del DNA, en comparació amb les arrels, la tija, les flors i el fruit. És interessant tirar fotos dels melons i de les meloneres per tal de disposar de més informació a l'hora de fenotipificar el fruit.

OBJECTIUS:

- Aprendre per què s'extreu el DNA de les fulles més joves de la planta i no del meló que hem de recol·lectar per fenotipificar.
- Aprendre a resseguir la planta de la melonera des del fruit fins a la part superior.

MATERIAL:

- Càmera
- Ganivet
- Retolador permanent
- Tubs Eppendorf de plàstic transparents

- Grans de tungstè
- Caixa de porexpan
- Glaç esmicolat
- Caixa de cartró

MÈTODE (a l'hivernacle de la Torre Marimon):

1. En primer lloc cal tirar una foto de la melonera.



*Il·lustració 31. Meló (mostra)
penjant de la melonera.
(Fotografia pròpia)*



*Il·lustració 32. Meloneres de l'hivernacle de la Torre Marimon.
(Fotografia pròpia)*

2. Seguidament es talla el peduncle de la planta i es disposa el meló dins la caixa de cartró o de plàstic. Abans de dipositar-lo, però, és indispensable marcar-lo amb un número amb el retolador permanent.



Il·lustració 33. Es talla el peduncle que uneix el meló amb la tija. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 34. Es marca el meló amb retolador per diferenciar-lo de la resta. (Fotografia pròpia)

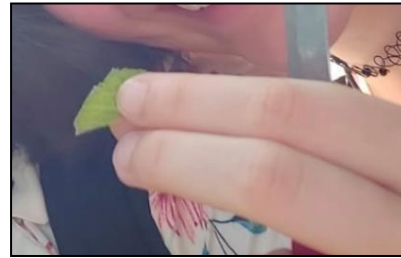


Il·lustració 35. Melons col·locats dins la caixa de plàstic. (Fotografia pròpia)

3. En tercer lloc és necessari resseguir amb la mà la tija de la melonera fins a arribar a l'extrem superior. Aleshores, es talla una petita part d'una de les fulles més joves i es guarda dins un dels tubs Eppendorf de plàstic transparents. Abans, però, és necessari dipositar un gra (boleta) de tungstè per donar oxigen a la fulla una vegada es tanqui la tapa del tub.



Il·lustració 36. Cal resseguir la tija de la melonera abans de tallar la fulla. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 37. Fulla jove tallada. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 38. La fulla es col·loca dins el tub i es marca amb retolador. (Fotografia pròpia)

4. Per últim cal marcar el tub que conté la fulla amb el mateix número que hem apuntat sobre el meló de la mateixa melonera i dipositar el tub dins la caixa de porexpan que, prèviament, ha estat omplerta amb el gel esmicolat.



Il·lustració 39. Caixa de porexpan que conté les mostres de fulla per extreure el DNA i meló que és útil per fenotipificar la planta. (Fotografia pròpia)

5. Cal repetir el mateix procediment fins a obtenir 12 mostres de melons amb la seva respectiva fulla (un Pell de Gripau, un altre Vedrantaís i la resta homozigots obtinguts a partir de l'encreuament entre les dues línies parentals i la seva posterior autopol·linització).

OBSERVACIONS:

Recol·lectar els fruits i les fulles és considerada la part més simple de l'experiment. No obstant, és fàcil cometre errors si no es va amb cautela a l'hora de tallar la fulla de la part superior. Això és degut a que la melonera acostuma a créixer sobre la superfície terrestre i no verticalment. Aquest fet provoca que les tiges no siguin rígides i a mesura que agafen alçada es dobleguen sobre elles mateixes. Per aquest motiu si no es ressegueix amb la mà la tija de la planta, dels del fruit recol·lectat fins a la fulla que forma part de la mateixa melonera, és fàcil tallar la fulla d'una altra melonera i d'aquesta manera l'experiment no seria vàlid perquè el fenotip no concordaria amb el genotip del meló i possiblement es cometrien errors a l'hora de cercar el gen candidat, responsable del color taronja de la polpa del meló.

3.3. Fase 3: Fenotipificació dels melons

Quan s'observen els fruits o qualsevol altra part d'una planta, es poden apreciar trets i característiques que la diferencien de la resta. Això és el que es coneix amb el nom de fenotip. El fenotip permet descriure les plantes i, al mateix temps, estudiar-les i millorar-ne les característiques que són importants per a l'ésser humà. De fet, en l'experiment en qüestió, s'estudia el color de la polpa del meló, el qual està directament relacionat amb l'aportació vitamínica que aquest fruit aporta a la població que el consumeix. No obstant, hi ha molts altres trets que es poden estudiar a través del fenotip com ara la mida, el pes, el gust, la tolerància a la sequera, entre d'altres.

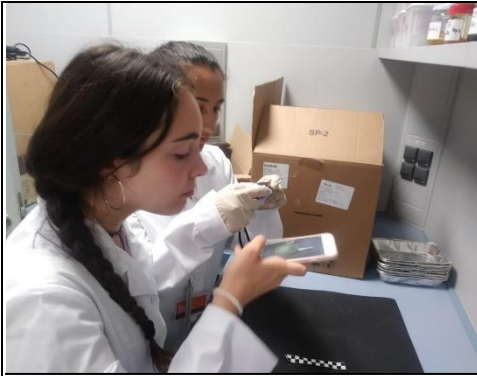
OBJECTIUS:

1. Entendre el significat del mot fenotip
2. Conèixer la importància de fenotipificar durant el procés de millora artificial de les plantes (*plant breeding program*)
3. Aprendre a fenotipificar melons per l'estudi de caràcters agronòmics importants

MATERIAL:

- Bata de laboratori
 - Guants de laboratori
 - Escàner
 - Ordinador
 - Caixa de cartró
 - Càmera
 - Ganivet
 - Bàscula
 - Cinta mètrica
 - Calibrador
 - Colador
 - Penetròmetre
 - Refractòmetre
1. Per tal d'estudiar el color de la polpa del meló a través del fenotip, el primer que cal fer és transportar els 12 melons recol·lectats des de La Torre Marimon fins als laboratoris del

CRAG. Allí es tiren fotos del meló sencer des de diferents perspectives, abans de tallar-lo per la meitat. També es mesura l'alçada i l'amplada (cinta mètrica), el diàmetre (calibrador) i el pes (bàscula). Un altre factor molt important a tenir en compte del fenotip exterior és la presència o absència d'aroma, de línies que travessen verticalment la pela del meló i de cèl·lules que intervenen en el procés d'abscisió del fruit (procés en el qual el fruit es desprèn del peduncle perquè ja està suficientment madur).



Il·lustració 40. Es tiren fotos del meló des de diferents perspectives. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 41. Es pesa el meló. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 42. Es mesura la llargada i l'amplada del meló. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 43. La línia Pell de Gripau té absència de cèl·lules als extrems. (Fotografia pròpia)

- Una vegada s'han acabat de fenotipificar els trets externs del meló, ja es pot tallar per la meitat (d'un extrem a l'altre, és a dir, verticalment). El primer que s'observa i s'anota és el color de la pela i el de la polpa.



*Il·lustració 44. Es talla el meló per la meitat.
(Fotografia pròpia)*



Il·lustració 45. L'aroma és un tret important del fruit. (Fotografia pròpia)

3. Seguidament, es mesura la rigidesa i densitat de la polpa del meló mitjançant un penetròmetre i el contingut de sòlids solubles (sucres) amb l'ajuda d'un refractòmetre.



Il·lustració 46. Es mesura la rigidesa i la densitat de la polpa. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 47. S'extreu polpa del meló per a la posterior prova de sucres. (Fotografia pròpia)

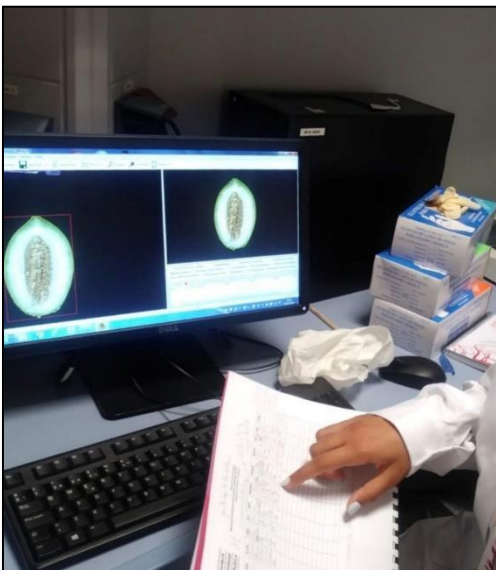


Il·lustració 48. Es neteja el refractòmetre amb unes gotes d'aigua. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 49. S'extreu la polpa del meló extreta, per tal de que els sucres (dissolts) caiguin sobre el sensor. (Fotografia pròpia)



4. Finalment, és necessari escanejar l'interior del meló amb l'ajuda d'un escàner, una caixa de cartró per tancar el meló i un ordinador que disposi del software Tomato Analyser. Aquest programa permet comprovar que les mesures de l'alçada, l'amplada i el diàmetre siguin correctes. A més a més, una vegada finalitzada la fase de fenotipificar, els melons són llençats a la brossa i és indispensable tenir una foto de l'interior del meló, guardada a l'ordinador. Com s'ha dit anteriorment, el meló no s'aprofita com a aliment. Això és degut a la gran quantitat de pesticides que s'han utilitzat per protegir-lo de paràsits durant els mesos que ha estat a l'hivernacle. D'altra banda, però, les llavors es netegen amb aigua amb l'ajuda d'un colador i es guarden.







Il·lustració 50. Imatge dels melons escanejats. (Fotografia pròpia)

5. Aquest procediment, cal repetir-lo amb tots els melons recol·lectats. En primer lloc les dues línies parentals i en segon i darrer lloc amb la resta de melons.

RESULTATS:

PLANTA	Color superfície	Línies (ribs)	Cèl·lules (procés abscisió)	Aroma	Pes	Llargada	Amplada	Duresa	Contingut sòlids solubles	Color de la carn	Fotografia
VED 12	Verd	Sí	Sí	Sí	0.992kg	11.8cm	10.4cm	4.7kg/cm2	7 %brix	Taronja	
PELL DE GRIPAU	Verd	No	No	No	1.012kg	15.1cm	12.3cm	3.5kg/cm2	11%brix	Blanc	
MELÓ1	Groc	No	No	No	0.578kg	14.2cm	8.87cm	6.5kg/cm2	5%brix	Blanc	

MELÓ2	Verd	No	No	No	0.680kg	11.4cm	10.6cm	3.4kg/cm2	9.5%brix	Blanc	
MELÓ3	Verd	No	No	No	0.632kg	11.71cm	10.3cm	4.0 kg/cm2	7%brix	Blanc	
MELÓ4	Verd	No	No	No	0.836kg	13.6cm	11.0cm	3.5 kg/cm2	13%brix	Taronja	
MELÓ5	Verd	No	No	No	0.818kg	12.2cm	11.2cm	1.8 kg/cm2	11%brix	Taronja	

MELÓ6	Verd	No	No	No	1.4kg	14.0cm	12.8cm	3.0 kg/cm2	11%brix	Blanc
MELÓ7	Verd	No	No	No	1.180kg	15.0cm	12.4cm	3.9 kg/cm2	12%brix	Blanc
MELÓ8	Verd	No	No	No	0.740kg	14.4cm	10.9cm	2.5 kg/cm2	9%brix	Verd

MELÓ9	Verd	No	No	No	1.048kg	14.6cm	11.82cm	2.7 kg/cm2	10.5%brix	Taronja	
MELÓ10	Verd	No	No	No	0.642kg	11.0cm	10.7cm	2.4 kg/cm2	12%brix	Taronja	

Taula 4. Aquesta taula informa sobre els trets fenotípics dels 12 melons emprats en la recerca (Fotografies dels melons, pròpies)

OBSERVACIONS I CONCLUSIONS:

Després de fenotipificar els 12 melons, s'ha pogut comprovar que la gran majoria tenen els trets més similars als de la varietat Pell de Gripau que als de la varietat Vedrantaï. Un clar exemple n'és el color verd de la pela, el qual predomina sobre el taronja. També es pot percebre a través de l'absència d'aroma, l'absència de les cèl·lules del procés d'abscisió i la falta de presència de les línies verticals a la part externa del fruit (característiques pròpies del meló Pell de Gripau). Pel que fa al contingut de sucres dissolts, només el meló 1 consta d'uns valors inferiors als del meló Vedrantaï, el qual té un valor molt menor al Pell de Gripau. Fent referència a la duresa de la polpa, només el meló 1 té un valor més elevat que Vedrantaï. La resta tenen valors similars o per sota del meló Pell de Gripau.

El fet més sorprenent d'aquesta fase de l'experiment es troba en l'estudi del fenotip del meló número 8, el qual té la polpa de color verd. Aquesta anormalitat, de moment, no té una explicació lògica però durant l'anàlisi del genotip es trobarà la resposta. El que sí que s'haurà de tenir en compte és que l'extracció del DNA del meló número 8 i la seva genotipificació, s'haurà de portar a terme amb molta precisió, per no malmetre la mostra més interessant.

Un fet que ha sorprès és que el meló Vedrantaï té un aroma molt forta i dolça en comparació amb el Pell de Gripau, l'aroma del qual és quasi imperceptible. No obstant, la dolçor no té res a veure amb l'aroma ja que el Pell de Gripau conté una major quantitat de sucres dissolts que el Vedrantaï.

Un altre fet que ha cridat l'atenció, ha estat que mitjançant l'observació del fruit per la part externa, és impossible saber amb certesa de quin color és la polpa del seu interior. Per exemple, el meló número 4 té la pela de color verd, igual que el Pell de Gripau i la forma de pilota de rugbi (no és completament esfèrica). Abans d'obrir-lo per la meitat, la hipòtesis era que la polpa de l'interior seria de color blanc. No obstant, el sentit de la intuïció no va ser útil en aquesta situació ja que la polpa, definitivament, era de color taronja com la del Vedrantaï.

Pel que fa a l'assoliment dels objectius d'aquesta sessió, s'ha adquirit un alt coneixement sobre el fenotip i, específicament, sobre el fenotip del meló. Ha estat útil per entendre que el fenotip no és solament allò que els nostres ulls poden apreciar a simple vista, sinó també

tots aquells trets característics que el diferencien de la resta de melons com la contenció de sucres, la duresa de la polpa, etc.

Relacionat amb el segon objectiu, realitzant aquesta fase de l'experiment, s'ha comprovat que és essencial estudiar el fenotip dels melons ja que, sinó, no es disposaria de suficient informació per trobar el gen que provoca el color taronja. Això és degut a que per tal de cercar el gen candidat és necessari comparar el fenotip dels melons (el color de la polpa) amb el seu genotip, com es podrà observar a continuació. Per tant, la idea de que el genotip és més important que el fenotip en qualsevol tipus d'estudi genètic, és totalment falsa.

Finalment, fent referència al tercer i últim objectiu, és cert que al començament es fa feixuc treballar amb melons ja que per tal de manipular-los al laboratori es necessita tenir molt clars els passos a seguir. Tot i així, aquest procediment s'ha de repetir tantes vegades com melons s'hagin d'estudiar, per tant, després de fenotipificar sis melons, el ritme i l'eficiència de treball augmenten.

En darrer lloc, cal remarcar un punt que es considera interessant. La taula consta d'un apartat que fa referència a les cèl·lules del procés d'abscisió. El meló Pell de Gripau no té presència d'aquestes cèl·lules pel simple fet de que no es desprèn del peduncle una vegada ja està madur. Una excepció d'aquest cas dins la família *Cucumis* n'és la varietat Vedrantais (Cantaloup). En aquest, és fàcil observar a simple vista les cèl·lules. Resulta interessant el fet de que cap dels descendents (provinents del creuament entre les dues varietats esmentades anteriorment) es desprengui del peduncle quan ja és comestible. Això significa que aquest caràcter és molt poc comú. És clar que s'ha de tenir en compte que el 95% dels gens dels melons descendents provenen de la varietat Pell de Gripau i la resta del Vedrantais.

3.4. Fase 4: Genotipificació dels melons

El mateix gen en diferents varietats de meló presenta petites diferències, les quals poden ser descobertes mitjançant la seva transformació a marcadors genètics. La genotipificació consisteix en assignar un marcador molecular a una posició concreta del genoma. Això

permet identificar les diferents varietats de meló i/o identificar les parts del genoma que pertanyen a cada varietat en una població resultant de l'encreuament entre dues línies o varietats.

Prèviament a la genotipicació, és essencial la correcta execució dels següents passos. En primer lloc cal extreure DNA de cadascuna de les 12 fulles que s'han recol·lectat a l'hivernacle i, seguidament, es quantifica i qualifica el DNA obtingut. El següent pas consisteix en determinar la seqüència de nucleòtids del DNA de cada meló i en observar les mutacions que existeixen entre les 12 línies de melons. És important saber que cada una d'aquestes mutacions dels genomes són conegudes amb el nom de polimorfisme de nucleòtids simple (SNP), els quals actuen com a marcadors moleculars. Reben aquest nom perquè es tracta de mutacions en les quals varia (en una línia de meló respecte a una altra) una sola base nitrogenada d'aquella seqüència de DNA. Una vegada els SNP estan localitzats, es porta a terme la tècnica Kompetitive Allele Specific PCR (KASPar), la qual permet saber si les mutacions de cada meló provenen de la línia homocigot Pell de Gripau o de la línia, també homocigot, Vedrantaís. Tot això és possible de descobrir gràcies a uns encebadors que originen colors fluorescents.

OBJECTIU:

Els principals objectius d'aquesta sessió consisteixen en:

1. Aprendre a conservar mostres a baixes temperatures.
2. Aprendre a extreure DNA de qualitat, seguint el protocol de laboratori.
3. Saber com funciona la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Aprendre a interpretar els resultats obtinguts amb la reacció en cadena de la polimerasa.
5. Entendre en què consisteix genotipificar les plantes.
6. Aprendre a genotipificar, amb els marcadors moleculars.
7. Aprendre a interpretar el genotip del meló.

3.4.1. Emmagatzematge i conservació de les mostres

Després de recol·lectar les fulles més joves de la part superior de les meloneres dels hivernacles de la Torre Marimon, i abans d'utilitzar-les en l'extracció de DNA, és indispensable sotmetre-les a una temperatura de -80°C abans de ser utilitzades.

MATERIALS:

- Caixa de porexpan plena de gel (conté els tubs Eppendorf de plàstic amb les mostres de fulla recol·lectades a la Torre Marimon)
- Recipient de forma cilíndrica (conté nitrogen líquid)
- Bata de laboratori
- Guants de laboratori

MÈTODE (al laboratori del CRAG):

Aquesta fase de l'experiment consisteix, solament, en traspasar els tubs Eppendorf que contenen els teixits de les fulles, de la caixa de porexpan al recipient que conté nitrogen líquid. El traspàs d'un recipient a l'altre es realitza amb la mà.

Es pot dir que és el pas més ràpid i simple de realitzar però, alhora, un dels més perillosos. Requereix de molta tranquil·litat i lentitud perquè el nitrogen líquid es troba a una temperatura de -80°C i pot causar cremades mortals si entra en contacte amb qualsevol part del cos humà.



Il·lustració 51. Caixa que conté el nitrogen líquid i les mostres de les fulles de la melonera. (Fotografia pròpia)

OBSERVACIONS:

És realment fascinant observar com el nitrogen líquid entra en contacte amb l'aire, que es troba a temperatura ambient, i s'evapora amb mil·lèsimes de segon. Aquest fet també provoca que a causa de la densitat de el nitrogen líquid que s'està evaporant, els tubs Eppendorf dipositats a l'interior del recipient quedin suspesos a l'aire durant uns segons.

Dipositar les mostres dins el nitrogen líquid és molt important a l'hora d'extreure el DNA ja que quan es congelen tenen més facilitat per trencar-se i esmicolar-se en trossos més petits. Per tant, si els teixits es congelen, es pot extreure més quantitat de DNA.

3.4.2. Extracció de DNA

Després de fenotipificar els melons, cal crear un mapa genètic d'aquests mateixos melons per tal de comparar el fenotip amb el genotip. Per tal d'obtenir el genotip dels melons, en primer lloc cal extreure el DNA de les fulles. El DNA que forma la melonera, és el mateix a totes les parts de la planta però a les fulles més petites i joves és més fàcil d'extreure ja que contenen menys sucres i menys quantitat de substàncies que no interessin per estudiar el DNA.

Extreure el DNA és un dels processos més complexos de l'experiment ja que és important que no es barregi amb altres substàncies i que se'n obtingui la quantitat necessària per genotipificar el meló. Després d'extreure el DNA s'hauria d'obtenir 50 µL en aigua (5µL destinats a la seva posterior qualificació i 45µL per genotipificar). Per aquest motiu, és essencial seguir un protocol específic. La major part d'aquest protocol es porta a terme sota la campana de fum ja que limita l'exposició a fums, vapors i pols tòxics. També és molt important l'ús d'ulleres de laboratori per protegir els ulls de possibles perills i la manipulació adequada dels residus.

El DNA de les mostres es troba al nucli de les cèl·lules, per tant, el que cal aconseguir és trencar la paret de les cèl·lules vegetals i, posteriorment, provocar la lisi cel·lular (destrucció de la membrana cel·lular) per tal d'alliberar els àcids nucleics. Els passos principals de l'extracció de DNA són els següents:

1. Esmicolar els teixits de les fulles (mostres)

- Prèviament s'han congelat els teixits per obtenir més DNA de qualitat
 - L'activitat de la nucleasa (dificulta l'extracció del DNA), queda reduïda si es guarden els teixits congelats
 - Les plantes més joves de la melonera tenen menys polisacàrids
 - Ajuda a trencar les parets cel·lular i, per tant, a exposar les seves membranes a la lisi cel·lular
2. Lisi cel·lular
- Consisteix en trencar les membranes cel·lulars per alliberar els àcids nucleics
 - Es combinen diversos procediments i tècniques: buffer Doyle, temperatura (65°C), vibracions (Vòrtex), etc.
 - L'objectiu consisteix en mantenir la qualitat i l'estabilitat del DNA i en evitar les proteïnes, polisacàrids i nucleases que podrien interferir o degradar el DNA
3. Extracció orgànica
- Consisteix en l'extracció de DNA a partir d'un vol de cloroform:alcohol isoamil (24:1). Aquest pas elimina els components hidrofòbics ²⁶ (lípid, proteïnes, etc)
 - Es recupera només la capa aquosa superior del tub. La del cloroform i l'alcohol isoamil es descarta.
4. Precipitació de l'àcid nucleic
- Es precipita el DNA amb isopropanol (el DNA precipita amb alcohols)
 - S'eliminen les als amb etanol 70%
 - Es dissol el DNA en aigua pura (en aigua és més soluble però menys estable)
 - Es conserva el pH i la inactivació de les nucleases²⁷

MATERIAL:

- Bata de laboratori
- Guants de laboratori
- Ulleres de laboratori
- Campana de fum
- Tub Eppendorf
- Gradeta
- 12 tubs Eppendorf que contenen els teixits de les fulles a -80°C
- Pipetes

²⁶Substàncies que es repel·leixen amb l'aigua.

²⁷Enzim capaç d'escindir l'enllaç fosfodièster entre les subunitats de nucleòtids d'àcid nucleics.

- Agitador de vòrtex
- Forn de laboratori
- Centrifugadora
- Solucions i reactius:
- Chloroform:Isoamilic 24:1
- Isopropanol
- EtOH 70%
- Buffer d'extracció Doyle (solució tampó): 2%CTAB, 1.4M NaCl, 20Mm EDTA, 100Mm Tris-Hcl (pH 8.0), 2% PVP-40T i 0.2% beta-Mercaptoethanol

MÈTODE (PROTOCOL):

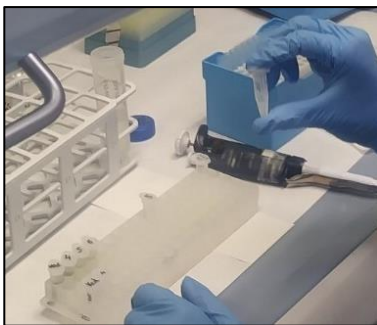
1. En primer lloc cal preparar la solució buffer. En l'experiment en qüestió es prepara una dissolució de 100 ml formada per: 2%CTAB, 1.4M NaCl, 20Mm EDTA, 100Mm Tris-Hcl (pH 8.0), 2% PVP-40T i 0.2% beta-Mercaptoethanol. Cadascun d'aquests productes és responsable d'una determinada funció:
 - CTAB (bromur de hexadeciltrimetilamoni): uneix i precipita els polisacàrids associats a la membrana, cosa que inhibeix enzims. No obstant, no exigeix cap mètode per a garantir una neteja total de polisacàrids.
 - PVP (polivinilpirrolidona): uneix i precipita els polifenols. En les plantes amb alt contingut de fenols, 2% PVP pot millorar la qualitat del DNA ja que l'oxidació dels components fenòlics redueix l'eficiència de l'extracció de DNA.
 - Tris: manté el pH constant i l'estabilitat dels àcids nucleics.
 - EDTA: origina quelats (compostos químics formats per un ió metàl·lic lligat a una estructura heterocíclica de compostos orgànics com ara aminoàcids, polipèptids...) de Mg^{++} i inhibeix l'activitat de la nucleasa.
 - Beta-Mercaptoethanol: és un agent reductor que dissol polifenols, desnatura proteïnes i elimina nucleases. Pot augmentar la quantitat de DNA útil.

[Els càlculs que cal realitzar abans d'iniciar la seva preparació al laboratori es troben a l'annex del treball].

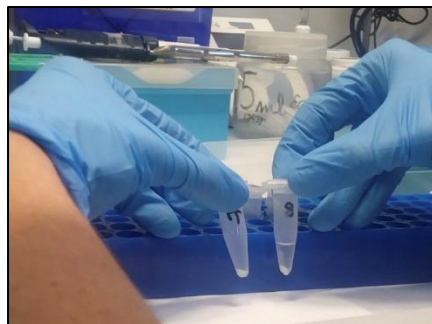
2. Una vegada ja es té preparada la solució buffer, és a dir, que ha estat barrejada i ajustada a pH8, s'escalfa fins que assoleix una temperatura de 65°C. Mentrestant, es col·loquen sota la campana de fum les 12 mostres (teixits de fulles recol·lectats a la Torre

Marimon) que es troben dins de tubs Eppendorf, on, prèviament, s'hi havia afegit un gra de tungstè (per oxigenar). En aquest moment, les mostres es mantenen a una temperatura de -80°C dins el recipient que conté el nitrogen líquid. Al mateix temps, també es prepara la solució de cloroform i isoamilic²⁸ en una proporció de 24 parts de cloroform i una d'alcohol isoamilic. De la botella d'isopropanol se'n retira un alícuot²⁹ i es diposita dins un vas de precipitats a 4°C de temperatura. Per finalitzar aquest pas de l'extracció de DNA, només cal barrejar 7 parts d'etanol amb 3 d'aigua, volum per volum, dins un altre vas de precipitats.

- Després de treure les mostres de dins del recipient i col·locar-les per ordre (de més petit a més gran, segons el nombre marcat en cada tub Eppendorf) a la gradeta de sota la campana de fum, s'afegeix $500\mu\text{L}$ del buffer Doyle, preparat i escalfat anteriorment a 65°C de temperatura, a cada una de les mostres.

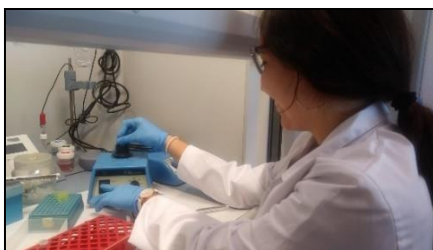


Il·lustració 52. Mostres col·locades per ordre a la gradeta, sota la campana de fum. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 53. S'afegeix $500\mu\text{L}$ del buffer Doyle a cada mostra. (Fotografia pròpia)

- A continuació, es mescla el contingut de dins els tubs Eppendorf utilitzant el Vòrtex.

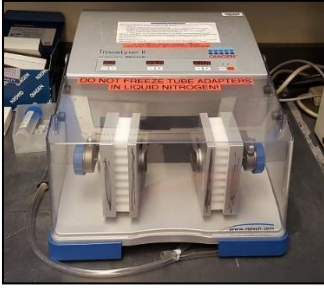


Il·lustració 54. Vòrtex. (Fotografia pròpia)

²⁸ Líquid incolor amb la fórmula $(\text{CH}_3)(2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})$. És un dels diversos isòmers de l'alcohol amílic.

²⁹ Part que es pren d'un volum o d'una massa inicials, per a ser usada en una prova de laboratori. Les respectives propietats físiques i químiques, així com la seva composició, representen les de la substància original.

5. El següent pas consisteix en esmicolar els teixits, congelats prèviament amb el nitrogen líquid, utilitzant una màquina anomenada Tissue Lyser.



*Il·lustració 55. Tissue Lyser.
(Fotografia pròpia)*

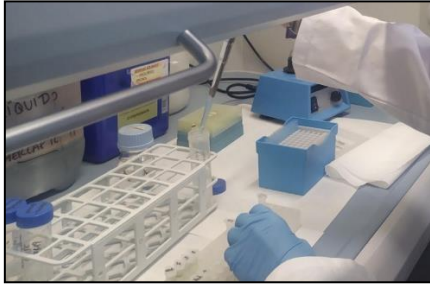
6. Aleshores s'escalfen les mostres a una temperatura de 65°C durant 30 minuts. D'aquesta manera, les parets de les cèl·lules disposen de suficient escalfor per trencar-se i les membranes es lisen³⁰.



*Il·lustració 56. Forn per escalfar
les mostres. (Fotografia pròpia)*

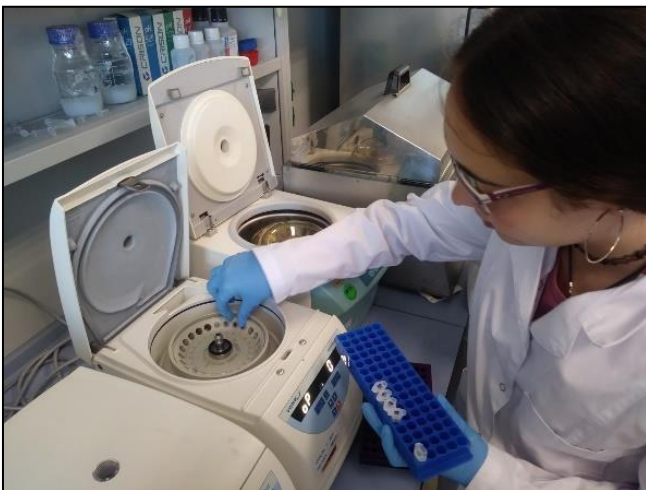
7. Passada mitja hora, es treuen les mostres i s'afegeix 500µL de cloroform:isoamil (24:1), per tal d'ajudar a separar els àcids nucleics de les proteïnes que es troben en el teixit vegetal.

³⁰ Fenomen consistent en la destrucció total o parcial del contorn de la cèl·lula i en la dispersió del citoplasma.



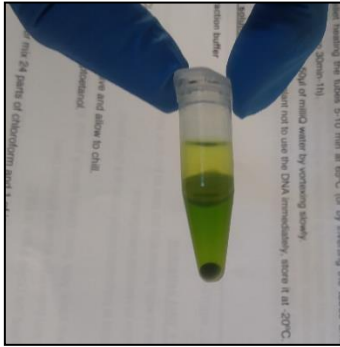
Il·lustració 57. S'afegeix 500ul de cloroform:isoamil (24:1) a cadascuna de les mostres. (Fotografia pròpia)

8. Llavors es centrifuga a 13000 rpm, a temperatura ambiental, durant 10 minuts, per tal de separar les dues capes (àcids nucleics i proteïnes). Mentrestant, cal preparar tubs Eppendorf nous i col·locar-los en una gradeta també nova ja que la que s'ha utilitzat fins ara serà necessària quan es retirin els tubs que contenen el DNA barrejat amb la solució buffer, els qual es troben a la centrifugadora.



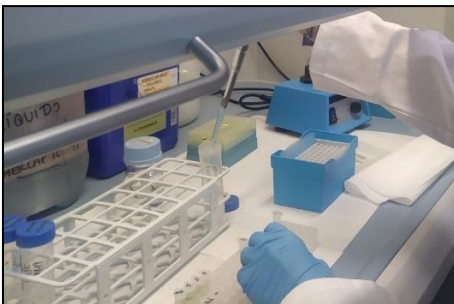
Il·lustració 58. Es centrifuguen les mostres amb la centrifugadora. (Fotografia pròpia)

9. Per realitzar el següent pas, cal treure els tubs de la centrifugadora i traspasar la capa aquosa (la superior) a un nou tub Eppendorf, amb l'ajuda de la pipeta de 200µL. En aquests moments es disposa d'una gradeta amb 12 tubs que contenen el DNA i una altra gradeta amb 12 tubs que contenen proteïnes, sucres i altres substàncies que no són àcids nucleics.



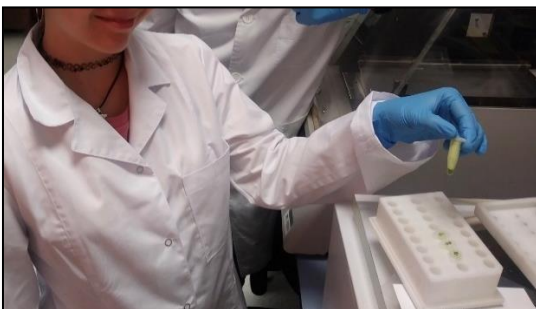
Il·lustració 59. Tub que conté el DNA i les proteïnes i sucres. La capa superior és el DNA mentre que les proteïnes i els sucres es troben al fons precipitats. (Fotografia pròpia)

10. Llavors s'afegeixen 350µL de isopropanol (guardat a temperatura ambient) i s'inverteix el tub per barrejar-ho. Es formen petites acumulacions de DNA, les quals poden ser visibles degut a la seva precipitació en l'ambient alcohòlic produït per l'isopropanol.



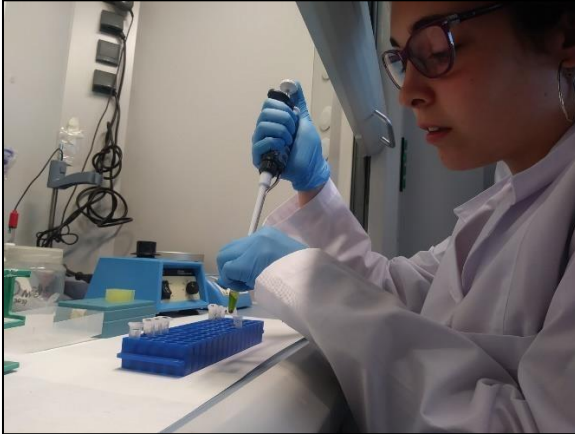
Il·lustració 60. S'afegeix 350ul de isopropanol a la mostra. (Fotografia pròpia)

11. Després cal centrifugar les 12 mostres a 13000 rpm, a temperatura ambient, durant 15 minuts per tal de que el DNA precipiti al fons del tub. En aquest punt encara hi ha sucres i proteïnes que no interessen i es vol separa-les del DNA.



Il·lustració 61. La mostra ha estat centrifugada. (Fotografia pròpia)

12. Aleshores es retira el sobrenedant (líquid que queda a la part superior del tub després de que el sòlid hagi precipitat) amb l'ajuda d'una pipeta, vigilat sobretot de no tocar el DNA (hi ha DNA de color blanc precipitat al fons).



Il·lustració 62. Es retira el sobrenedant amb l'ajuda d'una pipeta. (Fotografia pròpia)

13. S'afegeix 20 μ L l de EtOH 70% fred per tal d'eliminar l'excés de sals present a la mostra. Es barreja invertint el tub (no s'utilitza el Vòrtex).
14. Es centrifuga a 13000rpm durant 3 minuts, a temperatura ambient i, una vegada es retiren els 12 tubs que contenen les 12 mostres de la centrifugadora, es retira de nou el sobrenedant.
15. Seguidament s'ha d'assecar el DNA precipitat. La manera més ràpida consisteix en esclafar els tubs durant 5-10 minuts a 65°C. No obstant, també és possible assecar-lo invertint el tubs i deixar-los a temperatura ambient durant una hora aproximadament.
16. Finalment es deixa en resuspensió el precipitat en 50 μ L d'aigua ultrapura (purificada i desionitzada), gràcies a l'ajuda del Vòrtex i es guarden les 12 mostres a 4°C de temperatura (si no s'utilitza al moment, és essencial guardar-lo a -20°C).

OBSERVACIONS:

En primer lloc cal destacar el fet de que, tot i la semblança entre les mostres, no totes elles responen de la mateixa manera a les tècniques aplicades. Per exemple, en el cas del Vòrtex, cadascuna necessita un temps diferent per estar barrejada correctament. El mateix

passa amb la centrifugadors i amb el Tissue Lyser. Això comporta pensar que tot i que totes les mostres vinguin de la melonera, cadascuna té el seu propi DNA i això provoca que cada teixit sigui diferent del de la resta.

En aquesta sessió s'ha après a pipetejar i a distingir els diferents tipus de pipetes, de la mateixa manera que s'ha après quina funció té la campana de fum i altres tècniques tals com el Vòrtex, la centrifugadora (sempre ha d'estar compensada dels dos costats), la Tissue Lyser, etc. Però sobretot i, sense això no seria possible realitzar l'extracció de DNA amb el mètode emprat, s'ha après i portat a la pràctica que els àcids nucleics són solubles en aigua i insolubles en alcohol. Per això el DNA ha precipitat en el medi alcohòlic.

Generalment, la població tendeix a pensar que l'extracció de DNA vegetal és més simple que la de DNA animal. No obstant, aquesta idea és totalment errònia ja que les cèl·lules vegetals, a diferència de les animals, consten d'una paret cel·lular al voltant de la membrana. Per tant, és més difícil l'alliberació dels àcids nucleics ja que per tal de produir-se la lisi de la membrana cel·lular, prèviament cal trencar la paret cel·lular. Per aquest motiu, és important congelar les mostres vegetals amb nitrogen líquid abans de realitzar l'extracció.

3.4.3. Test: qualitat i quantitat de DNA

La quantitat i la qualitat del DNA extret s'avaluen a partir de dues tècniques diferents. En primer lloc, per espectrometria amb l'ajuda d'un NanoDrop (espectròmetre) i, en segon, a partir d'una electroforesis de gel d'agarosa.

Per cadascuna de les tècniques s'utilitza una quantitat diferent de DNA. Si es recorda, després de l'extracció de DNA s'obtenen 50ul de DNA dissolt en aigua. D'aquests 50µL de DNA, se'n destinen 4µL a l'electroforesi i 1µL al NanoDrop. La resta es guarden ja que són necessaris en la fase de genotipificar.

a. EL NANODROP

El NanoDrop és un espectròmetre capaç de qualificar i quantificar les mostres de DNA, RNA i proteïnes, amb només 1-2µL. Té la capacitat de projectar un raig de llum monocromàtica a través de la mostra i mesurar la quantitat de llum que s'absorbeix en la mostra (es basa en la longitud d'ona del raig de llum que surt de la mostra després de travessar-la). En l'experiment en qüestió és útil el seu ús perquè mostra la naturalesa de la substància en la mostra i es pot saber si hi ha compostos no desitjats com proteïnes i RNA, a més a més del DNA. També és útil per saber la quantitat de DNA (substància que interessa) present en la mostra. Els resultats es visualitzen a la pantalla de l'ordinador. Per calcular els índex de puresa de l'ADN mesurat, s'utilitzen els valors d'absorbància³¹ a 230nm, 260nm i 280nm. Els índex de puresa són sensibles a la presència de contaminants en la mostra. Un índex de puresa A260/A280 de -1.8 és, generalment, acceptat com a pur en quan a DNA. Pel que fa a l'índex de puresa de A260/A230, acostuma a considerar-se DNA pur si es troba entre els valors 1.8 i 2.2.

MATERIAL:

- Bata de laboratori
- Guants de laboratori
- NanoDrop
- Ordinador amb Software
- 12 mostres
- 1 tub Eppendorf amb aigua
- Gradeta
- Pipeta
- Tovallola de laboratori

MÈTODE:

1. En primer lloc cal obrir el Software de l'ordinador i, a la pantalla d'Inici, seleccionar la fitxa d'àcids nucleics i escollir la pestanya que fa referència al DNA.
2. El següent pas consisteix en pipetejar 1µL d'aigua en el pedestal inferior i abaixar el braç. L'aigua és el grup control, per tant, si el NanoDrop funciona correctament, la línia dibuixada en el gràfic de la pantalla de l'ordinador serà totalment horitzontal.

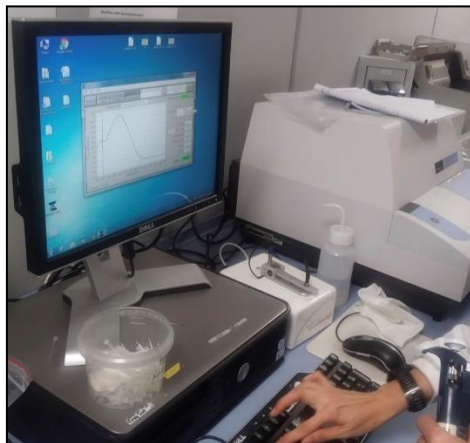
³¹ Mesura que reflecteix com s'atenua la radiació quan travessa un element.

- Una vegada finalitzada la mesura, s'aixeca el braç i es netegen els dos pedestals amb una tovallola de laboratori.



Il·lustració 63. Nanodrop. La part metàl·lica correspon al braç. (Font pròpia)

- A continuació s'agafen les 12 mostres i es pipeteja 1 μ L d'una d'elles al pedestal inferior. S'abaixa el braç i una vegada s'obté la gràfica i els resultats, s'apuja de nou el braç, es netegen els dos pedestals i es repeteix aquest procediment amb la resta de mostres.



Il·lustració 64. Ordinador connectat al Nanodrop i gràfica obtinguda de la mostra 5. (Fotografia pròpia)

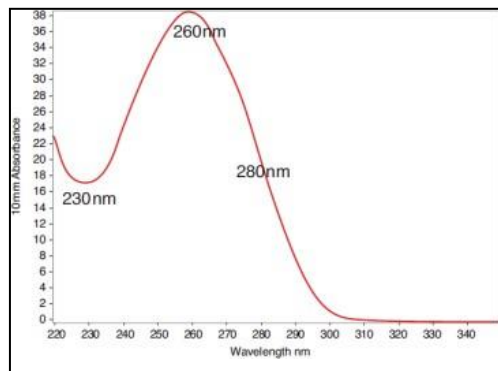
RESULTATS:

	A	B	C	D	E	F
1	Nucleic Acid					
2	DNA quantification					
3						
4						
5	Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
6	H2O	0	0	0	NaN	NaN
7	Melon 7	525,41	10,508	5,606	1,87	1,81
8	Melon 8	595,3	11,906	6,22	1,91	1,54
9	Melon 9	508,66	10,173	5,006	2,03	1,58
10	Melon 10	451,49	9,03	9,947	0,91	1,12
11	H2O	-0,26	-0,005	-0,005	0,98	0,69
12	melon 10	-6,85	-0,137	-0,117	1,17	0,64
13	melon 10	0,4	0,008	-0,025	-0,33	15,49
14	Ved	45,34	0,907	0,449	2,02	0,35
15	melon 4	404,77	8,095	4,512	1,79	1,11
16	melon 4	344,69	6,894	3,438	2,01	1,58
17	melon 5	189,51	3,79	1,844	2,06	0,87
18	melon 5	169,99	3,4	1,668	2,04	0,88
19	melon 6	254,2	5,084	2,484	2,05	0,99
20	Piel de Sapo	2360,82	47,216	24,44	1,93	2,02
21	Melon 1	1189,41	23,788	12,058	1,97	1,82
22	Melon 2	2039,09	40,782	21,607	1,89	1,91
23	Melon 3	2238,14	44,763	22,804	1,96	2,08
24	Melon 10	835,1	16,702	8,88	1,88	1,57
25	H2O	0	0	0	NaN	NaN

Il·lustració 65. Aquesta imatge correspon a la taula de resultats obtinguts a partir de l'anàlisi de DNA portat a terme amb el Nanodrop. (Fotografia pròpia)

Com es pot observar, en primer lloc, el grup control (aigua) correspon al valor 0 (valor esperat) tant en l'índex de puresa A260/A280 com en l'índex A260/A230, a excepció de la fila número 11. Això és degut a la mala neteja dels pedestals, després de realitzar la mesura de la mostra número 10.

En segon lloc, no tots els DNA mesurats es poden considerar purs. Pel que fa als valors d'absorbància de l'índex de puresa A260/A230, solament l'extracció de DNA dels melons 1, 2, 3, 7 i Pell de Gripau es poden considerar purs. La resta de valors, no entren dins els establerts (1.8-2.2). En el cas de l'índex A260/A280, encara augmenta més la dificultat d'aconseguir realitzar una extracció de DNA pur ja que consta d'un únic valor d'absorbància (1.8). Tot i així, els valors obtinguts amb el NanoDrop s'aproximen molt a aquesta xifra, tal i com es pot comprovar a la taula.



Il·lustració 66. Gràfic on es mostra el pic d'absorbància de A260, utilitzats per calcular la concentració de DNA. Mostra nº7. (Fotografia pròpia)

OBSERVACIONS:

Al començament, una de les mostres ha estat considerada un error pel NanoDrop. Això significa que l'extracció de DNA no s'ha realitzat correctament i la quantitat o la qualitat del DNA no és útil per genotipificar els melons. Després de netejar els pedestals dues vegades i intentar-ho de nou, s'ha vist que el DNA era pur. El problema es trobava en la neteja del NanoDrop o, bé, en la imprecisió a l'hora de pipetejar 1µL de la mostra.

b. L'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

Tot i que els índex de puresa són indicadors importants de la qualitat de la mostra, la millor manera de conèixer-ne la seva qualitat consisteix en visualitzar el recorregut del DNA en el gel d'agarosa.

En l'experiment en qüestió, l'electroforesi en gel d'agarosa té com a funció principal separar les molècules d'àcid nucleic aplicant un camp elèctric per moure les molècules carregades negativament a través d'una matriu d'agarosa³². Les molècules més petites recorren més centímetres que les més grans ja que migren més fàcilment i amb més rapidesa a través dels porus del gel. Aquest fenomen s'anomena tamisatge.

³² Polisacàrid format per galactosa alfa i beta que s'extreu de les algues.

MATERIALS:

- Bata de laboratori
- Guants de laboratori
- Aparell d'electroforesi amb diferents pous de càrrega
- 12 tubs Eppendorf que contenen les mostres
- Agarosa
- Buffer TAE: EDTA, Tris i àcid acètic
- Plata amb punxes
- Forn
- Vareta de vidre
- Vas de precipitats

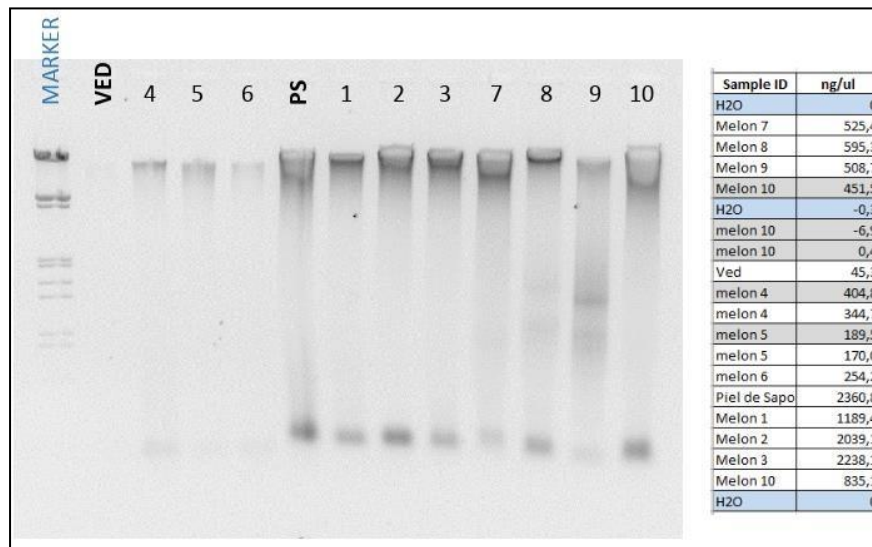
MÈTODE:

1. Primerament, és necessari preparar el gel amb un 1% d'agarosa (1g d'agarosa en 100ml de buffer TAE, el qual està compost per EDTA, Tris i àcid acètic).
2. Llavors s'escalfa el gel fins a fondre's i es traspassa en una plata amb punxes per tal de perforar el gel (es creen els porus pels quals avancen les molècules).
3. Per últim cal preparar 4 μL de cada mostra barrejats amb 1 μL de buffer i deixar-los córrer durant 30 minuts pel gel.



*Il·lustració 67. Electroforesi en gel d'agarosa.
(Fotografia pròpia)*

RESULTATS:



Il·lustració 68. Resultats obtinguts a partir de l'electroforesi en gel d'agarosa.
(Fotografia pròpia)

En aquesta imatge digital s'hi observen 13 carrils del gel d'agarosa utilitzat en l'experiment. El gel està tenyit amb bromur d'etidi i il·luminat per revelar la presència de 12 bandes d'àcids nucleics. El primer carril conté una mescla de fragments d'ADN de mida coneguda, és el que s'anomena marcador o *size marker* i permet estimar lleugerament la longitud dels fragments produïts en cada carril. El carril que conté els marcadors és més curt que tota la resta. Aquest fet és degut a que els marcadors només són fragments de DNA i aquests, es troben a la part superior del gel. Els fragments que s'observen a la part inferior del gel corresponen a fragments de RNA, els quals no interessen per genotipificar els melons.

Com es pot observar, la majoria de mostres contenen una quantitat considerable de DNA, a excepció del meló Vedrantaís. Això significa que l'extracció de DNA d'aquesta planta no va estar ben realitzada. D'altra banda, també és perceptible la presència de RNA, el qual no s'ha pogut eliminar totalment de la mostra. Per suposat, el grup control (aigua) correspon a un valor de 0 μ L (els μ L de la taula fan referència als μ L de DNA que conté la mostra).

OBSERVACIONS:

Aquesta tècnica és molt efectiva per quantificar i qualifica, de manera visual, el DNA. No obstant, s'utilitzen productes molt tòxics i cal estar atent a l'hora de manipular-los.

3.4.4. Genotipificar

Aquesta fase de l'experiment consisteix en genotipificar els 12 melons, els quals, prèviament i mitjançant el fenotip, han estat diferenciats els uns dels altres pel color de la polpa.

Per tal de portar a terme la genotipificació, és indispensable l'ús de la tècnica anomenada Kompetitive Allele Specific PCR, més coneguda com a KASPar. No obstant, per tal de poder entendre el funcionament i ús d'aquesta tècnica, és necessari saber amb antelació que, en l'experiment en qüestió, tots els melons posseeixen quasi bé el mateix genoma (mateixos gens i mateix nombre de cromosomes) ja que formen part de la mateixa espècie. No obstant, provenen de dues varietats diferents (Pell de Gripau i Vedrantaïs) i això significa que existeixen variacions en un genoma respecte l'altre. Aquestes variacions es coneixen amb el nom de mutacions i són detectables després de la seqüenciació de tots els genomes dels melons gràcies al programa informàtic capaç de comparar tots els gens dels 12 genomes. Cada una d'aquestes mutacions es marca mitjançant el mateix programa i passen a ser conegudes com a polimorfismes de nucleòtids simples (SNP). Els polimorfismes de nucleòtids simples (SNP) són polimorfismes³³ d'un únic gen que succeeixen per la variació en un sol nucleòtid³⁴ de la seqüència de DNA. En el cas de que aquest canvi en aquest nucleòtid es doni a menys d'un 1% de la població no és considerat un SNP sinó que s'entén com una mutació puntual. Per tant, els SNP són útils per observar les diferències entre els individus d'una mateixa espècie. En el nostre cas, ajuden a esbrinar i localitzar el gen responsable del color taronja de la polpa del meló ja que els 12 melons emprats posseeixen aquest gen però, els melons de polpa blanca, presenten una base nitrogenada d'un nucleòtid d'aquesta seqüència de DNA del gen, diferent a la base nitrogenada que presenten els de polpa taronja, en aquesta mateixa seqüència de DNA del gen que es busca.

³³ El polimorfisme és la presència de més d'una variant al·lèlica per a un determinat gen, bé sigui en una població o espècie.

³⁴ Els nucleòtids són les unitats estructurals bàsiques dels àcids nucleics, és a dir que els àcids nucleics estan formats per l'encadenament de nucleòtids.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, s'utilitza el KASPar com a sistema de genotipificació. Aquesta tècnica consisteix en la utilització de tres encebadors ³⁵dissenyats per seguir l'edició d'un nucleòtid específic sobre la base del polimorfisme de nucleòtids simple (SNP) que són les mutacions que distingeixen les 12 línies de melons de l'experiment. Aquest nucleòtid afegit mitjançant la tècnica KASPar, permet diferenciar les dues varietats parentals, segons la fluorescència que emeten els respectius SNP.

La idea més important sobre el KASPar és que és una tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR), tal i com indica el seu nom i, que per tant, és útil per ampliar la mostra de DNA. Consta de 3 components: la mostra de DNA (qualificada prèviament) amb el SNP d'interès, la KASPar AssayMix que consta de dos encebadors d'específic al·lel (són encebadors sentit, col·loquen nucleòtids de 5' a 3') i d'un encebador bial·lèlic d'antisentit (5'-3') i, en darrera posició, la KASP MasterMix que conté dos cassets de transferència d'energia de ressonància en fluorescència (FRET) i la Taq polimerasa en una solució de buffer òptima.

Es diu que dos dels tres encebadors de la KASPar AssayMix són d'específic al·lel perquè cadascun consta d'un final de seqüència diferent (l'última base nitrogenada de les seqüències de DNA dels dos encebadors, difereix). **Això és degut a que l'objectiu de la genotipificació consisteix en descobrir quins SNP de la seqüència de DNA de cada un dels melons provenen del meló Pell de Gripau i quins provenen del meló Vedrantaís.** I la pregunta que es formula a continuació és: i per què és útil que els dos encebadors finalitzin amb una base nitrogenada diferent? Doncs bé, aquesta qüestió cal respondre-la en dues parts ja que aquest fet té una doble finalitat.

En primer lloc, com ja se sap, a partir de la seqüenciació del genoma dels 12 melons s'han creat SNP, els quals, a partir d'un programa informàtic, han estat estudiats. Mitjançant l'estudi, s'ha comparat les bases nitrogenades que difereixen entre les dues línies parentals. Se sap amb certesa en quins llocs del genoma, una varietat parental té una base nitrogenada diferent a la de l'altra varietat parental. D'aquesta manera i posant un exemple no real, si se sap, que en una posició determinada del DNA, el meló Pell de Gripau consta d'una guanina i el Vedrantaís, en la mateixa posició, d'una timina (és un SNP), es creen dos encebadors sentit, un que acaba amb una citosina (base nitrogenada complementària de la

³⁵ Cadena d'àcids nucleics que serveix com a punt d'inici per a la replicació de l'ADN.

guanina) i un amb adenina (base nitrogenada complementària de la timina). Per tant, només un dels dos encebadors, és capaç de sintetitzar la cadena complementària sobre la base de SNP del meló Pell de Gripau (el que té la base nitrogenada complementària a la guanina) i el mateix succeeix sobre la base de SNP del meló Vedrantaís (en aquest cas és l'encebador que finalitza amb adenina el que pot sintetitzar).

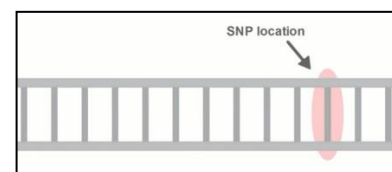
El que es desconeix és quins dels deu melons restants posseeix una guanina i quins una timina en aquesta mateixa posició del genoma. Aquí és on entra en joc la segona part de la pregunta formulada anteriorment sobre la utilitat dels dos encebadors. La KASPar MasterMix, consta de dos cassets FRET, un anomenat Fam que transmet fluorescència taronja i un anomenat HEX que transmet fluorescència verda. El cassette de fluorescència taronja, està dissenyat perquè posseeixi la mateixa base nitrogenada que l'encebador d'al·lel específic 1 (el que acaba amb citosina), mentre que el de fluorescència verda està pensat perquè tingui la mateixa que l'encebador d'al·lel específic 2 (el que finalitza la seva seqüència de DNA amb adenina). Per tant, cada línia parental, només pot transmetre un dels dos colors fluorescents que solament un cassette fluorescent (verd o taronja) té una base nitrogenada complementària a la de la seqüència del meló Pell de Gripau i l'altre cassette té una base nitrogenada complementària de la base nitrogenada (SNP) del Vedrantaís. A través del color fluorescent que es rep a l'orinador, com a resultat de la PCR, es pot saber quins SNP (dels 10 melons) provenen del meló Pell de Gripau i quins de Vedrantaís ja que la prova també es realitza amb les dues línies parentals homozigots.

El funcionament de la tècnica KASPar consta dels següents passos:

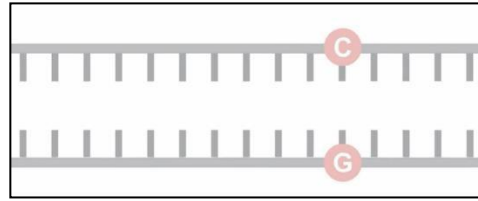
1. En primer lloc, l'espiral de DNA es desfà de manera que les dues cadenes queden separades. Aquest procés consisteix en escalfar breument la doble hèlix i s'anomena desnaturalització. S'obté una monocadena amb el SNP i una altra monocadena complementària a aquesta.



Il·lustració 69. Cadena de DNA mig desfeta

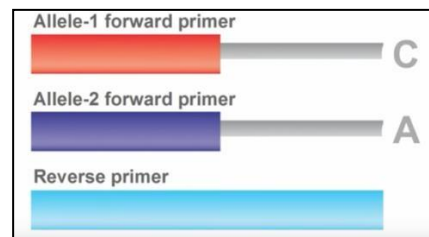


Il·lustració 70. Localització del SNP de la cadena de DNA

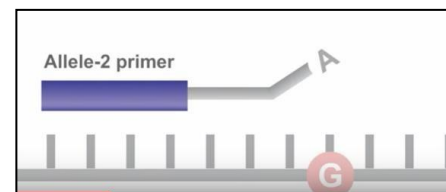


Il·lustració 71. La cadena doble se separa i s'obté dues monocadenes: una posseeix el SNP d'interès (G) i l'altra és complementària a la que té el SNP

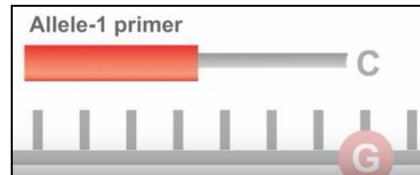
2. A la primera ronda de PCR, un dels dos encebadors sentit (5'-3') d'al·lel específics, s'uneix amb el SNP d'interès. Aquest procés rep el nom d'hibridació i consisteix en refredar la monocadena prèviament escalfada. Només s'hi uneix el que té la base complementària al SNP, en aquest cas, l'encebador d'al·lel específic 1. Al mateix temps, l'encebador antisentit (3'-5'), s'uneix a la monocadena complementària de la monocadena que posseeix el SNP i s'amplifica la regió desitjada gràcies a la DNA-polimerasa, en el procés anomenat extensió. Aquest tercer encebador, l'antisentit, és vàlid en tots els casos (tant si actua l'encebador d'al·lel específic1 o el d'al·lel específic2), és a dir, que és complementari dels dos encebadors sentit, encara que acabin amb bases nitrogenades diferents.



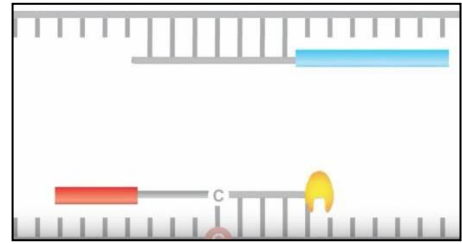
Il·lustració 72. Encebador d'al·lel específic1 que finalitza amb una citosina, encebador d'al·lel específic 2 que finalitza amb una adenina i encebador antisentit complementari als dos encebadors d'al·lel específic



Il·lustració 73. L'encebador d'al·lel específic2, no és complementari al SNP (G). L'encebador d'al·lel específic2 es descarta i no s'utilitza en cap moment de la PCR

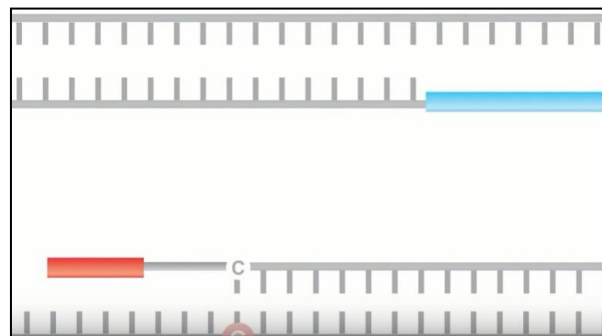


Il·lustració 74. L'encebador d'al·lel específic1 és complementari a la guanina (SNP), de manera que s'hi uneix



Il·lustració 75. L'encebador d'al·lel específic1 sintetitza la cadena complementària a la que posseeix el SNP mentre que l'encebador antisentit sintetitza la cadena complementària de la monocadena que havia format l'espiral de DNA juntament amb la cadena que conté el SNP

3. Aleshores, la monocadena que conté el SNP i la monocadena complementària d'aquesta, sintetitzada a partir de l'encebador d'al·lel específic1, es separen.

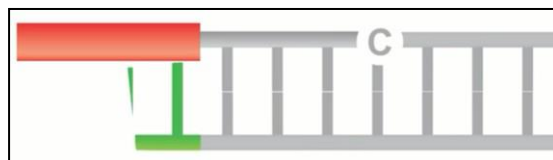


Il·lustració 76. Les noves monocadenes de DNA es separen de les velles

4. Després un segon encebador antisentit (3'-5'), allarga i sintetitza una còpia complementària de la monocadena creada a partir de l'encebador sentit d'al·lel específic1.

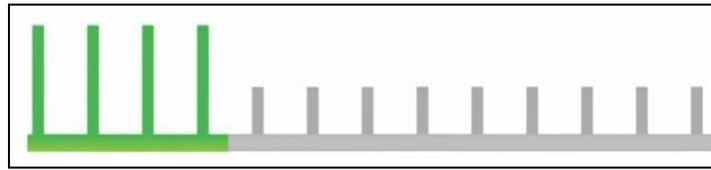


Il·lustració 77. Monocadena sintetitzada per l'encebador d'al·lel específic1



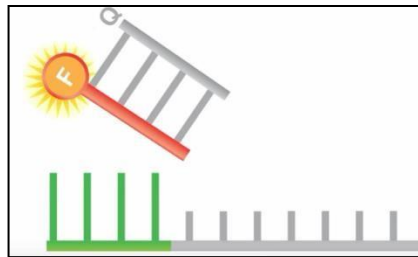
Il·lustració 78. Un segon encebador antisentit, crea una cadena complementària

5. Llavors es separen aquestes dues cadenes i desapareix la monocadena sintetitzada a partir de l'encebador sentit d'al·lel específic¹. Només queda la cadena nova.

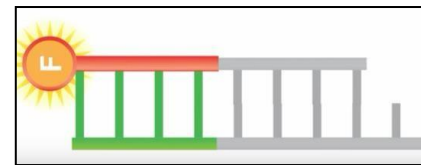


Il·lustració 79. Cadena nova que ha estat sintetitzada pel segon encebador antisentit

6. A continuació, el casset FRET, unit a Taq polimerasa (és complementari a l'encebador sentit d'al·lel específic¹ que s'ha utilitzat), s'uneix a la monocadena sintetitzada a partir del segon encebador antisentit i crea una monocadena complementària a aquesta darrera. El començament d'aquesta cadena és fluorescent ja que s'inicia amb el casset FRET.

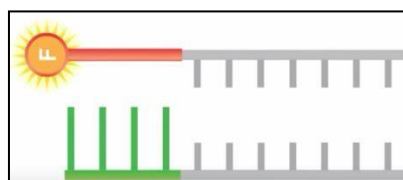


Il·lustració 80. El casset FRET (fluorescent) s'uneix a la monocadena



Il·lustració 81. La polimerassa unida al casset FRET sintetitza la cadena complementària

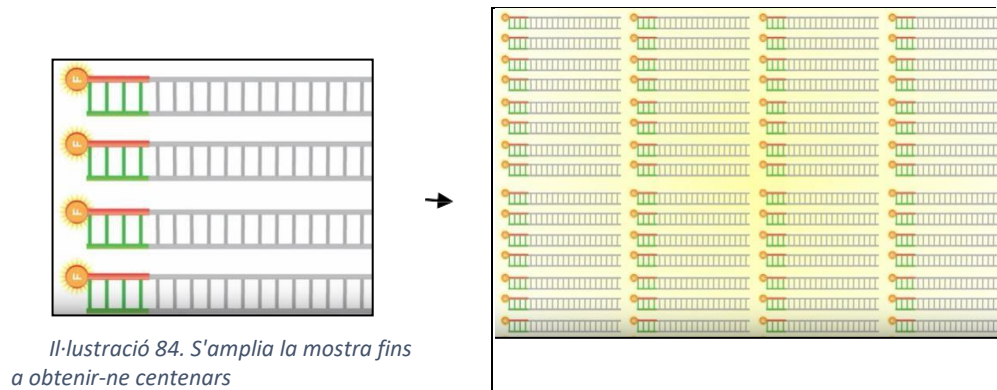
7. L'últim pas consisteix en la separació d'aquestes dues monocadenes i en la sintetització de noves cadenes complementàries. Aquest pas es repeteix centenars de vegades per tal d'ampliar la mostra de DNA i poder observar de quin color fluorescent es tracta (taronja en el cas del casset FAM o verd en el cas de casset HEX).



Il·lustració 82. Separació de la cadena



Il·lustració 83. Es sintetitzen monocadenes complementàries a les dues monocadenes, separades anteriorment



8. Quan se sap el color, també se sap quina base nitrogenada posseeix aquella varietat de meló. Cal comparar el color de cada varietat amb el color de les línies parentals.

OBSERVACIONS:

- Per tal de que funcioni la tècnica KASPar i es pugui arribar a uns resultats gràcies a la fluorescència que transmet la PCR, cal saber prèviament quin dels dos encebadors d'al·lel específic (1 o 2) té la mateixa base nitrogenada que el cassat de fluorescència verda i quin té la mateixa que el de fluorescència taronja perquè només se sap quina base nitrogenada té cada línia parental en aquella regió del genoma (les 10 línies de melons restants, no se sap quin SNP posseeixen en aquesta regió, si el mateix que Pell de Gripau o el mateix que Vedrantaís).
- Per tal de poder estudiar bé el DNA és estrictament necessari recórrer al mètode de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), per ampliar la mostra de DNA i poder percebre la fluorescència.
- Si el SNP, en comptes de ser una G, fos una T, seria l'al·lel específic2 el que hauria iniciat la PCR, en comptes de l'al·lel específic1. Per tant, seria l'altre cassat FRET el que hauria participat del procés i, d'aquesta manera, el color que s'hauria observat, hauria set un altre. Per aquest motiu, és el color rebut el que permet saber que el SNP correspon a una G.
- Com s'ha esmentat en un dels punts anteriors, el primer component de la tècnica KASPar és la mostra de DNA qualificada i quantificada dels 12 melons amb els SNP d'interès (marcadors moleculars). En l'experiment en qüestió i, gràcies a les dades facilitades pels investigadors d'IRTA i el CRAG, només s'ha utilitzat 14 SNP, 7 dels quals formen part

d'una regió específica del cromosoma 8 del genoma del meló i, els altres 7 SNP, d'una regió, també específica, del cromosoma número 9. Això és degut al temps del qual es disposa per portar a terme l'experiment (2 setmanes) ja que és mínim i si es genotipifiquen tots els SNP que es localitzen en cadascun dels cromosomes del genoma del meló, l'estudi té una durada d'anys de recerca al laboratori.

Finalment, només explicar que s'han utilitzat aquests SNP d'aquestes regions perquè gràcies a la recerca prèvia dels investigadors, se sap que el gen responsable del color taronja de la polpa del meló (conté beta-carotè) es troba en un punt concret i indeterminat (el qual és el que s'acabarà determinant en la nostra recerca) d'aquesta regió del cromosoma número 9 i el gen responsable del color blanc/verd (no conté beta-carotè) es localitza en un punt de la regió del cromosoma número 8. Per tal d'aconseguir aquesta informació, els investigadors també han genotipificat els melons en la seva recerca, tal i com es podrà veure en el pròxim apartat que porta com a títol: Mapa Genètic i QTL Anàlisi.

MATERIAL PER GENOTIPIFICAR ELS 12 MELONS:

- Bata de laboratori
- Guants de laboratori
- Paper de plata
- Paper film
- Tubs eppendorf
- Pipetes
- Plat amb forats
- Congelador
- Ordinador amb el programa LightCyclers
- Encebadors A1, A2 i C1 per separat.
- Barreja PCR:
 - Aigua PCR
 - MasterMix de KASPar 2x (en formen part els cassets FRET i la Taq polimerasa).
 - KASPar AssayMix (barreja dels 3 encebadors A1, A2 i C1).
 - 12 mostres de DNA

MÈTODE (PROTOCOL al laboratori):

1. En primer lloc cal dissenyar els encebadors, utilitzant les seqüències flanquejades dels SNP (cal escollir la base nitrogenada que es vol col·locar al final de la seqüència de DNA de cada encebador, segons la base nitrogenada que formi part del SNP, ja que ha de ser la complementària a aquesta) amb el Software PrimerPicker. D'aquesta manera s'obtenen dos encebadors sentit d'al·lel específic (A1 i A2) els quals difereixen en el SNP del nucleòtid i en el color del casset FRET que posseeixen (HEX o FAM), i un encebador comú antisentit (C1). Aquest encebador no consta de cap casset FRET ja que és un oligosacàrid ³⁶normal. Per aquest motiu, els encebadors A1 i A2 s'han de protegir de la llum però amb el C1 no és necessari.
2. El segon pas consisteix en preparar una barreja dels tres encebadors seguint les següents concentracions: 12 µmols de A1, 12 µmols de A2 i 30 µmols de C1.



Il·lustració 85. Preparació barreja dels tres encebadors. (Fotografia pròpia)

3. És necessari tenir present que després de l'extracció de DNA, la mostra pot ser utilitzada directament o bé pot ser diluïda en proporció (1:5, 1:10). És important afegir sempre els controls requerits, els dos al·lells homozigots (Pell de Gripau i Vedrantaís), els heterozigots i el control negatiu (aigua). Tots ells extrets i qualificats prèviament (extracció i qualificació del DNA).

³⁶ Glúcids formats per una cadena curta de monosacàrids units per enllaços O-glicosídics, amb un nombre d'unitats monomèriques entre 2 i 10, típicament.

4. Finalment, es prepara la barreja PCR sobre gel en un tub eppendorf protegit de la llum amb paper de plata. Les concertacions de cada mostra són les següents:

- 1,89 μL d'aigua PCR
- 4 μL de MasterMix de KASPar 2x
- 0,11 μL de KASPar AssayMix
- 2 μL de DNA

S'ha de tenir molta cura de les mostres preparades ja que contenen els fluorofors ³⁷, aquests, necessiten estar protegits de la llum en tot moment.



Il·lustració 86. Preparació de la barreja PCR dins el gel. (Fotografia pròpia)

5. A continuació es pipetegen 6 μL de barreja de PCR en cada foradet del plat i, després, s'afegeix 2 μL de DNA a cada foradet.

³⁷ Component d'una molècula que fa que aquesta sigui fluorescent.

	Chr08.59	Chr08.61	Chr08.62	Chr08.63	Chr08.64	Chr08.65	Chr08.66								
Melon 1															
Melon 2															
Melon 3															
Melon 4															
Melon 5															
PS															
VED															
NC															

	Chr09.67	Chr09.68	Chr09.69	Chr09.71	Chr09.72	Chr09.73a	Chr09.73b								
Melon 1															
Melon 2															
Melon 3															
Melon 4															
Melon 5															
PS															
VED															
NC															

	Chr08.59	Chr08.61	Chr08.62	Chr08.63	Chr08.64	Chr08.65	Chr08.66								
Melon 6															
Melon 7															
Melon 8															
Melon 9															
Melon 10															
PS															
VED															
NC															

	Chr09.67	Chr09.68	Chr09.69	Chr09.71	Chr09.72	Chr09.73a	Chr09.73b								
Melon 6															
Melon 7															
Melon 8															
Melon 9															
Melon 10															
PS															
VED															
NC															

Il·lustració 87. Plantilla de cadascun dels platets utilitzats. S'observen els 7 SNP o marcadors moleculars del cromosoma 8 (els dos platets de la part superior) i els 7 del cromosoma 9 (els dos platets de la part inferior). Verticalment es pipeteja la barreja PCR i horitzontalment el DNA (a excepció de l'última fila que és el grup control i s'hi afegeix aigua) . (Fotografia pròpia)



Il·lustració 88. Es pipeteja 2 ul DNA a cada foradet de la plata, dins el gel. Els tubs estan coberts amb paper de plata perquè contenen la barreja de la PCR. (Fotografia pròpia)

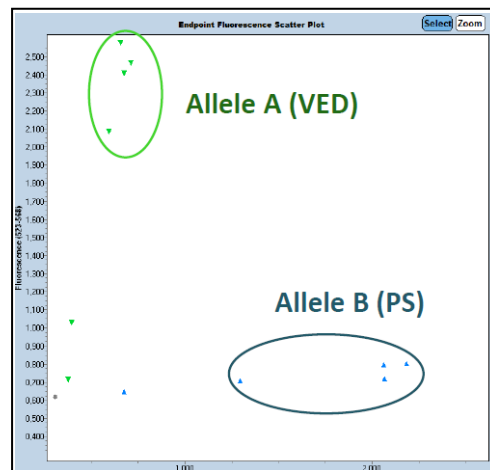


Il·lustració 89. Es tira la part superior de plàstic de la pipeta, al recipient dels residus, cada vegada que es pipeteja una mostra de DNA diferent. (Fotografia pròpia)

- En darrer lloc es cobreix el plat amb paper de film i es centrifuga. Aleshores, el plat ja està llest per la genotipificació però abans es guarda 4-5 hores a 4°C a la foscor.

7. Per tal de genotipificar, cal utilitzar el programa LightCyclers. Es selecciona l'opció de KASPar Genotyping, analysis, endpoint genotyping i, finalment, clicar a calculate. A continuació apareix una taula amb les dades a la pantalla de l'ordinador i el resultat pot ser exportat en forat .txt clicant el botó dret del ratolí.

RESULTATS:



Il·lustració 90. Els al·lels A posseeixen una guanina i els al·lels B una citosina

En primer lloc, es crea aquesta gràfica, la qual indica quants i quins melons són els que tenen la mateixa base nitrogenada que Pell de Gripau i quins són els que tenen la mateixa que Vedrantaís.

A la part superior esquerra es troben els que posseeixen una citosina en aquesta regió concreta del DNA (com Vedrantaís) i a la part inferior dreta els que tenen una guanina en aquesta mateixa posició (com Pell de Gripau). Els que no queden a cap regió definida, pot ser perquè no han estat ben autopol·linitzats i, per tant, no són línies purament homozigotes, o bé, perquè la preparació de la genotipificació (protocol) al laboratori, no ha estat del tot ben executat.

A continuació, aquestes dades obtingudes en forma de gràfica, es passen en format taula, de manera que es poden observar més detalladament.

		Chromosome 8							Chromosome 9							
		Chr08.59	Chr08.61	Chr08.62	Chr08.63	Chr08.64	Chr08.65	Chr08.66	Chr09.67	Chr09.68	Chr09.69	Chr09.71	Chr09.72	Chr09.73a	Chr09.73b	
Chromosome 8	Melon 1	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	Melon 2	B	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	Melon 3	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	Melon 4	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	Melon 5	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	PS	B	B	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	VED	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	CN															
	Chromosome 9	Melon 6	B	B	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B
		Melon 7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Melon 8		-	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Melon 9		B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
Melon 10		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
PS		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
VED		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
CN																

Il·lustració 91. Aquesta taula mostra els resultats de la tècnica KASPar. A partir de la fluorescència de la PCR, s'ha pogut identificar cada SNP de cada meló a quina varietat correspon, si a Pell de Gripau o a Vedrantaís

Com s'observa, totes les lletres A de color lila signifiquen que la base nitrogenada d'aquell SNP és igual que el de Vedrantaís. Si és una B de color verd vol dir que és com la de Pell de Gripau. Això es pot saber fàcilment perquè tots els quadradets de les files de Vedrantaís (VED) són de color lila mentre que els de les files de Pell de Gripau (PS), són de color verd a excepció del marcador molecular número 73 a del cromosoma 9. Això és degut a que, segurament, durant el procés de pipetejar les mostres de DNA dins els foradets dels plats, encara queden restes de la mostra de DNA anterior i es mesclen. Pel que fa a les caselles blanques amb una ralla al mig, significa que no s'han pogut genotipificar perquè no s'ha seguit correctament el protocol. Com que els forats del plat on es pipetegen les mostres de DNA i la barreja de la PCR són molt petits i estan molts junts, és fàcil cometre errors. Per això és molt útil marcar amb un retolador permanent els forats que ja han estat omplerts.

En útil lloc, es pot veure que les files del grup control (aigua) estan completament buides. Això vol dir que els resultats de la prova són vàlids.

Les dues barres, verda i taronja, que es troben a la banda dreta de cada taula fan referència al color de la polpa del meló. El gen responsable del color taronja es localitza al cromosoma número 9 i el del color blanc/verd al número 8.

OBSERVACIONS I CONCLUSIONS:

La genotipificació és, sens dubte, la fase de més llarga durada de tot l'experiment.

El primer objectiu consisteix en aprendre com funciona la tècnica PCR. En el nostre cas, aquesta tècnica s'ha portat a terme a partir del KASPar i s'ha pogut arribar a la conclusió de que sense ampliar les mostres de DNA, no és possible percebre el color fluorescent i, per tant, tampoc es pot descobrir quins SNP provenen de cada varietat parental de meló.

En segon lloc, el següent objectiu consisteix en aprendre a interpretar els resultats obtinguts amb la reacció en cadena de la polimerasa. Una vegada passes les dades a la taula es veu clarament quins SNP provenen de la varietat Pell de Gripau i quins de la Vedrantaís ja que a més a més de les lletres també es distingeixen pel color dels quadradets.

Finalment, els tres últims objectius consisteixen en entendre quina utilitat té la genotipificació dels melons mitjançant marcadors moleculars. Després de realitzar aquesta etapa de l'experiment ha quedat demostrat que sense els marcadors moleculars no és possible genotipificar mitjançant la tècnica KASPar ja que esdevindria impossible recórrer al mètode de fluorescències pel fet de que no es tindria coneixença de cap base nitrogenada dels genomes.

La tècnica KASPar (PCR) és un sistema de genotipificació que permet genotipificar el genoma d'un gran nombre d'individus, en molt poc temps. Si no es fa ús d'aquesta tècnica, cal seqüenciar els genomes de totes les línies d'individus que s'empren en l'experiment i observar les variacions que es presenten entre les diferents seqüenciacions. Aquest procediment requereix molt de temps i no és tan precís com KASPar.

3.5. Fase 5: Resultat final de l'experiment: quin és el gen responsable del color taronja?

Després de genotipificar els 12 melons i obtenir els resultats, el següent pas consisteix en comparar el genotip de cada meló amb el seu respectiu fenotip. D'aquesta manera, és possible descobrir les associacions que existeixen entre els genotips i fenotips. Una associació es produeix quan més de tres línies de melons posseeixen la mateixa base nitrogenada, en el mateix marcador, i el mateix fenotip.

3.5.1. Del genotip al fenotip

A partir de les dades obtingudes amb la fenotipificació dels melons i les de la genotipificació dels mateixos, es pot localitzar entre quins marcadors moleculars es troben els dos gens responsables del color de la polpa del meló. Per aconseguir-ho, cal relacionar el genotip i el fenotip dels diferents melons, amb els de les dues línies parentals. En el cas del gen responsable del color taronja, cal fixar-se amb la línia parental Vedrantaïs i en el cas del gen responsable del color blanc amb la línia Pell de Gripau.

PROCEDIMENT:

1. En primer lloc, per descobrir entre quins marcadors moleculars es localitzen els dos gens responsables del color de la polpa del meló, cal recórrer a les dues taules de genotipificació, amb els 12 melons. Una taula conté els 7 marcadors del cromosoma 9 (a partir d'aquesta taula es busca el gen taronja) i l'altra taula conté els 7 del cromosoma 8 (a partir d'aquesta es busca el gen verd).

➤ Chromosome 9

	Chr09.67	Chr09.68	Chr09.69	Chr09.71	Chr09.72	Chr09.73a	Chr09.73b	Pheno
Melon 1	B	B	B	-	B	B	-	
Melon 2	B	A	B	B	B	B	-	
Melon 3	-	B	B	B	B	B	B	
Melon 4	B	A	A	A	A	A	B	
Melon 5	B	A	A	A	A	A	B	
Melon 6	B	A	A	A	B	B	B	
Melon 7	B	B	B	-	B	B	B	
Melon 8	-	B	B	B	B	B	B	
Melon 9	B	B	-	-	A	A	B	
Melon 10	B	A	A	A	A	A	B	
PS	B	B	B	B	B	B	B	
VED	A	A	A	A	A	A	A	

Allele A (VED)
Allele B (PS)

Il·lustració 92. Resultats de la genotipificació del cromosoma 9. Les A són al·lels provinents de Vedrantaís i les B al·lels provinents de Pell de Gripau.

2. El següent pas, és el més important de tot l'experiment: comparar el genotip amb el fenotip de cada meló. Per això s'afegeix a la banda dreta de la taula els fenotips de cada meló.

➤ Chromosome 8

	Chr08.59	Chr08.61	Chr08.62	Chr08.63	Chr08.64	Chr08.65	Chr08.66	Pheno
Melon 1	B	-	B	B	B	B	B	white
Melon 2	B	B	B	-	B	B	B	white
Melon 3	A	B	B	B	B	B	B	white
Melon 4	B	B	B	B	B	B	B	orange
Melon 5	B	B	B	B	B	B	B	orange
Melon 6	B	B	B	B	-	B	B	white
Melon 7	A	A	A	A	B	B	B	white
Melon 8	-	B	A	A	A	A	B	Green
Melon 9	B	B	-	B	B	B	B	orange
Melon 10	B	B	B	B	B	B	B	orange
PS	B	B	B	B	B	B	B	white
VED	A	A	A	A	A	A	A	orange

Allele A (VED)
Allele B (PS)


RTA CROG

Il·lustració 93. Taula amb els resultats de genotipificació i fenotipificació (cromosoma 8)

> Chromosome 9

	Ch09.67	Chr09.68	Chr09.69	Chr09.71	Chr09.72	Chr09.73a	Chr09.73b	Pheno
Melon 1	B	B	B	-	B	B	-	
Melon 2	B	A	B	B	B	B	-	
Melon 3	-	B	B	B	B	B	B	
Melon 4	B	A	A	A	A	A	B	
Melon 5	B	A	A	A	A	A	B	
Melon 6	B	A	A	A	B	B	B	
Melon 7	B	B	B	-	B	B	B	
Melon 8	-	B	B	B	B	B	B	
Melon 9	B	B	-	-	A	A	B	
Melon 10	B	A	A	A	A	A	B	
PS	B	B	B	B	B	B	B	
VED	A	A	A	A	A	A	A	

Allele A (VED)
Allele B (PS)



Il·lustració 94. Resultats de genotipificació i fenotipificació (cromosoma 9)

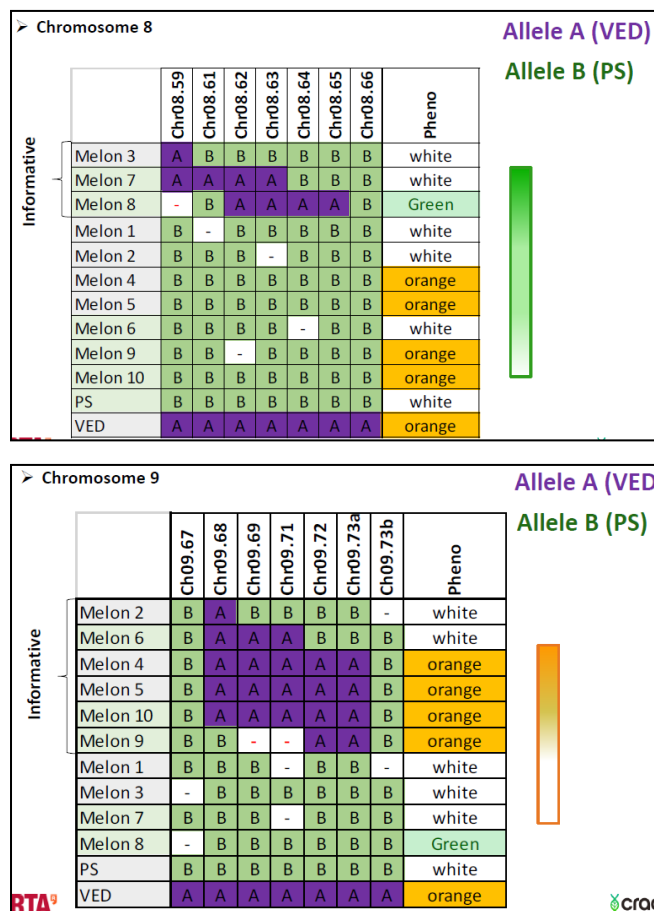
3. En el tercer pas, cal fixar-se que, en la taula del cromosoma número 9, la línia parental que posseeix la polpa de color taronja és la Vedrantaís i que les seves bases nitrogenades (de tots els marcadors moleculars) es representen amb una A de color lila. Per tant, s'ordenen les 10 línies de melons segons si tenen alguna base nitrogenada igual que la línia Vedrantaís (les que sí que en tenen es col·loquen a la part superior de la taula). Cal col·locar en a la part més superior les línies de melons que tenen la base nitrogenada coincident amb el meló Vedrantaís al marcador de més cap a l'esquerra de la taula, tal i com s'observa a la imatge 95. Són els casos de les línies de meló 2, 6, 4, 5, 10 i 9.

Cal portar a terme el mateix pas amb la taula del cromosoma número 8, **agafant també com a referència la línia parental Vedrantaís. S'agafa com a referent el meló Vedrantaís i no el Pell de Gripau perquè un dels 10 melons té la polpa de color verd i és impossible que en el nostre experiment el meló Pell de Gripau posseeixi el gen de color verd ja que la seva polpa és de color blanc i, a més a més, aquest meló Pell de Gripau utilitzat ha de ser obligatòriament homocigot. Per tant, si la polpa del Pell de Gripau és blanca, tots els al·lels del gen verd/blanc han d'aportar informació perquè aquest caràcter sigui blanc.**

En canvi, el meló Vedrantaís, com que és de color taronja (gen dominant) i és el que es representa al fenotip, és impossible saber a simple vista si el seu gen recessiu

té els dos al·lells que aporten informació pel color verd o pel color blanc. L'única manera de comprovar-ho consisteix en crear híbrids a partir del meló Pell de Gripau i del Vedrantaís. Si tots els híbrids que s'obtenen tenen la polpa de color blanc, significa que el gen recessiu del meló Vedrantaís conté dos al·lells amb informació perquè la polpa sigui blanca. En canvi, si s'obté un meló de polpa verda, vol dir que aquest gen recessiu està format per dos al·lells que aporten informació perquè la polpa sigui verda. En l'experiment en qüestió, un dels melons posseeix la polpa verda, per tant, el gen recessiu del Vedrantaís aporta informació perquè el caràcter sigui verd.

De moment, en aquest pas, cal col·locar a la part superior de la taula aquells melons que tenen bases nitrogenades coincidents amb les de Vedrantaís, deixant de banda el seu fenotip. N'és el cas dels melons 3,7 i 8.



Il·lustració 95. Les línies de melons que posseeixen bases iguals que el meló Pell de Gripau es col·loquen a les files superiors de la taula

4. A continuació, en la taula del cromosoma número 9, es marquen les associacions que hi ha entre les línies que tenen alguna base nitrogenada igual que la línia parental de Vdrantais. Cal recordar que una associació es produeix quan la base nitrogenada dels marcadors i el fenotip coincideixen amb els de Vdrantais. Aquest és el cas dels melons 4, 5, 10 i 9.


Amb aquesta relació del fenotip i del genotip, s'arriba a la conclusió de que el gen responsable del color taronja s'ha de trobar per força en una regió determinada situada entre aquests dos marcadors: el 72 i el 73a.

En el cas de la taula del cromosoma 8 (gen verd), el procediment per trobar entre quins dos marcadors es localitza el gen és una mica diferent. El que cal fer és esbrinar quines bases nitrogenades posseeixen igual el meló número 8 (que és el que té la polpa de color verd) i el meló Vdrantais, però que no posseeixin els altres dos melons que tenen bases nitrogenades iguals que el Vdrantais i la polpa de color blanc (melons 3 i 7). Cal fer-ho així perquè els melons que tenen la polpa blanca segur que no tenen el gen recessiu verd ja que han de ser homozigots i, per tant, no poden tenir un al·lel dominant blanc i un al·lel recessiu verd (els dos al·lells del gen recessiu). Per tant, el resultat final és que el gen responsable del color verd/blanc de la polpa del meló es localitza entre els marcadors 64 i 65 de la línia número 8 i de la línia Vdrantais.

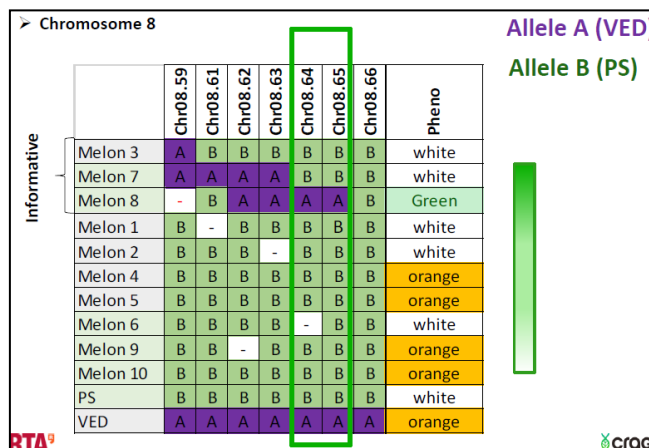
Chromosome 9

	Ch09.67	Ch09.68	Ch09.69	Ch09.71	Ch09.72	Ch09.73a	Ch09.73b	Pheno
Melon 2	B	A	B	B	B	B	-	white
Melon 6	B	A	A	A	B	B	B	white
Melon 4	B	A	A	A	A	A	B	orange
Melon 5	B	A	A	A	A	A	B	orange
Melon 10	B	A	A	A	A	A	B	orange
Melon 9	B	B	-	-	A	A	B	orange
Melon 1	B	B	B	-	B	B	-	white
Melon 3	-	B	B	B	B	B	B	white
Melon 7	B	B	B	-	B	B	B	white
Melon 8	-	B	B	B	B	B	B	Green
PS	B	B	B	B	B	B	B	white
VED	A	A	A	A	A	A	A	orange

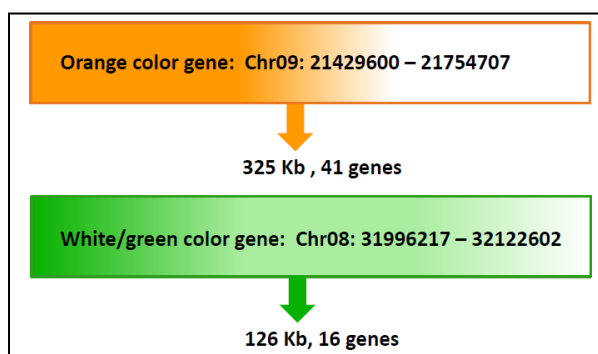
Allele A (VED)
Allele B (PS)

RTA⁹ 

Il·lustració 96. El gen responsable del color taronja es localitza entre els marcadors moleculars 72 i 73a



Il·lustració 97. El gen responsable del color verd/blanc es localitza entre els marcadors moleculars 64 i 65



Il·lustració 98. Localització dels gens i nombre de gens que es troben entre els dos marcadors

- Finalment, després de comparar els fenotips i els genotips de les 10 línies de melons (obtingudes a partir de l'encreuament entre una línia parental Pell de Gripau i una Vedrantaïs) amb les dues línies parentals, s'arriba a la conclusió de que el gen responsable del color taronja de la polpa del meló es localitza entre els marcadors moleculars 72, altrament conegut com a 21429600, i el 73a, també anomenat 21754707, a la posició de 104, 5 cM del cromosoma 9. No obstant, entre aquests dos marcadors existeixen 40 gens més a part del que es busca. Per tant, la seva recerca encara no ha finalitzat ja que falta descobrir quin d'aquests 41 gens que es troben entre aquests dos cromosomes és el nostre gen candidat. El mateix succeeix amb el gen responsable del color verd/blanc. Aquest, es troba entre els marcadors 31996217 o 64 i el 32122602 o 65 (a la posició de 147,52 cM del cromosoma 8), entre els quals s'hi localitzen 16 gens.

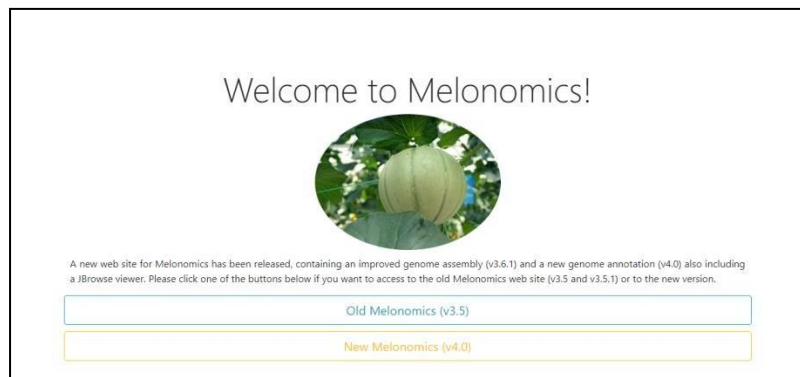
3.5.2. Melonomics

El darrer pas consisteix en cercar quin dels 41 gens que es troben entre els marcadors 72 i 73a del cromosoma 9 és el responsable del color taronja de la polpa del meló i quin dels 16 gens d'entre els marcadors 64 i 65 del cromosoma 8, ho és del color blanc de la polpa del meló.

Per portar a terme la recerca, s'utilitza la pàgina web anomenada Melonomics (www.melonomics.cat) en la qual s'hi troba el genoma complet del meló (tots els gens que constitueixen el meló).

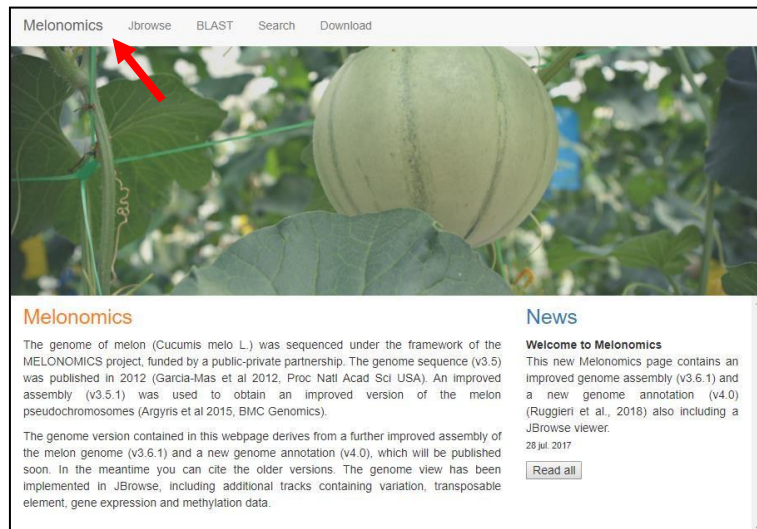
Per tal de realitzar aquesta part de l'experiment només fa falta un ordinador. Una vegada s'entra dins el cercador, els passos a seguir, per trobar el gen candidat, són els següents:

1. Escriure a la barra de la part superior de la pantalla l'enllaç www.melonomics.net.



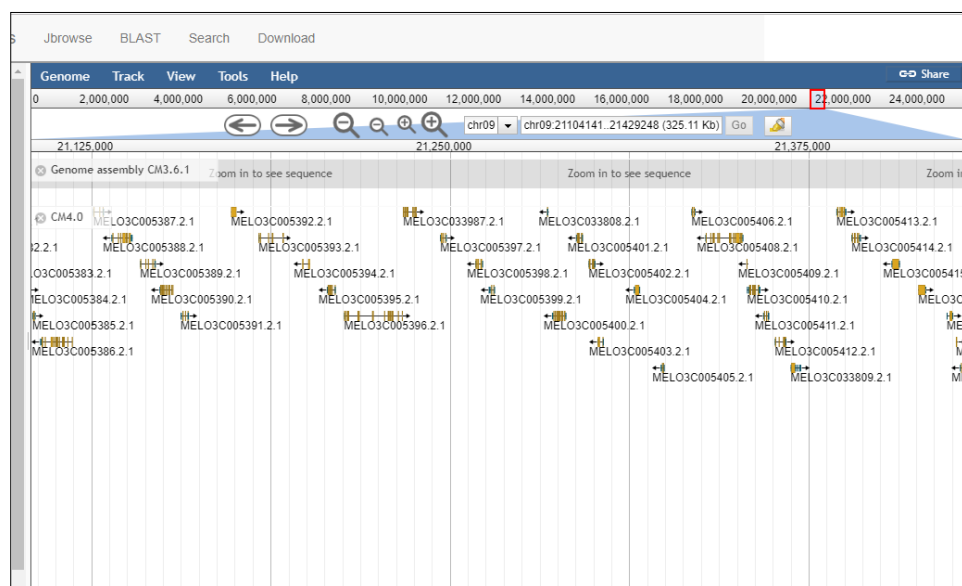
Il·lustració 99. Finestra principal de Melonomics

2. Clicar la paraula New.
3. Clicar sobre Jbrowse.



Il·lustració 100. Clicar Jbrowse

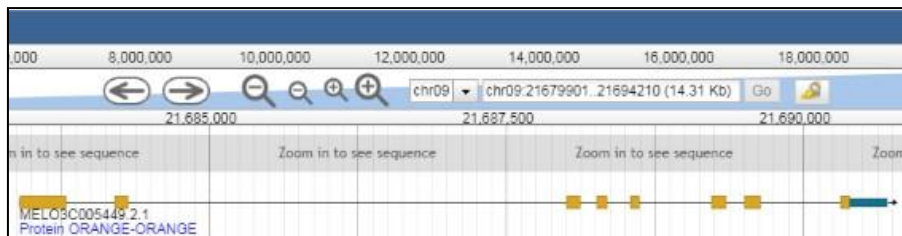
4. Seleccionar el cromosoma número 9 (Chr9).
5. Copiar l'interval (gen de l'esquerre i gen de la dreta).
6. Escriure les dimensions a les quals interessa observar els gens que existeixen entre l'interval anotat anteriorment (325.11kb).
7. Seleccionar l'opció CM4.0.
8. Guardar les dades obtingudes clicant a Save track data.



Il·lustració 101. Alguna dels gens que existeixen entre els dos marcadors moleculars del genoma del meló que han estat introduïts a la barra superior de la finestra

9. Seleccionar el format Sequinable.
10. Clicar sobre la paraula View.
11. En aquest moment s'observen els gens que hi ha entre aquests dos marcadors del cromosoma .

12. En total hi ha 41 gens, en el cas de la recerca del gen taronja, i 16 en el cas de la recerca del gen verd.
13. Cal llegir les descripcions de cada gen per tal de trobar el més adient a la nostra recerca.
14. Finalment, es localitza una proteïna sintetitzada per un gen, la descripció de la qual és adequada i té relació amb el caràcter estudiat (color de la polpa del meló). També s'obté la seqüència completa del gen.



Il·lustració 102. Part del genoma del meló en la qual es localitza el gen que codifica per la proteïna Orange-Orange

```

CCTTCGATTTCTCAGAAATCTTTCAAGCCGAAACACTCATAAGAATCGCAACAAAAGT
TGAACAATTTGCTTTCCTGTTTFTTGGATTTCATTCAATGGATCGAGTITTTGGTGGCTI
CATATCCAATCAATCATCTGATTCGACCTCACAGTTTCCGAATCGATTACTGTTGGAGC
ACTTGTTTCACTTCCAGGT TGAATTCCTGGTAAAGAACGGCAGAAGTTGAGCTCGAGGTG
GGGATGGCGATCCATGGCCCGGATTCIACCTGACTCTTCTTCTTCTTCTTCTTTTGCTC
CGTCTGTTGAATCTGATCCTTCGGATAAACTTCAGCCAGGTTGGTGAATCTTGCTTC
TGGTACCTCTGTATCTGGTTGGTTGAAGCATTTTGAGGCAACGCTTAGGAAAGTGAAA
TGAATGTTGGTTGTTGTTGTTGATGTTGATTTACGTGATGGAATTTGAAAAATGACTGG
ATAGTTTCTTGTGTTCTTTACTTTTGGAGCACTGCTACTTGAATAATGCTCGTGTATGG
TTGAAGGTTTGGATTGGATTGATTTGGTCGTTTTTGTGCTGATGATTTGAAGAATTTGTT
ATCAGTTCATATTTGCGAATACCATAAGTTCTGTTCTTATCCTACAAACTTTTTATGC
TTATTAAGTCGGCCATCTCCTTGGTTTTCTTCATGTGACAATTAGGAATAATTTAICTG
TAAATTAATGTTAACTTAACATGATTTTATGCAGTTTTTTGTATCATAGAGGGACCGGA
AACAGTACAAGATTTTGCAAAAATGGAAGTCAAGAAATTCAGGAGAACATTCGAAGTC
GTCGAACAAAAATTTCTTGCATATGGAAGAGGTGAGACTTAGTGGACATTTTGCCTAG
TAGTACGGACTATTCTCATGAACGATGATTATTCGCGCATATGAAATTTAAGTTTT
TAGATGTGTCCAAGATTTTCGTTACCTTGAAAAATCCTTACCAGCCAAAGCCGTCATTT
GGGGGACCCTGCCAAGTATTAGCATTATTTTCTGTGATGAGAGTGATAAATATGTG
TCAGACACTTGGATTTGGGCTATGATCCTTCTTCATCGTTCTCTATCAAACTCTCAT
GGTGACTTGATGGTTTTGTTGATCCCATGTCAGGATGTTTTATTCAGCTATTTGGAT
GGATCATTTTATAAAGTTAAAAAATAAATTTTCTTATGGAACTAAGCCTTGGTGCTA
TTAATACTGCTGATTTCTCTAATGTCGAATGCAGTATATGACTCTCTTCATTTTGGTG
TCACATGACTCATGTATCAGAATCATTGAAATCTGCTGCTCATCTTTTTGCATTATT
CTTTTGGCTTTGCGCTTTTGGCATACTTGATGCAAGCTTTTGGTTGGTCCGGTGGTTTT
TCTCATAATATGTTGATAATCTTTCATCTTTAATGGTTGGCATCCTTTCCATGATACT
AAGAGACCCCTTCGGCTAGCTTTCTTACCTGCATTTTTCTACACTTTGAGGGCCGAGCA

```

Il·lustració 103. Petita part de la seqüència del gen responsable del color taronja. Cada lletra correspon a una base nitrogenada

En el cas de la recerca del gen responsable del color taronja, es troba un gen amb la següent descripció: Proteïna Orange-Orange. El nom propi d'aquest gen és MELO3C005449. Pel que fa al gen responsable del color blanc/verd es descobreixen dos possibles gens candidats anomenats MELO3C003097 i MELO3C003100.

15. Mitjançant la descripció d'aquests tres gens i el seu nom propi és fàcil deduir que es tracta dels gens candidats del nostre experiment. No obstant, abans de difondre el

descobriments dels gens responsables del color de la polpa del meló, és totalment necessària la seva validació. Per aquest motiu s'anomenen gens candidats.

Cal tenir present que en el genoma hi ha més d'un gen que tenen funcions similars. Per assegurar que el gen candidat és realment el que es busca, s'utilitzen diverses tècniques. En el cas de l'experiment en qüestió, és fàcil trobar el gen candidat perquè la descripció d'aquest té relació amb el caràcter estudiat, però això no succeeix en tots els casos. Existeixen casos en què la proteïna que el gen sintetitza s'anomena amb un nom desconegut, el qual no manté cap relació amb el caràcter estudiat. Aleshores, és important fer recerca sobre la proteïna que dona lloc al gen candidat per aquell caràcter ja que si no es fa d'aquesta manera, en molts casos, és gairebé impossible descobrir el gen candidat.

OBSERVACIONS I CONCLUSIONS:

- En el cas dels melons amb polpa verda (fenotip), el nombre d'associacions (relacions fenotip i genotip) és molt menor que amb els melons amb la polpa de color taronja. Això és degut a que el gen dominant del caràcter del color de la polpa del meló és el gen de color taronja i, per tant, de l'encreuament entre el Pell de Gripau i el Vedrantaïs, en resulta un nombre molt més elevat de melons taronges que no pas de melons blancs.
- És realment fascinant comprovar com una variació d'una única base nitrogenada del gen d'una varietat respecte de l'altre, afecta el fenotip i en fa variar també el color de la polpa del meló.
- Queda demostrat que per tal de descobrir entre quins dos marcadors moleculars es localitza el gen candidat, és igual d'important la genètica com la part de fenotipificació dels melons a la qual, sovint, es dona més importància.
- Aquest tipus de localització del gen candidat (relacionant i comparant els fenotips i genotips de les diferents línies de melons) és possible de realitzar només en casos com el que s'acaba de veure. En el cas en qüestió, només es comparen els fenotips de 12 línies de melons (els uns amb els altres) i tan sols s'empren 7 marcadors pel cromosoma 8 i 7 pel cromosoma 9. Per tant, és una genotipificació i una fenotipificació a molt petita escala. En el cas de que s'experimentés amb més línies (varietats) de melons i s'empressin més marcadors flanquejats a més gens, seria impossible descobrir el gen candidat amb aquest mètode. La comparació de genotip-fenotip s'hauria de realitzar mitjançant un programa informàtic capaç de llegir i entendre les dades (a partir de les dades obtingudes en la genotipificació es crearia un mapa genètic amb els 12

cromosomes del meló i, després, s'introduirien les dades del fenotip al programa d'ordinador).

4. MAPA GENÈTIC I QTL ANÀLISI (experiment portat a terme pels investigadors del CRAG)

Per tal d'entendre millor quines dades han estat facilitades pels investigadors del CRAG a l'hora de realitzar la genotipificació dels 12 melons (etapa anterior), cal conèixer i visualitzar part de la seva pròpia recerca, la qual es basa en els mateixos principis, tècniques, protocols i objectius que la nostra.

Tal i com s'ha explicat anteriorment, la informació que ha estat donada pels investigadors ha estat que el gen responsable del color taronja i el gen responsable del color verd/blanc de la polpa del meló, es troben en unes regions determinades dels cromosomes 8 i 9.

Aquesta informació, l'han obtinguda després de genotipificar el centenar de melons amb els quals han treballat i **després de crear el mapa genètic i el mapa QTL de cadascun d'ells. Aquesta última part de la recerca és la que diferencia la seva de la nostra.**

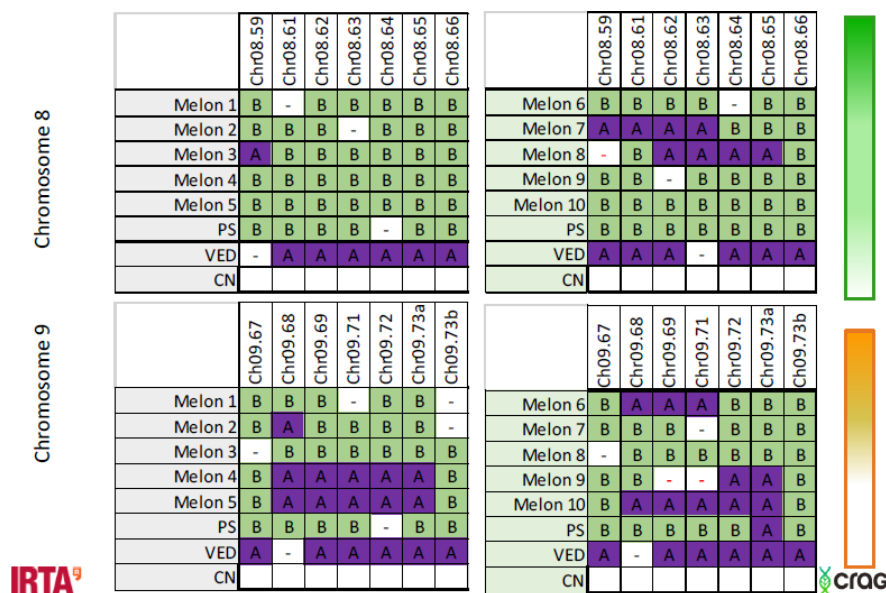
Per aquest motiu, en aquest apartat es treballa amb les dades del fenotip i del genotip del centenar de melons, obtingudes pels investigadors del CRAG.

Els mapes genètic són el procés que permet determinar l'ordre i la distància que existeix entre els diferents marcadors moleculars (SNP) del genoma.

4.1. Genotipificació

El procés de genotipificació portat a terme pels investigadors consta, exactament, dels mateixos passos seguits en el protocol anterior (en la nostra recerca). Per tant, es basa en la tècnica KASPar i en la fluorescència de la PCR. No obstant, els investigadors, utilitzen 20 marcadors moleculars (SNP) en cada cromosoma (en comptes de només utilitzar-ne 7 en el cromosoma 8 i 7 en el cromosoma 9 com s'ha estudiat anteriorment). El meló consta de 12 cromosomes en total, per tant, s'empren 240 marcadors moleculars.

L'objectiu principal de la genotipificació portada a terme pels investigadors, coincideix amb l'objectiu de la nostra recerca però, la metodologia utilitzada per arribar a assolir aquest mateix objectiu, és diferent en ambdues recerques per una simple raó: el nombre de cromosomes i el nombre de marcadors moleculars (SNP) emprats en cada situació. Tal i com es pot observar en les següents imatges (104 i 105), en la (105) és impossible descobrir a simple vista quins marcadors moleculars (SNP) formen part de la varietat Pell de Gripau i quins formen part de la varietat Vedrantaís pel fet de que s'empren 240 marcadors moleculars, s'estudien tots els cromosomes del genoma i es té un total de 100 melons. En canvi, mitjançant la genotipificació de la nostra recerca, sí que és possible de descobrir a simple vista ja que s'utilitzen 14 marcadors moleculars (7 al cromosoma 9 i 1 al cromosoma 8). Per tant, en el cas dels investigadors, és necessari passar les dades obtingudes al JoinMap software i crear una mapa genètic, per poder obtenir, posteriorment, un mapa QTL. Aquesta part de la seva recerca és la que, gràcies a les dades que ens han proporcionat, no ha estat necessària la seva execució en la nostra recerca.



Il·lustració 104. Resultats de la genotipificació obtinguts en la nostra recerca

locus name		4	8	9	14	15	17	19	20	23	28	30	33	35	41	45	46	47	51	52	55	58	59	60	73	76	82	83	88	91	92	99	10C	102	106	112	114	116	123	124	12					
chr01_341744 (a,b)		b	b	a	b	a	-	b	b	h	b	b	a	b	b	b	a	a	a	b	a	-	b	a	-	b	-	a	b	-	-	a	a	a	b	a	-	a	-	-	a					
chr01_950548 (a,b)		b	b	a	b	b	b	a	a	b	b	a	b	b	a	a	a	a	b	a	a	a	b	b	a	b	a	b	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a				
chr01_1315919 (a,b)		b	b	a	b	b	b	a	a	b	b	a	b	b	b	a	a	a	b	a	b	b	b	a	b	b	a	b	a	a	b	b	a	a	a	b	a	a	a	a	a	b				
chr01_1842032 (a,b)		b	b	a	b	b	-	b	b	b	b	b	a	b	b	b	b	a	a	-	a	b	b	b	b	b	b	a	a	b	-	a	-	-	b	a	a	a	-	a	b					
chr01_2424295 (a,b)		-	a	b	b	a	-	b	b	b	b	b	a	b	b	a	b	a	b	a	b	a	b	b	b	a	b	a	a	b	b	a	a	b	b	a	a	a	a	a	b					
chr01_3524124 (a,b)		b	a	b	b	a	-	b	b	b	b	b	a	b	b	a	b	a	b	a	a	b	a	a	b	a	b	a	b	a	b	a	a	b	a	b	a	b	a	a	a	b				
chr01_4565977 (a,b)		b	a	b	b	a	b	b	b	b	b	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a	a	a	b				
chr01_15540217 (a,b)		b	a	b	b	a	-	b	b	b	-	a	a	b	b	a	b	a	a	a	a	b	b	b	-	b	b	a	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a	a	-			
chr01_17465101 (a,b)		b	a	a	b	a	b	b	b	b	a	a	b	-	b	a	b	a	a	a	a	a	b	b	b	-	-	a	h	a	a	a	a	b	b	a	a	a	b	a	a	b				
chr01_19517945 (a,b)		b	a	a	b	a	-	b	b	b	b	a	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	b	a	b	b	b	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b				
chr01_22283666 (a,b)		b	a	a	b	a	b	b	b	b	b	a	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	b	a	b	b	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a			
chr01_28963069 (a,b)		a	a	a	b	a	-	b	b	b	a	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	b	b	b	a	a	a			
chr01_31889560 (a,b)		a	a	a	h	a	a	b	a	b	a	a	h	a	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	b	b	a	a	a	a	a	b	b	h	a	a	a	a				
chr01_32905826 (a,b)		a	a	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	b	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	h	b	a	a	a	b	a	b	b	h	a	a	a	a				
chr01_33619449 (a,b)		b	a	b	h	a	a	a	b	b	a	h	a	b	a	b	b	a	a	b	a	a	b	b	b	a	b	b	a	a	a	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a				
chr01_34158574 (a,b)		b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	h	a	b	a	b	b	a	a	b	a	a	b	a	b	a	b	b	a	a	b	b	b	a	b	b	a	a	a	a	a	a				
chr01_34697396 (a,b)		b	a	b	a	b	a	a	a	a	a	h	a	b	a	b	b	a	b	b	a	b	b	a	b	a	b	a	b	b	a	b	b	b	a	b	b	a	b	b	a	a	a			
chr01_35499953 (a,b)		b	-	b	a	b	a	a	a	a	a	h	a	b	a	b	b	a	b	a	a	b	a	b	a	b	a	b	b	b	b	b	b	a	b	b	a	a	b	a	b	b				
chr01_35896019 (a,b)		b	a	b	a	b	a	b	a	a	a	b	h	a	b	a	b	b	a	b	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	b	b	a	b	b	b	a	b	a	a	b	b			
chr01_36433391 (a,b)		b	-	b	a	b	-	b	a	a	a	h	a	b	a	b	-	a	b	a	b	b	a	b	b	a	b	a	b	b	a	b	b	-	a	b	b	a	a	b	b	b				
chr01_36734307 (a,b)		b	a	b	a	b	a	b	a	a	a	h	a	b	a	b	b	a	b	b	b	b	b	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	b	b	a	b	a	a	b	b			
chr02_475620 (a,b)		a	b	b	a	b	a	b	a	a	b	h	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	b	a	b	b	a	a	b	a	b	b	a	a	a			
chr02_687546 (a,b)		a	b	b	a	b	a	b	a	a	b	b	a	a	a	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	b	a	b	b	a	a	-	a	b	b	b	a	a				
chr02_25177727 (a,b)		b	b	a	a	b	b	a	a	a	a	h	a	b	b	a	a	a	a	b	b	b	a	a	b	b	a	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b			
chr02_25876579 (a,b)		b	b	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	b	b	a	b	a	a	b	a	b	b	b	-	b	b	b	a	a	-	h	b	a	a	b	a	a	a	a	b	a				
chr03_67303 (a,b)		a	a	b	a	b	b	a	b	a	b	a	b	b	b	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	b	a	b	-	a	a	b	b	a	a	a	a			
chr03_89298 (a,b)		a	a	b	a	b	-	a	b	a	b	a	b	-	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	-	b	-	b	a	a	-	-	b	a	a	a	a	a	b	b	-	a	a			
chr03_224049 (a,b)		a	a	b	a	b	b	a	b	a	b	a	b	b	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	b	b	a	b	b	b	a	-	-	a	a	b	b	a	a	a	a				
chr03_516776 (a,b)		a	a	b	a	b	b	a	b	a	b	a	b	b	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	b	a	b	h	a	a	b	a	a	a	a	a				
chr03_1806174 (a,b)		a	a	b	a	b	b	b	b	a	b	a	b	b	b	a	a	b	a	a	a	b	a	a	b	a	b	b	b	b	a	b	b	a	b	a	b	a	a	a	a	a				
chr03_3069540 (a,b)		a	-	a	-	b	-	b	b	b	a	b	a	a	a	a	b	b	a	-	a	b	b	a	b	b	b	-	b	b	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a			
chr03_3650054 (a,b)		a	a	a	a	b	b	b	a	a	b	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	a	b	a	a	b	b	b	b	b	b	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a			
chr03_4012175 (a,b)		-	-	a	b	b	-	b	-	a	b	a	a	a	a	a	-	-	a	-	a	-	b	b	-	b	b	-	a	-	-	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a				
chr03_11895049 (a,b)		a	b	a	b	a	b	b	a	a	a	h	a	b	a	b	a	b	a	a	b	b	a	b	b	a	b	a	b	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a	b	a		
chr03_17614888 (a,b)		a	b	a	b	b	a	b	a	a	a	h	a	b	b	a	b	a	b	a	b	a	b	b	a	b	a	b	a	a	b	a	a	a	b	a	a	b	a	a	b	b	a			
chr03_23162779 (a,b)		a	a	a	b	b	a	b	b	a	a	a	a	b	b	a	b	a	a	b	a	b	a	a	b	a	b	a	a	b	a	a	a	b	a	a	b	a	a	b	b	a	a			
chr03_24582893 (a,b)		a	a	-	a	b	a	b	b	b	a	a	a	h	b	a	b	a	b	a	b	a	b	b	a	a	a	a	a	b	a	-	a	a	a	b	a	-	a	a	a	b	a	a		
chr03_24738966 (a,b)		a	a	b	a	b	-	b	-	b	a	a	h	a	b	b	a	b	a	a	-	a	b	-	a	-	b	b	-	a	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a		
chr03_25719400 (a,b)		a	a	b	a	b	a	b	b	b	a	h	a	b	b	b	a	b	a	b	a	b	b	b	b	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a		
chr03_25923550 (a,b)		a	-	b	a	a	a	b	b	a	h	a	b	b	b	a	a	b	-	b	a	-	b	b	b	a	-	b	b	b	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a		
chr03_26026771 (a,b)		b	-	b	a	a	-	-	a	b	b	a	a	a	b	b	a	b	a	-	a	-	b	b	b	-	-	b	b	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a	
chr03_26244032 (a,b)		b	a	b	a	a	-	b	a	b	b	a	-	a	a	b	b	a	b	b	a	b	b	a	b	a	b	b	a	b	b	b	a	b	b	a	b	b	a	-	b	a	a	a	a	
chr03_26681530 (a,b)		b	a	b	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	a	a	a	b	b	b	b	a	a	b	b	b	a	b	b	a	b	b	a	b	b	a	a	a	a	
chr03_27059547 (a,b)		b	a	b	a	a	-	a	a	b	a	a	a	b	b	b	b	b	a	a	b	b	b	a	a	a	b	b	h	a	a	b	b	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	
chr03_27970879 (a,b)		b	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a	b	b	a	b	b	a	a	b	b	a	b	h	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	
chr03_29257789 (a,b)		b	a	b	a	a	-	a	h	a	a	b	h	-	-	a	b	a	b	b	a	a	b	b	a	-	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	
chr03_29809675 (a,b)		b	a	b	a	a	a	b	a	a	b	h	a	a	a	b	a	a	b	b	a	a	a	b	a	a	b	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Il·lustració 105. Petita part dels resultats obtinguts de la genotipificació en la recerca portada a terme pels investigadors

4.1.1. Anàlisi dels dos genotips

En primer lloc, és important conèixer la distribució de cada taula de genotipificació.

En la imatge número 104, les dues taules de la part superior fan referència al cromosoma 8 mentre que les dues de la part inferior fan referència al cromosoma 9. Cada fila correspon a una varietat de meló (12 en total, 2 de les quals són línies parentals). L'última fila correspon al grup control. Cada columna correspon a un marcador molecular (SNP). Aquest tipus de genotipificació es coneix com a genotipificació a petita escala i, per aquest motiu, és possible localitzar entre quins marcadors es troba el gen responsable del color taronja,

sempre i quan es comparin aquestes dades amb els fenotips de cada varietat. Per més informació consultar apartat número 3.5: Resultat Final de l'Experiment.

Pel que fa a la imatge número 105 representen una genotipificació a gran escala. Cada columna correspon a un meló diferent (la taula completa consta de 100 columnes, només 45 de les quals són visibles en la imatge) i cada fila correspon a un marcador molecular (n'hi ha 20 per cromosoma). A la part esquerra de la taula, es pot llegir el número de cromosoma en el qual es troba cada marcador molecular. En les imatges només s'hi aprecia part del cromosoma número 1 i del número 2.

Per tal d'analitzar la taula de genotipificació 105 cal saber que les "a" de color blau signifiquen que el marcador molecular (SNP) consta de la mateixa base nitrogenada que la varietat Pell de Gripau i que les "b" taronges signifiquen que té una base nitrogenada provinent del meló Vedrantaís. L'anàlisi de la taula es realitza per columnes. Per exemple, si s'observa la primera columna, la qual correspon al meló número 4, es veu que alguns marcadors moleculars (SNP) d'aquest meló, provenen de la varietat Pell de Gripau i d'altres de la Vedrantaís. En les regions del cromosoma número 1, en les quals dos marcadors moleculars consecutius tenen una lletra diferent (és el cas de l'onzè i dotzè marcador molecular, un té "a" i l'altre té "b") significa que la distància existent entre aquests dos marcadors moleculars és molt més gran que no pas si els dos tinguessin la mateixa lletra. Per exemple, el primer, el segon, el tercer i el quart marcador molecular tenen la lletra "b" de color taronja. Això vol dir que els 4 marcadors moleculars (SNP), tenen la mateixa base nitrogenada que la varietat Vedrantaís posseeix en aquestes 4 regions del genoma.

Ara, si s'analitza la taula per columnes, és fàcil donar-se compte de que entre l'últim marcador del cromosoma 1 i el primer marcador molecular del cromosoma 2, gairebé tots els melons experimenten un canvi de "a" a "b" o de "b" a "a". Això és degut, i seguint amb l'explicació anterior de la distància que existeix entre dos cromosomes, a que entre l'últim marcador molecular d'un cromosoma i el primer del següent cromosoma, existeix una distància molt més gran que entre qualsevol altre parell de marcadors moleculars (s'aprecia a la tercera fila de la imatge 105).

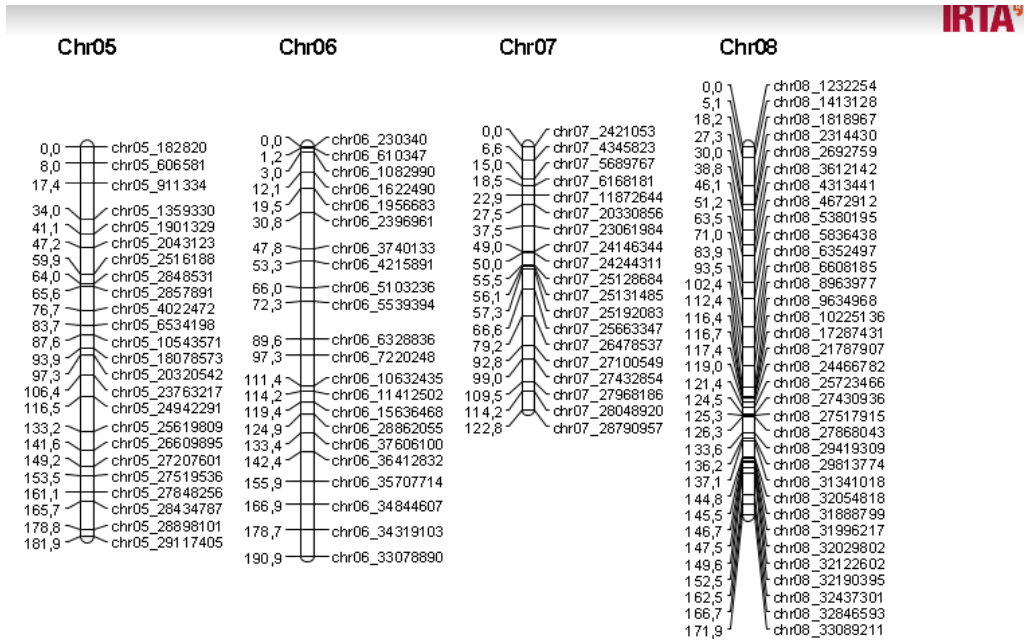
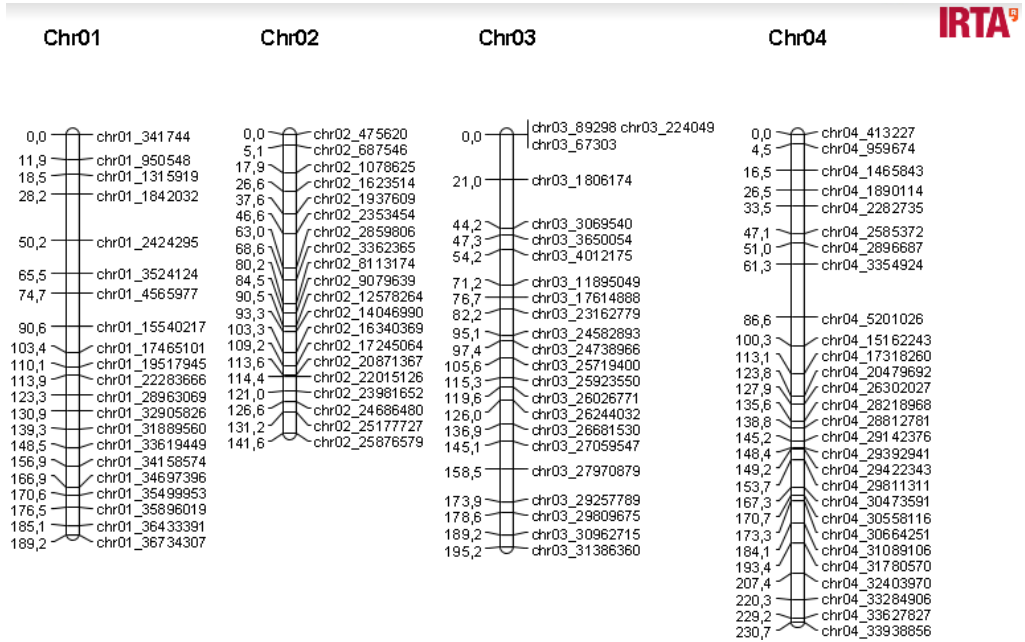
4.2. Mapa genètic

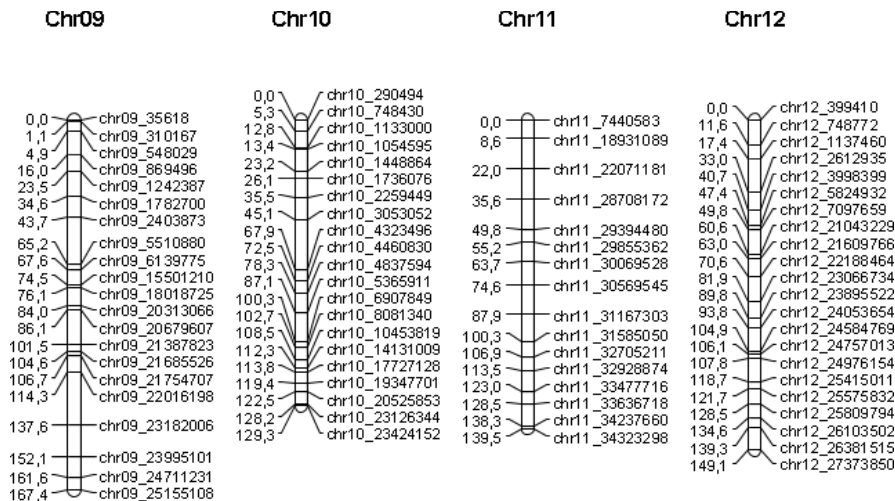
Mitjançant les dades obtingudes en la genotipificació del centenar de melons, es crea el mapa genètic que permetrà localitzar cada marcador molecular en una posició concreta d'un cromosoma concret. Per tal de crear el mapa genètic s'utilitza el software JoinMap.

El mapa genètic mostra els 12 cromosomes del meló i tots els marcadors agrupats per cromosomes. El mapa genètic es pot comparar amb el mapa de carretera: els cromosomes són les carreteres i cada marcador molecular correspon a un marcador de km d'aquesta carretera. D'aquesta manera es pot saber amb precisió en quin punt del cromosoma es troba el marcador. La unitat de mesura emprada per mesurar-ho s'anomena centimorgan (cM).

La distància entre dos cromosomes consecutius, per tant, es mesura amb cM. Quan es parla de saber la distància entre dos marcadors, vol dir la distància entre dues bases nitrogenades diferents, les quals poden provenir de la mateixa línia parental o bé una base d'una línia parental i l'altra base de l'altra línia parental. Si entre un marcador molecular i el següent existeix una distància d'1cM, significa que cada 100 melons es produirà un canvi en aquesta zona del genoma. Cal recordar que un canvi, tal i com s'ha vist en l'anàlisi de la taula de genotipificació, portada a terme pels investigadors, es produeix quan en una mateixa columna, un marcador molecular (SNP) té la mateixa base nitrogenada que una de les dues línies parentals i que el següent marcador la té igual que l'altra línia parental (a-b o b-a). Per tant, si s'observa el cromosoma número 5 del mapa genètic, es comprèn que entre el primer i el segon marcador hi ha una distància de 8 cM i, que per tant, cada 100 melons, 8 d'ells experimentaran un canvi (també conegut com a *crossover*) en aquesta regió del cromosoma.

El nombre de canvis (és el mateix que dir la distància) entre un marcador i el següent, no tenen res a veure amb la grandària del cromosoma. Aquesta distància depèn de la capacitat de recombinar-se (*crossover*) que posseeix el cromosoma. Cada recombinació és un canvi entre un marcador i el següent, per tant, la distància que els separa augmenta.





Il·lustració 106. Marcadors moleculars agrupats en els 12 cromosomes

4.3. QTL anàlisi

En darrer lloc, per finalitzar la recerca, es crea un mapa QTL a partir de les dades obtingudes en la fenotipificació i genotipificació del centenar de melons i el mapa genètic, mitjançant el programa MapQTL.

MapQTL és un programa d'ordinador que serveix per l'anàlisi del Locus de caràcters quantitius (QTL) en experiments amb poblacions d'espècies diploides. Amb l'anàlisi de QTL, regions del genoma que són responsables de variacions fenotípiques en el tret quantitau investigat (en l'experiment en qüestió és el color de la polpa del meló) poden ser detectats i, posteriorment, s'estimen els efectes genotípics associats.

MATERIAL:

- MapQTL Software
- Dades obtingudes amb la fenotipificació dels 100 melons
- Dades obtingudes amb la genotipificació dels 100 melons
- Mapa genètic

4.3.1. Anàlisi de les dades del fenotip

RIL	Orange_1	Green_1	RIL	Orange_1	Green_1
4	0	0	153	1	-
8	1	-	160	1	-
9	1	-	169	0	1
14	1	-	171	1	-
15	1	-	172	0	1
17	0	1	176	1	-
19	0	0	177	1	-
20	1	-	185	0	0
23	0	0	186	1	-
28	0	1	190	1	-
30	0	0	191	1	-
33	1	-	192	1	-
35	1	-	197	1	-
41	1	-	199	1	-
45	0	1	200	1	-
46	1	-	202	0	0
47	1	-	203	0	1
51	0	1	206	1	-
52	0	0	213	1	-
55	1	-	003A	0	1
58	0	1	011A	0	1
59	0	0	019A	0	0
60	0	0	021A	1	-
73	1	-	023A	1	-
76	0	1	030A	1	-
82	0	1	033A	1	-
83	1	-	091A	1	-
88	1	-	097A	0	1
91	1	-	098B	0	0
92	1	-	100A	1	-
99	1	-	102A	0	1
100	1	-	106A	1	-
102	0	1	107A	1	-
106	1	-	114A	1	-
112	0	0	130A	0	0
114	1	-	133A	1	-
116	1	-	133B	0	1
123	0	1	147A	1	-
124	1	-	159A	0	0
126	0	0	176A	1	-
131	1	-	177A	1	-
140	0	0	190A	1	-
141	1	-	196A	0	1
143	1	-	204A	1	-
147	1	-			

Il·lustració 107. Taula que mostra el color de la polpa de cada meló

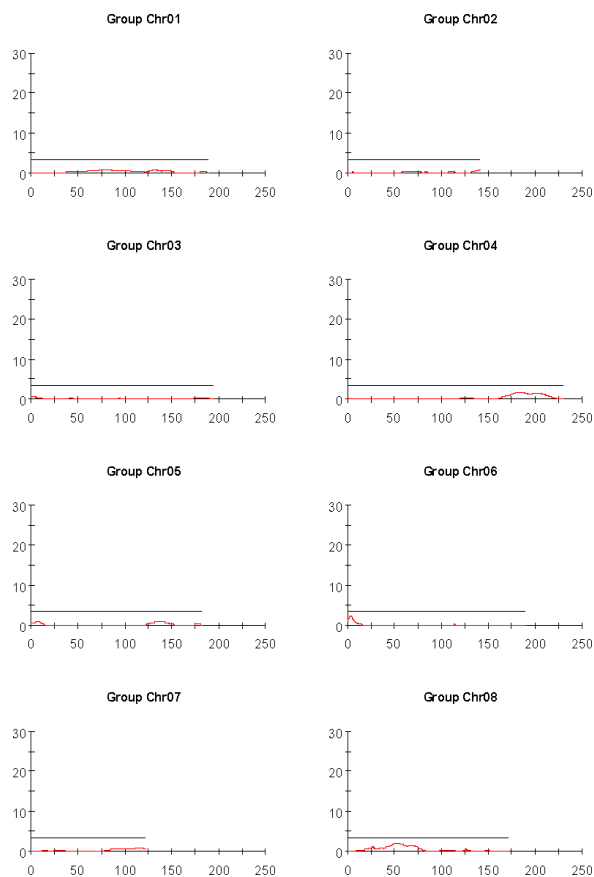
En primer lloc, és essencial passar les dades obtingudes sobre el color de la polpa del centenar de melons en la fenotipificació, en una taula com l'anterior. Per tal d'entendre la taula, cal recordar que el color de la polpa del meló depèn de dos gens que es troben sota una epístasis dominant, en la qual el gen dominant és el responsable del color taronja i el gen recessiu és el responsable del color verd/blanc (com que el meló és un individu diploide, cada gen consta de dos al·lells, un de recessiu i un de dominant). En el casos en els que la polpa del meló és de color taronja, es marca un 1 a la primera casella i una ralla a la segona casella ja que el gen dominant és el que sempre s'observa en el fenotip. En els casos en els que el meló posseeix la polpa de color verd, s'escriu un 0 a la primera casella (significa que s'expressa l'al·lel recessiu del gen dominant, el del no color taronja) i un 1 a la casella de la dreta. Per últim, si el meló té la polpa blanca, s'escriu un 0 a cada casella. D'aquesta

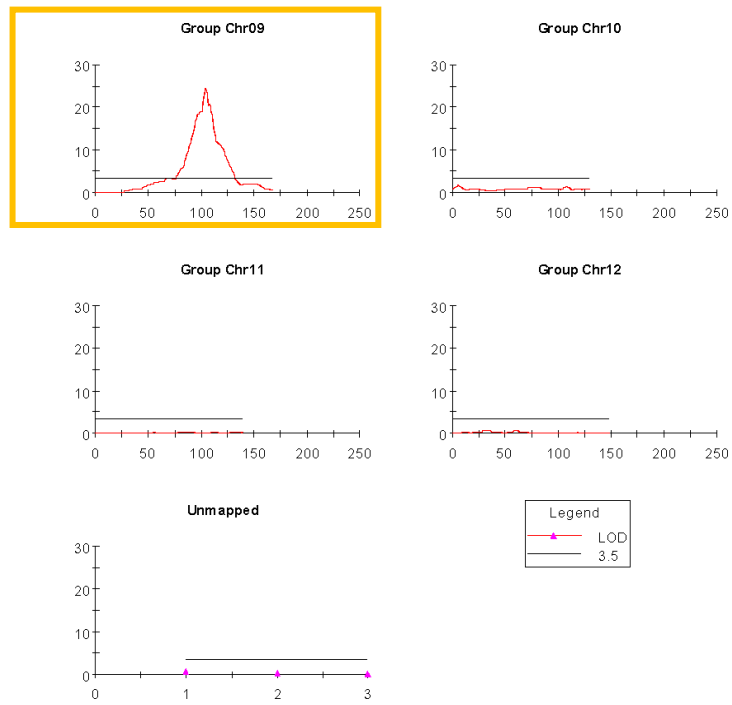
manera, mitjançant els números, el lector informàtic del programa Map QTL és capaç d'entendre les dades introduïdes.

4.3.2. Creació i resultats de l'anàlisi QTL

Després d'introduir les dades necessàries dins el programa Map QTL, és aquest mateix qui relaciona tots els fenotips amb tots els genotips, agafant de referència els de les dues línies parentals (Pell de Gripau i Vedrantaïs). Finalment, els resultats obtinguts són els següents:

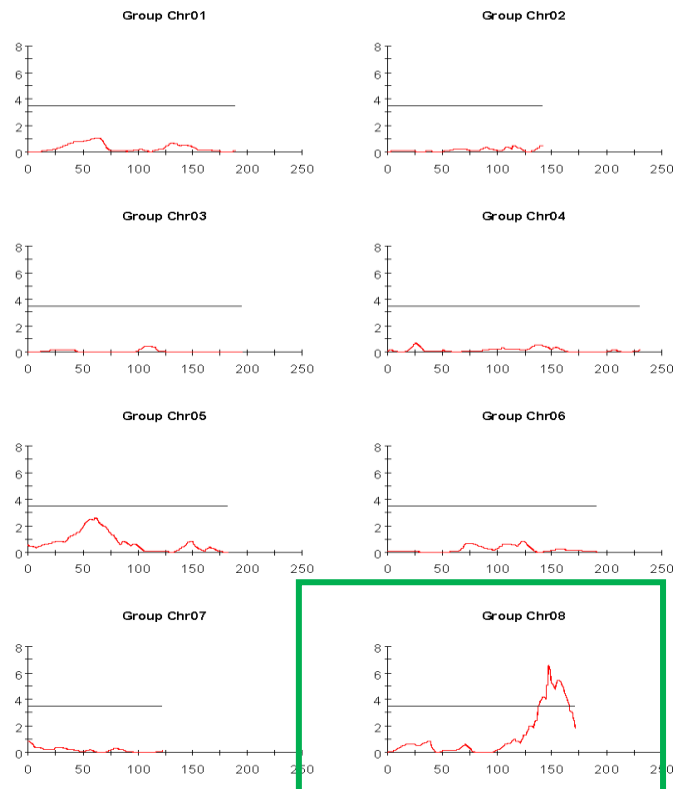
a) LOCALITZACIÓ APROXIMADA DEL GEN RESPONSABLE DEL COLOR TARONJA

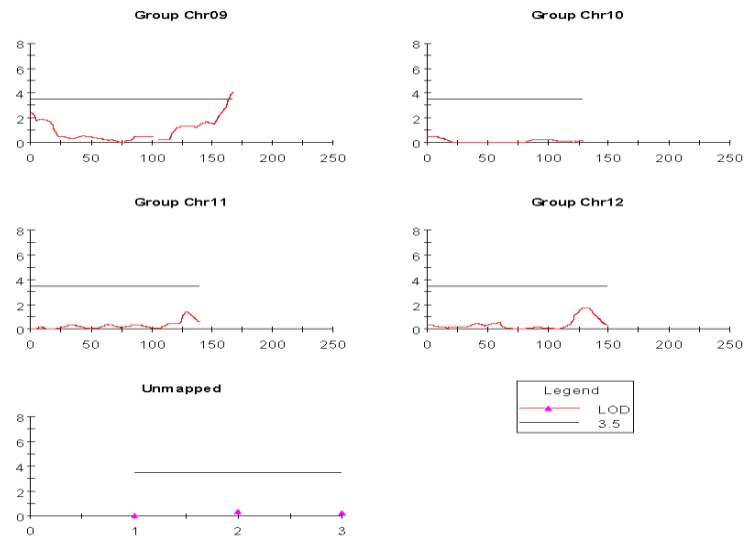




Il·lustració 108. Gràfiques resultats de l'anàlisi QTL. El gen responsable del color taronja es localitza al cromosoma 9

b) LOCALITZACIÓ APROXIMADA DEL GEN RESPONSABLE DEL COLOR VERD





Il·lustració 109. Gràfiques resultats de l'anàlisi QTL. El gen responsable del color verd es localitza al cromosoma 8

c) ANÀLISI QTL: GEN TARONJA I GEN VERD

Tal i com s'observa, cadascuna de les gràfiques anteriors correspon a un cromosoma del genoma del meló. En l'eix horitzontal s'hi troba la llargada del cromosoma en centimorgans (cM). En l'eix vertical s'hi troba el valor de les estadístiques. En ambdós casos (a i b), el valor creix exponencialment formant un pic en una de les 12 gràfiques. Aquest pic indica quina és la zona o regió en la que es localitza el gen que es busca.

D'aquesta manera els investigadors han pogut proporcionar i facilitar dades per la nostra recerca. No obstant, la seva recerca no s'acaba a aquí ja que s'ha trobat la zona aproximada del genoma en la qual es localitzen els dos gens però encara no se sap quins són ni com s'anomenen. La QTL anàlisi ha permès descobrir que el gen responsable del color taronja es localitza al cromosoma 9, entre els marcadors moleculars 21429600 i el marcador 21754707. Mentre que el gen responsable del color verd es localitza al cromosoma 8, entre els marcadors 31996217 i 32122602. Entre els dos marcadors que es localitza el gen responsable del color taronja, s'hi troben 40 gens. Entre els dos marcadors que es localitza el gen del color verd, se n'hi troben 15 més.

El següent pas de la recerca consisteix en descobrir i conèixer ben bé com es diuen els dos gens que es busquen. Això és degut a que encara no se sap quin dels 41 gens que es troben entre els marcadors 21429600 i el marcador 21754707 és el responsable del color

taronja i quin dels 16 que es troben entre els marcadors 31996217 i 32122602 és el responsable del color verd. Per fer-ho, es segueix el mateix procediment seguit en la nostra recerca, explicat anteriorment en l'apartat 3.5.2. del treball: MELONOMICS, el qual es basa en la cerca del gen dins el programa www.melonomic.net.

5. VALIDACIÓ DEL GEN CANDIDAT: CRISPR-CAS9

Actualment, fa quasi 20 anys que van aparèixer les primeres plantes modificades genèticament. Des d'aleshores, han anat apareixent noves eines que han permès als biòlegs especialitzats en plantes estudiar, modificar i millorar els trets característics de les plantes, a través de la manipulació dels seus gens.

Recentment, el sistema del CRISPR/Cas9 ha rebut molta atenció degut al nombre d'aplicacions del qual disposa per a la majoria d'organismes. Els experiments de CRISPR poden estar dissenyats per múltiples propòsits. Dos exemples d'usos ben diferents l'un de l'altre són, en primer lloc, evitar que una persona deixi la seva empremta dactilar marcada i, en segon lloc, introduir DNA exogen ³⁸a les plantes. El sistema pot ser utilitzat en cultius per millorar-ne trets, tal com la producció, l'arquitectura, l'estètica de la planta i la tolerància a malalties.

La tècnica CRISPR té relació amb l'experiment portat a terme ja que és la tècnica més ràpida i eficaç per descobrir si el gen candidat és de debò el gen que es buscava o no. Per tant, és la tècnica de validació de l'experiment ja que mitjançant el Cas9, el qual conté un RNA guia, és possible tallar el gen candidat. D'aquesta manera, si el gen candidat del meló taronja és tallat, quan aquest s'encreua amb un meló Pell de Gripau homozigot (aquest transmet el gen responsable del color taronja de la polpa amb els dos al·lels recessius, per tant, els descendents de dos Pell de Gripau mai posseeixen la polpa taronja, sempre és blanca) aquest meló amb polpa taronja no transmet el gen responsable del de color taronja als descendents i la proteïna responsable del color taronja de la polpa no és funcional. Per tant, si es individua de la generació creada a partir d'un Pell de Gripau homozigot i el meló de polpa taronja editat genèticament (té tallat el gen responsable del color taronja), són tots de polpa blanca, la validació del gen és positiva i el gen candidat és realment el que es buscava. D'altra banda, si només un dels melons de la nova generació posseeix la polpa taronja, significa que el gen candidat no és el gen que es buscava i s'ha de tornar a començar la recerca des del principi.

Com s'ha dit anteriorment, utilitzar i aplicar a un organisme la tècnica del CRISPR, implica crear un organisme genèticament modificat. Aquest OGM, es diferencia d'un transgènic pel

³⁸ ADN localitzat fora de l'organisme. El DNA exogen s'introdueix a l'organisme a través d'un procés anomenat transformació.

simple fet de que en el CRISPR-Cas9 s'utilitza, com molt bé diu el seu nom, el Cas9³⁹, encarregat de tallar el gen candidat. No obstant, sense l'ajuda d'un ARN guia, aquesta tasca no podria ser portada a terme pel Cas9. El RNA guia té la funció d'indicar al Cas9 el gen específic que ha de tallar. El RNA guia ho sap perquè la seva seqüència de bases nitrogenades és complementària a la seqüència del gen. Per tant, a part del procediment seguit al laboratori per introduir el plasmidi dins l'organisme, és molt important la bona fabricació d'aquest RNA guia.

Per tal de crear el RNA guia, cal seguir un protocol específic, el qual es porta a terme a través d'un programa informàtic. Per tant, només és necessari disposar d'un ordinador. No obstant, prèviament és necessari haver localitzat el gen candidat i la seva seqüència de bases nitrogenades.

PROCEDIMENT (PROTOCOL):

1. En primer lloc s'entra a la pàgina web <http://bioinfoq.cnb.csic.es/tools/breakingcas/?qset=melon>

The screenshot shows the 'Breaking-Cas' web interface. At the top, there's a header with 'Breaking-Cas' and a sub-header 'Custom database of melon genome. Genomes: 2'. Below this, there's a 'Please cite:' section with a reference to a 2016 paper. The main form is divided into three numbered steps: 1. 'Choose organism: (alphabetic list)' with a dropdown menu showing 'melon'. 2. 'Paste one or several query DNA sequences in FASTA format (up to 20,000 nucleotides in total):' with a large text input area and an 'Or upload FASTA file (DNA):' section with a file selection button. 3. 'Select nuclease settings: Select Cas nuclease' with a dropdown menu. Below step 3, there are options to 'Or set your own parameters:' for 'PAM sequence', 'PAM position' (5' and 3'), 'Guide length' (20 nts), and 'Mismatches' (Up to 4). There's also a 'Position-dependent weights' section with a table of 20 positions and an 'Edit' button. At the bottom, there's a 'Confirmation email (optional):' field and a 'Submit' button.

Il·lustració 110. Pàgina principal de la web que permet crear el RNA guia

2. S'escriu la seqüència del gen d'interès (el gen que es vol tallar)
3. Es selecciona el Cas9 que sigui capaç de reconèixer la seqüència Protospacer Adjacent Motif (PAM). El PAM és una curta seqüència de DNA (normalment de 2-6 parells de bases de llargada) que es localitza a entre 2 i 6 nucleòtids de distància del gen que es vol

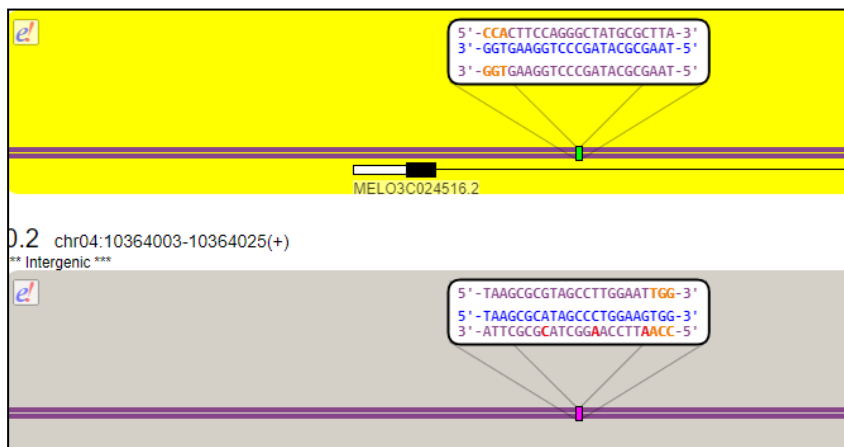
³⁹ Proteïna que acompanya el RNA guia i s'encarrega de tallar el gen candidat en la tècnica CRISPR-Cas9.

tallar. El PAM és molt important perquè l'RNA que es crea en aquest apartat, i que servirà per portar a terme el CRISPR-Cas9, és complementari a aquest PAM i ajuda a localitzar l'oligosacàrid que es vol tallar. Això és degut a que el Cas9 talla a 2-6 nucleòtids de distància del PAM. El Cas9 utilitzat en aquest experiment és del tipus SpCas9 (Streptococcus Pyogenes), el qual reconeix la seqüència de PAM 5'-NGG-3' (on N pot ser qualsevol base nitrogenada).

4. Els paràmetres que s'ha de tenir en compte s'hora d'escollir el Cas9 són els següents:

START†	END†	STRAND†	OLIGO†	ONTARGETS†	OFFTARGETS†	GENES†	SCORE†
10613	10632	-	ATGTTAGACCCCTAGCCACCTAGG	1	3	19	99.9
9832	9851	+	CGGAGATCAAGTATATTGGGTGG	1	1	2	99.9
10699	10718	-	AAAGTCGTTTGTGCCCTCAAGG	1	3	13	99.9
1539	1558	+	AACAGGCGCATCGACTGATATGG	1	1	4	99.9
21334	21353	+	ACCGAGTCACTTTGGTTATGAGG	1	1	5	99.9
14293	14312	-	GTGCAGAAGACCTATACCAAGG	1	1	16	99.9
12953	12972	+	CACAGACTTCAATGAGCCACTGG	1	1	13	99.9
13154	13173	+	GCGTTGATTGGGACAGCCTTAGG	1	1	12	99.8
10790	10809	-	CAGGAGGTGACGCTAGAACAATGG	1	2	15	99.8
20820	20839	+	ACTAGTCGCAATTGGTTCCAAGG	1	3	6	99.8
3918	3937	-	CTGTAGGCAGTCCATAGCTGCCGG	1	2	19	99.8
19429	19448	-	TAAAAACCTCCCTCAGTCCAATGG	1	3	17	99.8
13273	13292	+	GCTTACACGATCAGAGAACGAGG	1	1	9	99.8
5825	5844	-	GATAGCTTNGTCTAAGATCCAGG	0	1	0	99.8
11988	12007	-	CATCAACACTTGACTTGTGGAGG	1	2	14	99.8
1462	1481	-	AAAGAACCAGCTGGGGTGACTGG	1	5	17	99.8
11413	11432	-	CCACAGCAACAAGTACAGTGGG	1	5	14	99.8
10601	10620	+	GTGGGTATCCCTAGGTGGCTAGG	1	2	18	99.8
20387	20406	-	CAAGTCACCACGCTATGAACAGG	1	7	17	99.8
245	264	-	ACCGGGTCACAGGAACCCATGG	1	2	11	99.8
247	266	+	GGTTCCTGTGACCCGGTAAAGG	1	2	17	99.8

Il·lustració 111. Imatge on s'observa el ontargets, els offtargets, els gens i la puntuació dels oligosacàrids. La seqüència de PAM s'observa de color taronja (NGG)



Il·lustració 112. La pantalla groga correspon a l'ontarget mentre que la gris a l'offtarget

- On target ⁴⁰(pantalla groga): cal cercar en quina part del gen es troba l'oligosacàrid (seqüència de DNA que es vol tallar i que inclou el PAM).

⁴⁰ On target significa acertat, en la llengua catalana.

- Off target ⁴¹(pantalla gris): la pantalla gris és l'ideal ja que presenta 0 offtargets..
- Gens: Indica el nombre de gens que hi ha al voltant. Si el gen que es vol tallar està envoltat per un alt nombre de gens, significa que serà més fàcil de localitzar i de tallar. No obstant, aquest paràmetre no és rellevant.
- Score (puntuació): indica quins oligosacàrids tenen més possibilitats de ser els òptims per crear el RNA guia.

RESULTATS I CONCLUSIONS

Després de dissenyar el RNA guia mitjançant el programa informàtic, cal enviar els resultats a una empresa encarregada de l'elaboració de RNA guia. Al cap d'un temps, la mateixa empresa envia el RNA guia amb el Cas9 creats a dins un tub de plàstic.

A continuació, s'injecta el RNA guia dins el meló d'aspecte físic taronja. D'aquesta manera, el RNA guia localitza el gen candidat (gen que es vol tallar) i el Cas9 s'encarrega de tallar-lo. Per tant, es tracta de la creació d'un Organisme Genèticament Modificat.

El pròxim pas consisteix en crear un meló descendent i idèntic al GMO. Si el gen candidat és realment el que es busca i el que s'ha tallat, el meló descendent no posseirà la polpa de color taronja (serà blanca o verda).

5.1. CRISPR-Cas9: transformació de les llavors del meló via *A. Tumefaciens*

Durant l'estada al centre d'investigació CRAG, s'ha tingut l'oportunitat de conèixer de primera mà la tècnica CRISPR-Cas9. Tot i que aquesta no s'ha pogut portar a terme en la validació de l'experiment per falta de temps, sí que s'ha pogut realitzar amb un objectiu més teòric.

La tècnica CRISPR-Cas9 és majoritàriament utilitzada per modificar genèticament els melons via *A. Tumefaciens*. Aquest mètode permet crear un organisme genèticament

⁴¹ Off target significa incorrecte o mal encaminat, en llengua catalana.

modificat, resistent a determinats tipus de bacteris [veure apartat 2.1.1.1.1. Mètodes d'inserció de gens en cèl·lules eucariotes vegetals].

OBJECTIUS:

- Aprendre les diferents aplicacions de la tecnologia CRISPR
- Entendre la diferència entre una planta transgènica (o una modificada genèticament amb encreuaments) i una planta editada amb la tècnica CRISPR
- Familiaritzar-se amb el protocol que cal seguir per obtenir plantes de meló modificades genèticament

MATERIAL:

- Bata de laboratori
- Guants de laboratori
- Plaques de Petri esterilitzades
- Paper de filtre esterilitzat
- Pincers i ganivets esterilitzats
- Llavors de meló germinades
- Líquid que conté l'Agrobacterium
- MB Growth Medium (ajuda al creixement vegetal)
- Plasmidi
- Luria Broth (nutrients cultiu bacterià)
- Bossa de gassa
- Aigua
- Antibiòtics
- Etanol
- Imant
- Ampolleta de vidre
- Bleach 50%
- Tween20
- Agitador magnètic
- Campana de flux laminar
- Erlenmeyers
- Estereoscopi
- Acetosyringoe (solució)

- Paper de filtre esterilitzat
- Solució d'hormones + herbicides

MÈTODE (al laboratori):

1. En primer lloc, col·locar en una placa de petri les cèl·lules d'Agrobacterium juntament amb el plasmidi ⁴²d'interès, el Luria Broth (LB) (nutrient utilitzat per cultivar bacteris al laboratori) i antibiòtics a 28°C de temperatura.



Il·lustració 113. Cèl·lules d'Agrobacterium col·locades a la placa de Petri. (Fotografia pròpia)

2. Mentrestant, es preparen les llavors. Es treu la primera capa de la llavor fent un petit tall al costat oposat de l'embrió. Es dipositen dins una bossa de gassa i es lliguen amb fil. Aleshores, es col·loca la bossa dins una ampolleta de vidre que conté un imant i 100ml d'aigua.



Il·lustració 114. Ampolleta que conté la bossa amb les llavors, l'aigua i l'imat. (Fotografia pròpia)

⁴² Molècula d'ADN circular de doble cadena pròpia dels procariotes, que pot existir i replicar-se independentment del cromosoma o estar integrat en el mateix.



*Il·lustració 115.
Capa externa de la
llavor tallada.
(Fotografia pròpia)*

3. Es deixen reposar 2 hores les llavors dins l'ampolleta a temperatura ambient i sense barrejar.
4. A continuació toca desinfectar: es retira l'aigua i s'afegeix 100ml d'Etanol 96% durant 2minuts. Es barreja i passats els dos minuts es descarta l'Etanol en un altra ampolleta.
5. Es tornen a desinfectar les llavors: s'afegeix 100ml de Bleach 50% (50ml de beach + 50 ml d'aigua) amb 4 gotes de tween20 durant 20 minuts i es barreja amb un agitador magnètic (cal agitar a alta velocitat per tal de que la bosseta de gassa que conté les llavors es mogui).

A partir d'aquí, tots els passos que venen a continuació, cal realitzar-los sota la campana de flux laminar per tal de mantenir unes condicions esterilitzades.



*Il·lustració 116. Alcohol i
esterilitzador de pinces, ganivets, etc.
(Fotografia pròpia)*

6. Es netegen les llavors amb aigua esterilitzada durant 10 minuts cadascuna. Llavors es deixen en aigua i a la foscor durant la resta de dia, fins l'endemà, perquè s'hidratin.

7. Una vegada es finalitza la preparació de les llavors es comença a preparar el cultiu d'Agrobacterium. Es retiren 25ml de Luria Broth + d'antibiòtics i es dipositen en un erlenmeyer de 100 ml. Es deixa incubar tota la nit a 28°C i agitant-se a 200 revolucions per minut, a la foscor. El resultat d'aquest preparat s'anomena pre-cultiu.

Es deixen passar 24 hores.

8. L'endemà es retorna a la preparació de les llavors. S'elimina l'endosperma de les llavors (capa transparent) usant un estereoscopi i es distribueixen de 5 en 5 en una placa de Petri que conté MB en estat sòlid. Es deixa incubar durant 24 hores a 28°C. D'aquestes 24 hores, 16 hores ha d'haver-hi llum i a les altres 8 hi ha d'haver foscor.



*Il·lustració 117. Endosperma extret.
(Fotografia pròpia)*



*Il·lustració 118 .
Estereoscopi.
(Fotografia pròpia)*



*Il·lustració 119. 5 llavors
sense l'endosperma col·locades
a la Placa de Petro que conté
MB. (Fotografia pròpia)*

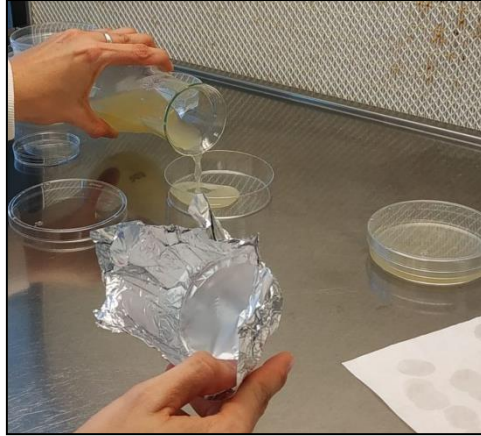
9. Paral·lelament es prepara el cultiu d'Agrobacterium a partir del pre-cultiu preparat el dia anterior. Es preparen 50ml de MB + Acetosyringone en un erlenmeyer de 100ml. S'afegeix 1ml de pre-cultiu. Es deixa incubar a 28°C i a 200 revolucions per minut, a la foscor, fins l'endemà.



*Il·lustració 120. Cultiu
Agrobacterium. (Fotografia
pròpia)*

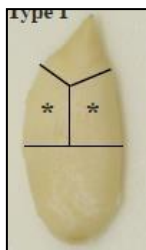
Es deixen passar 24 hores.

10. Passades 24 hores més, es mesura la densitat del cultiu líquid d'Agrobacterium (la densitat òptima és de 0,4-0,5 mg/ml. Seguidament, s'aboquen 40ml de cultiu líquid d'Agrobacterium en una placa de Petri esterilitzada i s'hi afegeixen les llavors. Es separen els dos cotiledons⁴³.



Il·lustració 121. S'aboca l'Agrobacterium.
(Fotografia pròpia)

11. Cada cotiledó s'ha de partir en 4 parts. Es descarta la part superior i la inferior del cotiledó. Es guarda la part intermitja i es torna a tallar per la meitat. De manera que s'aconsegueixen 2 explants ⁴⁴(petit fragment de la planta que es prepara per ser cultivat en un medi nutritiu i que funciona com un generador de noves plantes a través del cultiu de teixits *in vitro*) del cotiledó i 4 per llavor.



Il·lustració 122.
Partició del cotiledó
en 4 parts.
(Fotografia pròpia)

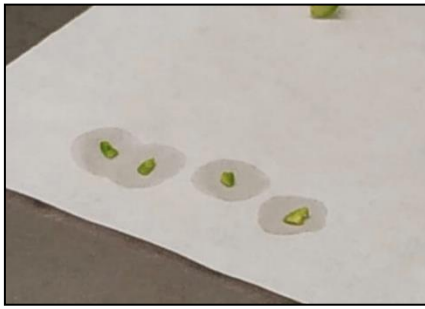
12. El pròxim pas consisteix en eixugar els explants amb paper de filtre esterilitzat i es col·loquen de nou en una placa de Petri.

Es deixen passar 24 hores.

⁴³ Conjunt de les fulles embrionàries de la planta en germinació.

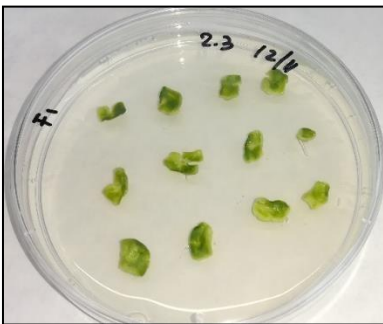
⁴⁴ Teixit viu separat del seu òrgan propi i transferit a un mitjà artificial de creixement.

13. Es netegen els explants amb solució d'antibiòtic per fer desaparèixer les restes de bacteries i s'eixuguen de nou amb paper de filtre esterilitzat.



*Il·lustració 123. S'eixuguen els explants.
(Fotografia pròpia)*

14. Es disposen els explants dins una placa de Petri que conté una solució d'hormones + herbicides. Es deixa incubar a 28°C.



Il·lustració 124. Explants modificats genèticament i col·locats a la placa de Petri que conté hormones i herbicides. (Fotografia pròpia)



Il·lustració 125. Explants crescudes dins la placa de Petri, els hi falta més espai per poder continuar creixent. (Fotografia pròpia)

15. A partir d'aquí, passades 3 setmanes, es traspassen els explants de dins la placa de Petri a una caixa de plàstic ja que d'aquesta manera disposen de més espai per créixer.



Il·lustració 126. Explantes col·locades dins les caixes. (Fotografia pròpia)



16. Passades 3 setmanes més, es traspasa els explants de la caixa a un tub de vidre, on encara tenen més espai per créixer. Passats 8 dies, comencen a créixer les arrels.



Il·lustració 127. Melonera modificada genèticament, crescuda a partir d'un explant. (Fotografia pròpia)

17. Una vegada la planta està completament desenvolupada dins el tub, pot ser traspasada a pots per tal de ser cultivada en un hivernacle apropiat.

El mínim temps per aconseguir una planta de meló transgènica és al voltant de 4 mesos.

RESULTATS I CONCLUSIONS:

En primer lloc, cal dir que en l'experiment portat a terme, només s'ha assolit fins els punt número 14 del mètode llegit anteriorment. Això és degut a que per tal de realitzar el pas número 15 han de passar un mínim de tres setmanes (temps que tarda a generar-se una planta nova i una explanta) i, el temps del qual es disposa per realitzar les pràctiques al CRAG, és de dues setmanes. No obstant, els investigadors del centre han permès observar i comprendre en quines condicions es troben aquests melons genèticament modificats en els passos 15, 16 i 17 del mètode.

Durant aquest experiment, s'ha entès quin és el protocol que s'ha de seguir a l'hora de crear un organisme genèticament modificat. El punt principal d'aquesta tècnica és el context en el qual es porta a terme ja que és necessari un laboratori, unes cambres i uns hivernacles destinats únicament a la creació de transgènics. A més a més, es necessita una campana de flux laminar i tots el material esterilitzat, a més a més, és clar, d'un plasmidi.

Tot i que, aquestes característiques esmentades anteriorment sobre el CRISPR coincideixen amb les dels organismes transgènics, s'ha après que hi ha una gran diferència entre una tècnica i l'altra. Els organismes transgènics, es modifiquen de manera "random", és a dir, que no és en un punt concret del genoma. En canvi, la tècnica CRISPR, és totalment específica ja que RNA guia està dissenyat per anar a parar just al gen del genoma que interessa modificar.

Pel que fa a la tècnica en sí del CRISP-Cas9, s'ha comprès que té finalitats molt diverses i, de fet, en aquest projecte, se n'ha pogut "practicar" dues d'elles. D'una banda la creació d'un RNA guia per tallar el gen candidat al color taronja de la polpa del meló i, així, poder validar la recerca científica i, d'altra banda, la tècnica portada a terme al laboratori a través de *Agrobacterium Tumefaciens*.

6. CONCLUSIONS DE L'EXPERIMENT

Mitjançant l'experiment que ha estat portat a terme, s'han adquirit nous coneixements relacionats amb la modificació genètica i, sobretot, sobre la variabilitat genètica de l'espècie *Cucumis Melo*.

En primer lloc, s'ha après que tot i que els fenotips de les diverses varietats de melons són diferents els uns dels altres, tots ells comparteixen el mateix genoma (els mateixos gens i els mateixos cromosomes) ja que formen part de la mateixa espècie. No obstant, els seus fenotips són diferents els uns dels altres a causa de petites mutacions anomenades Polimorfismes de Nucleòtids Simples (SNP), les quals difereixen en una única base nitrogenada d'un gen.

Aquest, és el cas del gen estudiat, responsable del color taronja de la polpa del meló i de l'alt contingut de carotenoides. Tant el meló Pell de Gripau com el meló Vedrantaís posseeixen el gen responsable del color taronja però una base nitrogenada de la seva seqüència és diferent en una varietat respecte de l'altra. El Pell de Gripau consta d'una guanina mentre que el Vedrantaís d'una citosina. El fet de que l'RNA missatger resultant de la transcripció d'aquest gen difereixi en una base nitrogenada, causa que un meló posseeixi la informació hereditària adequada per la síntesi de la proteïna funcional responsable del color taronja i, que l'altre meló, no pugui sintetitzar mai aquesta proteïna i, per tant, no sigui funcional. Dit en altres paraules, aquesta mutació provoca que el gen només s'expressi en el fenotip de la varietat Vedrantaís i, conseqüentment, que alguns melons tinguin la polpa taronja i d'altres blanca.

Un altre coneixement molt important adquirit durant l'experiment ha estat descobrir perquè un dels melons descendents posseeix la polpa de color verd si cap dels dos pares la té d'aquest color. Per tal d'esbrinar una resposta coherent, ha calgut comparar el fenotip amb el genotip i tenir present l'epístasi dominant sota la qual es troben els dos gens responsable del color de la polpa del meló (l'expressió d'un dels gens depèn de l'expressió de l'altre). D'aquesta manera ha quedat clar que el meló és verd perquè el gen recessiu del meló Vedrantaís conté informació pel caràcter de color verd de la polpa, i no pel caràcter de color blanc. Des d'un primer moment es descarta que aquest gen responsable del color verd provingui del meló Pell de Gripau ja que la seva polpa és de color blanc i el meló és

homozigot i, per tant, els dos al·lels del gen verd/blanc han de ser iguals. En canvi, com que el meló Vedrantaís és taronja, se sap que el gen recessiu pot ser verd o blanc perquè no es pot veure a simple vista. L'única manera de descobrir per a quin caràcter porten informació els dos al·lels homozigots del gen verd/blanc del meló Vedrantaís consisteix en realitzar un encreuament amb un Pell de Gripau i un Vedrantaís. Si algun dels descendents posseeix la polpa verda, el gen recessiu del meló Vedrantaís també serà el verd. No obstant, si no hi ha cap meló de la nova generació amb polpa verda, el gen recessiu del meló Vedrantaís portarà informació pel caràcter blanc. Per tant, a més a més de descobrir que hi ha dos gens responsables del color de la polpa del meló, s'ha demostrat que un d'ells, sorprenentment, pot aportar informació pel color verd o el color blanc. Per tant, hi ha tres possibles fenotips: taronja, blanc i verd.

La tècnica KASPar, emprada en la fase de genotipificació, mostra que no tots els melons descendents de polpa taronja posseeixen el mateix genoma que el meló Vedrantaís (de polpa taronja) i que no tots els descendents de color blanc tenen el mateix que el meló Pell de Gripau (de polpa blanca). Si un meló té la polpa taronja significa que conté la mateixa base nitrogenada que el meló Vedrantaís en la seqüència del gen responsable del color de la polpa. No obstant, això no significa que totes les bases nitrogenades de les seqüències de tots els gens del seu genoma hagin de ser les mateixes que les del genoma de Vedrantaís ja que, possiblement, molts altres caràcter fenotípics difereixen respecte els caràcters de Vedrantaís (per exemple, poden diferir en la dolçor, la forma, la densitat de la polpa, etc) i això vol dir que no totes les bases nitrogenades dels seus genomes són iguals, dit d'una altra manera, que els gens són independents els uns dels altres i no s'hereten junts.

D'altra banda, gràcies a la fase o a l'experiment de fenotipificació s'ha comprovat que l'epístasi dominant del meló és existent ja que, com s'ha dit anteriorment, s'ha tingut la sort de treballar amb un meló Vedrantaís, el gen recessiu del qual porta informació pel caràcter verd de la polpa del meló i, afortunadament, un dels descendents posseeix la polpa verda. Gràcies a la fenotipificació també s'ha observat que no tots els melons que tenen característiques físiques externes pròpies del meló Pell de Gripau, posseeixen la polpa de color blanc i, també, que no tots els que tenen característiques externes del Vedrantaís, posseeixen la polpa de color taronja. Això significa que l'aspecte extern no va lligat amb l'intern i viceversa. Això és degut a que els gens que aporten informació pels caràcters externs no estan relacionats ni depenen dels gens que aporten informació pels caràcters de

l'aspecte físic intern. Els uns són independents dels altres i una varietat descendent pot agafar un gen provinent del meló Pell de Gripau i dos del Vedrantaís, per exemple.

A partir dels mapes genètics i l'anàlisi QTL, s'ha comprovat que és possible localitzar i validar el gen responsable d'un caràcter concret, sempre i quan es tinguin les dades necessàries del fenotip i del genotip d'un centenar d'individus d'una mateixa espècie, els quals, entre ells, posseeixin petites mutacions (SNP) que facin variar el seu aspecte físic.

L'objectiu principal de la recerca consisteix en localitzar, en el genoma del meló, el gen responsable del color taronja i de l'acumulació de beta-carotè en els vegetals. Aquest objectiu ha estat assolit després d'un estudi, al llarg del qual, s'han complert molts altres objectius, els quals es troben explicats en cadascuna de les fases o experiments de la recerca científica. Un dels objectius més importants, d'un dels experiments realitzats, consisteix en preveure el fenotip dels melons a partir dels marcadors moleculars. Ara, se sap que el fenotip i el genotip no són dues parts independents de l'organisme sinó que estan estretament relacionades l'una amb l'altra i, que depenent del genoma, el fenotip és d'una manera o d'una altra ben diferent.

Parlant del fenotip, cal dir que la taula omplerta en la fase de fenotipificació, no és una part rellevant per l'experiment a excepció, és clar, del paràmetre del color de la polpa del meló. Els resultats i mesures de la resta de paràmetres de la taula no han estat utilitzats.

Un altre punt que és indispensable remarcar, és el fet de que la recerca portada a terme ja havia estat realitzada prèviament pels investigadors del Centre de Recerca per a l'Agricultura Genètica (CRAG). No obstant, el procés i el descobriment del gen ha estat realitzat per nosaltres en tot moment. Els investigadors, han supervisat els processos, mètodes i protocols i han guiat la recerca. Sense la seva investigació prèvia aquesta recerca hauria estat impossible de realitzar ja que només s'ha disposat de dues setmanes. Els investigadors han fet possible la recerca en qüestió reduint el nombre de marcadors moleculars per tal de que es pogués localitzar el gen sense haver d'elaborar un mapa genètic i recórrer a una anàlisi QTL.

En darrer lloc, s'ha après que totes les tècniques emprades requereixen molta precisió i un alt coneixement sobre el seu ús. Aquest fet s'ha comprovat durant l'extracció del DNA ja que tot i haver utilitzat el mateix mètode per a l'extracció de DNA de totes les mostres, la seva quantificació i qualificació varia força. Un mínim detall pot fer variar aquesta qualitat de la mostra. També és cert que s'ha de tenir en compte que hi ha mostres de DNA més difícils d'extreure perquè es troben en un teixit que conté més sucres o, bé, altres compostos que no són DNA.

7. UNA NOVA VARIETAT DE MELÓ, RICA EN VITAMINA A

L'estudi portat a terme té com a objectiu principal localitzar i descobrir el gen responsable del color taronja de la polpa del meló. No obstant, l'assoliment d'aquest objectiu condueix a un objectiu encara més ambiciós: elaborar i crear una nova varietat de meló anomenada meló d'Elit. Aquesta nova varietat posseeix tota la base genòmica procedent de Pell de Gripau i, únicament, el gen que codifica per la proteïna Orange-Orange provinent del meló Vedrantaís. D'aquesta manera es conserven totes les propietats interessants del meló Pell de Gripau com, per exemple, el temps que pot estar emmagatzemat sense fer-se malbé i, alhora, conté una important quantitat de vitamina A com el meló Vedrantaís. Per suposat, el color de la polpa del Meló d'Elit és de color taronja.

7.1. Mètode: creuaments artificials

Per tal d'obtenir aquesta nova varietat es pot recórrer a dues metodologies diferents: la fabricació d'un transgènic o, bé, per creuaments artificials.

En ambdós casos, la manera de conrear, produir i, posteriorment, comercialitzar el producte és totalment diferent. Si interessa portar a terme la creació d'un transgènic cal prendre les mesures preventives adients i el cost és molt més elevat que no pas si es decideix crear un híbrid a partir de l'encreuament entre les dues línies parentals Pell de Gripau i Vedrantaís. Per aquestes raons, i pel fet de que és possible realitzar creuaments artificials entre dues varietats diferents d'una mateixa espècie, el més apropiat en aquest cas és escollir l'opció dels creuaments artificials. No obstant, aquests creuaments no serien possibles de portar a terme sense l'ajuda i la utilització de marcadors moleculars, flanquejats al gen responsable del color taronja i de l'alt contingut de pro-vitamina A, el qual s'ha localitzat realitzant l'experiment anterior.

Cal saber, però, que aquest llarg procediment de creuaments s'ha de portar a terme perquè, avui dia, no existeix cap tecnologia que permeti canviar una única base nitrogenada del genoma sencer per una altra base nitrogenada diferent. Si fos així, si existís una tècnica capaç de canviar una sola base per una altra, la creació del meló d'Elit seria tan simple com canviar la guanina que forma part de la seqüència del gen responsable del color taronja del

meló Pell de Gripau, per una citosina. D'aquesta manera, la informació genètica ja seria l'adequada per sintetitzar la proteïna i fer-la funcional. S'obtindria el meló d'Eli, amb tota la base genètica idèntica a la del meló Pell de Gripau, a excepció d'aquesta guanina d'aquest gen que hauria estat canviada per una citosina.

PROCEDIMENT:

Primerament, després de realitzar l'estudi, trobar el gen i validar-lo amb la tècnica del CRISPR, cal produir una població de NILs. Aquesta població neix a partir de dues línies parentals homozigots (Pell de Gripau i Vedrantaïs), les qual es creuen i donen lloc a un varietat de meló híbrida.

El següent pas consisteix en manipular la informació genètica del meló híbrid obtingut al final del pas anterior. La manipulació genètica, en aquest cas, és necessària per tal de no perdre el gen responsable del color taronja quan es realitzin els encreuaments futurs. Per tal de tenir-lo controlat cal flanquejar un marcador molecular (SNP) al gen que codifica per la proteïna Orange-Orange del cromosoma número 8. Aquesta fase es dona per finalitzada quan s'encreua aquest híbrid (la informació genètica del qual ha estat manipulada per la introducció d'un SNP) amb un meló Pell de Gripau pur (backcrosses).

Aquest darrer pas s'ha de repetir un mínim de sis o set vegades fins a aconseguir un meló amb tot el genoma idèntic al Pell de Gripau, a excepció del gen que codifica per la proteïna Orange-Orange que prové del Vedrantaïs. Els marcadors moleculars anomenats anteriorment, tenen un paper essencial en aquest procediment ja que serveixen per controlar el gen que interessa i per no perdre'l durant els creuaments, ja que, d'aquesta manera, és possible seleccionar els melons que interessin (interessin els que posseeixen el gen que codifica per la proteïna Orange-Orange. Les línies de melons que el perden durant els creuaments ja no es poden utilitzar més).

Finalment, cal autopolinitzar aquest meló (F6) (amb tot el genoma de Pell de Gripau a excepció del gen que codifica per la proteïna Orange-Orange) per aconseguir una varietat homozigot. D'aquesta manera s'obté una nova varietat de meló rica en vitamina A i fàcil

d'emmagatzemar durant un llarg període de temps, el gust del qual està excel·lentment ben valorat pels consumidors de Pell de Gripau.

7.2. Quina utilitat i quina repercussió dins la societat causaria aquesta nova varietat de meló?

Obtenir melons Pell de Gripau amb la polpa de color taronja (altrament coneguts com a Melons d'Elit) és interessant per a diversos àmbits. En primer lloc, el productor, disposaria d'una varietat de meló única, la qual ningú més posseiria. Això li comportaria un considerable augment econòmic ja que disposaria d'una varietat de meló patentada, desitjada per a la resta de productors, els quals pagarien una gran quantitat de diners per tal d'adquirir-la. En els casos de l'agricultor i del consumidor, també seria interessant ja que, com s'ha dit, Pell de Gripau es pot emmagatzemar durant més temps que Vedrantaïs. L'agricultor no necessitaria produir una quantitat tan elevada de melons i podria utilitzar un terreny més reduït per a les plantacions de meloneres. A més a més, al ser de color taronja tindria un valor afegit, referent tant a aspectes de salut perquè contindria una gran quantitat de carotenoides, com a aspectes econòmics pel simple fet de ser una varietat de meló nova, única i desitjada.

A més a més, actualment, a causa del canvi climàtic, moltes espècies vegetals riques en vitamina A estan desapareixent de forma inevitable ja que no aconsegueixen adaptar-se a les modificacions ambientals. D'aquesta manera, la creació de noves varietats i/o espècies amb un alt contingut de carotenoides com, per exemple, el meló d'Elit, permet mantenir un equilibri entre les plantes desaparegudes i les nou creades. Per tant, a més a més de tenir un impacte social, la creació d'aquesta nova varietat de meló també posseeix un impacte de caire evolutiu i d'adaptació al canvi climàtic.

És clar que a més de posseir el gen responsable de l'elevat contingut de carotenoides, en aquest cas, el meló d'Elit necessitaria la inserció d'altres gens capaços de resistir a la sequera o a patògens causats pel canvi climàtic ja que, sinó, aquesta nova varietat desapareixeria en el mateix moment que el meló Pell de Gripau (si en un futur se'n donés el cas) perquè posseeixen exactament el mateix genoma i el mateix fenotip, a excepció del gen responsable del color taronja.

Cal començar a buscar solucions perquè abans del 2080 hi ha estudis que demostren que el 45% de les espècies vegetals hauran desaparegut. Algunes d'elles posseeixen el gen del color taronja i, per tant, cal crear noves espècies que continguin carotenoides ja que com s'ha vist, en les zones del món, en les quals existeix deficiència de vitamina A en la dieta dels seus habitants, molts infants i adults pateixen ceguera, fatiga i acaben morint.

7.3. Comercialització i legalització

Tal i com s'ha explicat en l'apartat "4.3.8. Regulació a nivell legal" de la part teòrica, des de l'any 2018, a la Unió Europea, a causa de la sentència proclamada per el Cort Europea de Justícia, qualsevol planta editada genèticament és considerada un organisme genèticament modificat i, per tant, es troba sotmesa sota la mateixa regulació que una planta transgènica. Això significa que l'empresa creadora del meló d'Elit, abans de poder-lo comercialitzar legalment, està obligada a sotmetre's a llargs anys de revisions, burocràcia, comitès de vigilància, etc. Aquest llarg procés de legalització del meló d'Elit provoca que la seva comercialització no sigui possible de portar a terme.

No obstant, si el meló d'Elit és creat per una empresa que no forma part del territori que engloba la Unió Europea, el meló pot entrar al mercat lliurement, sense haver de sotmetre's a la supervisió i control de cap autoritat.

Aquesta és la situació actual però els científics de la Unió Europea lluiten per aconseguir que la sentència proclamada l'any 2018 sigui modificada i, que en un futur, es puguin comercialitzar plantes editades genèticament a partir de creuaments artificials (reproducció), com, per exemple, el meló d'Elit.

8. CONCLUSIONS FINALS

El present treball de recerca ha permès adquirir coneixements molt valuosos sobre l'enginyeria genètica, la biotecnologia i la importància d'aquesta en el món actual. Com s'ha vist, la modificació genètica es practica des del neolític però, encara avui dia, la població tem l'idea de poder canviar la naturalesa d'un ésser viu. Per això, en la majoria de països del món, com en el nostre, no és legal la comercialització d'organismes genèticament modificats (GMO). No obstant, l'ús adequat d'aquestes tècniques i la producció d'individus amb el DNA alterat suposen un gran avenç per a la humanitat i faciliten la vida i la supervivència humana, la qual cada vegada es veu més afectada pel canvi climàtic. Les variacions climàtiques, provoquen un clar augment de la temperatura a nivell planetari i això suposa l'extinció de moltes espècies vegetals que no són capaces d'adaptar-se a les noves condicions ambientals. Aquest treball ha estat molt útil per donar-se compte de que la variabilitat genètica és necessària per poder sobreviure als canvis que puguin produir-se al nostre entorn durant els propers anys.

En la part teòrica del treball s'ha après que la creació de noves espècies vegetals amb característiques concretes desitjades, és possible de portar a terme gràcies a l'estudi genètic d'organismes que posseeixen per naturalesa pròpia, aquestes característiques que es volen aconseguir en el fenotip de la nova espècie. Existeixen diversos tipus d'estudis genètics, però aquest en concret s'ha observat que es basa en la localització de gens que aporten informació per un caràcter fenotípic concret (característica desitjada) i en la inserció d'aquest dins el genoma de l'individu modificat genèticament. De fet, la recerca d'aquest treball es basa en un estudi genètic com el que s'ha esmentat anteriorment i s'ha après que per tal de portar-lo a terme cal seqüenciar tot el genoma de l'individu que es vol estudiar. Això és degut a que si no es coneixen tots els seus gens no és possible de descobrir on resideixen les mutacions que permeten que una espècie tingui variabilitat (cada varietat té unes característiques pròpies i una d'aquestes és la que es vol aconseguir que posseeixi l'organisme modificat).

Per tant, la recerca del present treball ha consistit en la localització d'un gen que aporta informació per un caràcter fenotípic concret, exactament, pel color taronja dels vegetals, el qual està estretament relacionat amb l'elevada quantitat de carotenoides continguts. Per trobar el gen s'ha usat el fruit de la melonera. Aquest fet té una simple explicació i és que per tal de descobrir quin gen és el que causa el color taronja dels vegetals és necessari

experimentar amb una espècie que estigui formada per varietats de color taronja i per varietats d'un color diferent al taronja. Per aquest motiu, s'ha experimentat amb dues varietats de meló, la varietat Vedrantaís (amb la polpa taronja) i la varietat Pell de Gripau (amb la polpa blanca), les quals s'han fet servir com a línies parentals dels encreuaments realitzats. La pregunta que hom es formula a continuació és: "I per què és necessari experimentar amb una varietat taronja i una varietat no taronja d'una mateixa espècie, si l'únic que es vol trobar és el gen responsable del color taronja? Doncs bé, la resposta a la pregunta diu, segons els coneixements adquirits al llarg de la recerca, que per tal de localitzar el gen cal comparar el genotip amb el fenotip. Una cosa està clara i és que les dues varietats tenen el mateix genoma perquè formen part de la mateixa espècie però posseeixen mutacions que provoquen aquesta variabilitat. Després de seqüenciar els respectius genomes cal buscar aquestes mutacions. En la part pràctica s'ha après que, en el cas del gen que proporciona el color taronja, es tracta de mutacions que es donen en un única base nitrogenada de la seqüència d'aquest gen, les quals es coneixen com a Polimorfismes de Nucleòtids Simples (SNP). El següent pas de la recerca ha consistit en encreuar les dues varietats parentals i obtenir 12 melons descendents, els quals són diferents els uns dels altres però tots presenten característiques pròpies de la varietat Vedrantaís i de la varietat Pell de Gripau. El que s'ha fet a continuació és relacionar les mutacions del genoma dels pares amb les dels descendents i, mitjançant l'observació del fenotip (el color taronja i el blanc de la polpa), s'ha arribat a descobrir quina de totes les mutacions que es presenten és la que correspon a la del gen responsable del color taronja. Per entendre-ho millor, si un dels descendents tingués una mutació a la mateixa regió que el meló de la línia parental Pell de Gripau però fos de color taronja, aquesta mutació no correspondria a la del gen que proporciona el color a la polpa. En aquest cas, aquesta mutació correspondria a un gen que aporta informació per a un caràcter fenotípic diferent al del color de la polpa o, bé, tal i com s'ha après, a una seqüència de DNA coneguda amb el nom d'intró (no aporta informació per cap caràcter).

D'aquesta manera, mitjançant aquesta recerca s'han complert diversos objectius proposats a la introducció del treball.

Tal i com s'acaba d'explicar, s'ha après a relacionar les mutacions genètiques que presenten les varietats de meló amb les seves respectives característiques físiques (color de la polpa) per a poder arribar a localitzar un gen candidat.

En la fase de genotipificació, s'ha après a realitzar una correcte extracció de DNA, la qual necessita molta precisió. Gràcies a aquesta etapa de la recerca, ara se sap que una extracció de DNA no es pot portar a terme a partir de qualsevol part de la planta sinó que s'ha de buscar la part amb menys sucres i substàncies que no corresponen a DNA (en el nostre cas ha estat la fulla de la melonera) i que els àcids nucleic són solubles en aigua i no en alcohol.

La recerca ha permès complir el principal objectiu del treball, el qual consistia en localitzar el gen responsable del color taronja i de l'alt contingut de carotenoides en vegetals. Una vegada complert aquest primer objectiu s'ha pogut idear la creació i la producció d'una nova varietat de meló anomenada meló d'Elit, la qual conté tot el genoma de la varietat de meló Pell de Gripau a excepció del gen responsable del color taronja, procedent del genoma de la varietat Vedrantaís.

Aquest treball, a part de la recerca científica també pretén donar una utilitat pràctica a la localització del gen. Actualment, a banda del problema del canvi climàtica i de la necessitat de crear noves varietats, també es viu, en molts països del món on la dieta és precària, una gran quantitat d'epidèmies causades per la deficiència de la vitamina A ja que, tal i com s'ha vist, el cos humà no genera aquesta vitamina i només l'obté a través de la dieta. En la part teòrica del treball s'ha après que en continents com a l'Àsia, on és impossible conrear vegetals rics en provitamina A, la localització del gen que provoca aquesta alta quantitat de carotenoides (provitamina A), i la seva inserció en arròs ha permès crear l'anomenat arròs d'or (mitjançant tècniques biotecnològiques), el qual conté aquesta vitamina i evita la mort de milers d'infants. La nostra recerca, però, s'ha centrat en una aplicació molt més propera a la nostra societat, la creació del meló d'Elit la qual també està relacionada amb la major ingesta de vitamina A. Està demostrat que la majoria de la població consumeix preferiblement un meló Pell de Gripau que no pas un meló Vedrantaís. Això és degut a un simple motiu de dolçor, de gust del fruit i també al temps de vida d'aquest (el meló Pell de Gripau té una vida molt més llarga que Vedrantaís). Però que passaria si la gent conegués l'aport vitamínic que conté cada varietat? Creieu que deixarien de consumir el que més els agrada i començarien a comprar el que posseeix més carotenoides? Doncs bé, la resposta, en la majoria de casos, seria que no. La gent menja per plaer i si no és molt important per al benestar de la seva salut, no deixen de consumir allò que més els hi agrada. Per aquest motiu, la creació d'un meló d'Elit amb totes les característiques pròpies del meló Pell de

Gripau amb l'única excepció del color taronja de la polpa del meló i de l'alt contingut de carotenoides seria una gran idea per millorar la dieta de les persones.

La creació d'aquest meló s'ha observat que seria possible de portar terme a través d'encreuaments, per tant, no es tractaria d'un aliment transgènic però, tal i com diuen les lleis del país, no es podria comercialitzar ja que es tractaria d'un organisme genèticament modificat.

L'objectiu del treball que consistia en conèixer els diferents tipus de tècniques que permeten crear organismes vegetals modificats s'ha tractat, majoritàriament, en la part teòrica del treball. Ara se sap que n'hi ha tres tipus: la creació de plantes transgèniques, els encreuaments i, la més recent i innovadors de totes, la tècnica CRISPR-Cas9. A més a més, però, en la part pràctica del treball, gràcies a la participació del Centre de Recerca per a l'Agricultura Genètica (CRAG) en el programa internacional organitzat per La Pedrera, s'ha tingut l'enorme oportunitat de poder utilitzar aquesta tècnica tan puntera anomenada CRISPR-Cas9, la qual ha permès aprendre a crear, amb les pròpies mans, un organisme genèticament modificat. D'altra banda, sobre aquesta tècnica s'ha après que correspon a un tema de debat molt polèmic de caire ètic, en l'actualitat. Això és degut als molts tipus d'aplicacions que té i al mal ús que se'n fa ja que hi ha persones que l'utilitzen per alterar el seu propi material genètic.

Gràcies als investigadors del CRAG també s'ha adquirit coneixements molt específics sobre el funcionament dels marcadors moleculars i la seva importància a l'hora de crear un mapa genètic. Un dels coneixements més sorprenents adquirits ha estat descobrir que es pot conèixer tots els gens que un organisme posseeix i, a més a més, que existeix la possibilitat de representar-los gràficament i situar-los als cromosomes.

Després de realitzar la recerca i tots els experiments, seguint els mateixos mètodes i tècniques que utilitzen els propis investigadors del CRAG en les seves investigacions científiques, s'ha arribat a la conclusió que poder portar a terme la recerca i l'estudi d'un gen és una tasca que demana molta constància, dedicació, ambició, perseverança i, a més a més, que comporta un alt cost econòmic.

Ha estat una gran satisfacció poder treballar amb científics professionals dins dels laboratoris d'un centre pioner de recerca científica i aprendre quines són les característiques que un bon científic ha de tenir.

9. FONTS CONSULTADES

Absorció i transport del beta-carotè. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875911/>

Aïda Lirola. (2018). BETACAROTENO O PROVITAMINA A: BENEFICIOS, BIODISPONIBILIDAD Y SUPLEMENTO. Consultat 5 juny 2019, des de <https://www.conasi.eu/blog/consejos-de-salud/consejos-de-salud-consejos-de-salud/betacaroteno-fuente-vitamina-a/>

Alcohol i esterilitzador de pines, ganivets, etc. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Ampolleta que conté la bossa amb les llavors, l'aigua i l'imant. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Antonio J. Meléndez-Martínez, Antonio Pérez-Gálvez, María Roca, Rocío Estévez-Santiago, Begoña Olmedilla-Alonso, Adriana Z. Mercadante y José de Jesús Ornelas-Paz. (2012). *Biodisponibilidad de carotenoides, factores que la determinan y métodos de estimación*. Consultat 7 agost 2019, des de http://digital.csic.es/bitstream/10261/159697/1/Carotenoid_Agroaliment_Salud_Cap26.pdf

Aquesta imatge correspon a la taula de resultats obtinguts a partir de l'anàlisi de DNA portat a terme amb ell Nanodrop. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Caixa de porexpan que conté les mostres de fulla per extreure el DNA i meló que és útil per fenotipificar la planta. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Caixa que conté el nitrogen líquid i les mostres de les fulles de la melonera. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Cal resseguir la tija de la melonera abans de tallar la fulla. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Capa externa de la llavor tallada. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Caràcters fenotípics del pèsol estudiats per Mendel. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://biolulia.wordpress.com/biolulia/4-eso/evolucion/2-2-genetica-mendeliana/>

Carmen Alicia Padilla Peña, Jesús Díez Dapena, Emilia Martínez Galisteo, José Antonio Bárcena Ruiz, Concepción García Alfonso. *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. Consultat 6 setembre 2019, des de <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>

Cèl·lules d'*Agrobacterium* col·locades a la placa de Petri. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Codominància en la flor de la Camèlia. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de https://es.wikipedia.org/wiki/Codominancia#/media/Archivo:Co-dominance_Rhododendron.jpg

Creació d'un híbrid comercial a partir de dues línies pures de blat de moro. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://seednews.com.br/edicoes/artigo/1555-la-complejidad-de-los-materiales-hibridos-edicao-novembro-2011>

CuidatePlus. (2019). *Vitamina A*. Consultat 19 octubre 2019, des de <https://cuidateplus.marca.com/alimentacion/diccionario/vitamina-a.html>

Cultiu *Agrobacterium*. [fotografia]. (elaboració pròpia).

DNA recombinant format per un plasmidi aïllat i el gen de la insulina, introduït dins un altre bacteri per crear insulina en grans quantitats i poc temps quan el bacteri es reproduïx. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.slideshare.net/nuriag69/enginyeria-genetica-ppt>

Dominància incompleta. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.lifeder.com/dominancia-incompleta/>

Dr. Irma Roig-Villanova, Dr. Montse Martín. (2019). *Hands on mapping*. Consultat 14 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

Dr. Irma Roig-Villanova, Dr. Montse Martín. (2019). *Introduction to Genotyping*. Consultat 15 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

Dr. Irma Roig-Villanova. (2019). *Crispr*. Consultat 17 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

Dr. Irma Roig-Villanova. (2019). *Genetics and molecular breeding*. Consultat 12 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

Dr. Irma Roig-Villanova. (2019). *Introduction to DNA extraction*. Consultat 11 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

Dr. Montse Martín. (2019). *Data analysis and discussion*. Consultat 16 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

El gen responsable del color taronja es localitza entre els marcadors moleculars 72 i 73a. [fotografia]. (elaboració pròpia).

El gen responsable del color verd es localitza entre els marcadors moleculars 64 i 65. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Electroforesi en gel d'agarosa. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Els al·lels A posseeixen una guanina i es al·lels B una citosina. [fotografia]. (elaboració pròpia).

En el cas A es dona una dominància completa i en el cas B un dominància incompleta. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.lifeder.com/dominancia-completa/>

Endoesperma extret. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Eroski Consumer. (2005). *Melon*. Consultat 7 agost 2019, des de <https://frutas.consumer.es/melon/origen-y-variedades>

Es centrifuguen les mostres amb la centrifugadora. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es marca el meló amb retolador per diferenciar-lo de la resta. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es mesura la llargada i l'amplada del meló. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es mesura la rigidesa i la densitat de la polpa. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es mesura la rigidesa i la densitat de la polpa. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es pesa el meló. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es pipeteja 2 ul DNA a cada foradet de la plata, dins el gel. Els tubs estan coberts amb paper de plata perquè contenen la barreja de la PCR. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es retira el sobrenedant amb l'ajuda d'una pipeta. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es sensor el refractòmetre amb unes gotes d'aigua. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es talla el meló per la meitat. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es talla el meló per la meitat. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es talla el peduncle que uneix el meló amb la tija. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es tira la part superior de plàstic de la pipeta, al recipient dels residus, cada vegada que es pipeteja una mostra de DNA diferent. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Es tiren fotos del meló des de diferents perspectives. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Esteroscopi. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Estructura química carotenoides. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.lifeder.com/carotenoides/>

Estructura química de la Vitamina A. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://blumva.blogspot.com/2013/08/estructura-quimica-de-la-vitamina-a.html>

Estructura química del beta-carotè. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1468§ionid=93501488>

Estructura química del retinil, retinol, retinal i àcid retinoic. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://biohacker.es/vitamina-a/>

Explants col·locades dins les caixes. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Explants modificats genèticament i col·locats a la placa de Petri que conté hormones i herbicides. [fotografia]. (elaboració pròpia).

FITÓ. (2019). *SOBRE NOSOTROS*. Consultat 30 setembre 2019, des de http://www.semillasfito.com/es/empresa/sobre_nosotros/index.htm

Forn per escalfar les mostres. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Francisco M. Cánovas Ramos. (2010). *La genómica de las plantas*. Consultat 8 juliol 2019, des de <http://www.uciencia.uma.es/Revista-Uciencia/La-huella-de-Darwin-sigue-viva/Investigacion/La-genomica-de-las-plantas>

Fulla jove tallada. [fotografia]. (elaboració pròpia).

GRAG. (2019). *Genetic approaches for a sustainable food production* (1a ed.). Barcelona: Consell editorial del GRAG.

Imatge dels melons escanejats. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Imatge on s'observa el ontarget, els offtargets, els gens i la puntuació dels oligosacàrids. La seqüència de PAM s'observa de color taronja (NGG) . [fotografia]. (elaboració pròpia).

ISAAA. (2018). *Molecular Breeding and Marker-Assisted Selection*. Consultat 3 juliol 2019, des de <https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/19/default.asp>

Isomerització carotenoides. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.semanticscholar.org/paper/Carotenoids-and-Their-Isomers%3A-Color-Pigments-in-Khoo-Prasad/55171349681f09449f6cb49cb3576917dd26192b/figure/2>

Isotretinoïna. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://unisima.com/salud/isotretinoïna/>

J. P. Bidanel. (2000). *Utilisation des marqueurs génétiques*. Consultat 1 desembre 2019, des de https://www6.inra.fr/productions-animales/content/download/4108/42029/version/1/file/Prod_Anim_2000_hs_hs_38.pdf

Jimeno Antonio, Ugedo Luis. (2016). *Biología 1r de Batxillerat: Projecte Saber Fer* (1a ed.). Barcelona: Santillana.

Jordi Garcia-Mas. (2017). *Melonomics*. Consultat 20 agost 2019, des de <https://www.melonomics.net/melonomics.html>

José Luis Caballero. (2017). *Conocer los genes de defensa de las plantas para la mejora sostenible de la agricultura*. Consultat 3 juny 2019, des de <https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/2429-conocer-los-genes-de-defensa-de-las-plantas-para-la-mejora-sostenible-de-la-agricultura>

Juan C. Oliveros, Mònica Franch, Daniel Tabas-Madrid, David San-León, Lluís Montoliu, Pilar Cubas and Florencio Pazos. (2016). *Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes*. Consultat 29 agost 2019, des de <https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/breakingcas/?qset=melon>

La fulla es col·loca dins el tub i es marca amb retolador. [fotografia]. (elaboració pròpia).

La línia Pell de Gripau té absència de cèl·lules als extrems. [fotografia]. (elaboració pròpia).

La línia Pell de Gripau té absència de cèl·lules als extrems. [fotografia]. (elaboració pròpia).

La mostra ha estat centrifugada. [fotografia]. (elaboració pròpia).

La pantalla groga correspon a l'ontarget mentre que la gris a l'offtarget. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Lahuertinadetoni. (2015). *Que son las Semillas Híbridas F1*. Consultat 24 octubre 2019, des de <https://www.lahuertinadetoni.es/que-son-las-semillas-hibridas-f1/>

L'aroma és un tret important del fruit. [fotografia]. (elaboració pròpia).

L'aroma és un tret important del fruit. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Les línies de melons que posseeixen bases iguals que el meló Pell de Gripau es col·loquen a les files superiors de la taula. [fotografia]. (elaboració pròpia).

LGC Group video. (5 d'octubre 2015). *How does KASP™ work?* [Vídeo]. Consultat 9 agost 2019, des de <https://www.youtube.com/watch?v=S0m2PrwPdE>

LGC Group video. (9 de novembre 2015). *LGC's KASP Genotyping Chemistry Explained: KASP Assay mix and KASP Master mix*. [Vídeo]. Consultat 9 agost 2019, des de https://www.youtube.com/watch?v=AZYm9g_6cpk

LGC Genomics. (4 de gen. 2013). *How does KASP work?* [Vídeo]. Consultat 9 agost 2019, des de <https://www.youtube.com/watch?v=0SVjhfDtYDk>

Llavors sense l'endosperma col·locades a la Placa de Petro que conté MB. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Localització dels gens i nombre de gens que es troben entre els dos marcadors. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Marcadors moleculars agrupats en els 12 cromosomes. A la banda esquerra de cada cromosoma hi ha marcada la distància entre marcadors, sempre en cM. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Meló (mostra) penjant de la melonera. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Melonera modificada genèticament, crescuda a partir d'un explant. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Meloneres de l'hivernacle de la Torre Marimon. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Melons col·locats dins la caixa de plàstic. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Metabolisme del beta-carotè i la seva activitat provitamina A. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de [file:///C:/Users/Anna%20Fustero/Downloads/999Texto%20del%20manuscrito%20completo%20\(cuadros%20y%20figuras%20insertos\)-4620-1-10-20120923.pdf](file:///C:/Users/Anna%20Fustero/Downloads/999Texto%20del%20manuscrito%20completo%20(cuadros%20y%20figuras%20insertos)-4620-1-10-20120923.pdf)

Miguel Calvo. *CAROTENOIDES*. Consultat 5 juliol 2019, des de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/carotenoides.html>

Miguel Santo Domingo Martínez, Núria Real Tortosa, Dr. Irma Roig-Villanova, Dr. Montse Martín. (2019). *Final sum up*. Consultat 17 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

Miguel Santo Domingo Martínez, Núria Real Tortosa. (2019). *Phenotyping*. Consultat 10 juliol 2019. [Power Point] [CRAG]

Mostres col·locades per ordre a la gradeta, sota la campana de fum. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Nanodrop. La part metàl·lica correspon al braç. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Ordinador connectat al Nanodrop i gràfica obtinguda de la mostra 5. [fotografia]. (elaboració pròpia).

P. Carbonero. (2005). *Ingeniería genética y agricultura contemporánea*. Consultat 25 juliol 2019, des de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/169-mayo-2005/ingeniera-gentica-y-agricultura-contempornea>

Partició del cotiledó en 4 parts. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Petita part dels resultats obtinguts de la genotipificació en la recerca portada a terme pels investigadors. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Placa de Petri que conté 20 llavors de la varietat de meló Vedrantaís. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Placa de Petri que contés les llavors ja germinades. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Plantilla de cadascun dels platets utilitzats. S'observen els 7 SNP o marcadors moleculars del cromosoma 8 (els dos platets de la part superior) i els 7 del cromosoma 9 (els dos platets de la part inferior). Verticalment es pipeteja la barreja PCR i horitzontalment el DNA (a excepció de l'última fila que és el grup control i s'hi afegeix aigua. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Preparació barreja dels tres encebadors. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Preparació de la barreja PCR dins el gel. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Proteïna Cas9 i RNA guia. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://genotipia.com/crispr-cas/>

Resultats de genotipificació i fenotipificació (cromosoma 8) . [fotografia]. (elaboració pròpia).

Resultats de genotipificació i fenotipificació (cromosoma 9) . [fotografia]. (elaboració pròpia).

Resultats de la genotipificació obtinguts en la nostra recerca . [fotografia]. (elaboració pròpia).

Resultats de la tècnica KASPar. A partir de la fluorescència de la PCR, s'ha pogut identificar cada SNP de cada meló a quina varietat correspon, si a Pell de Gripau o a Vedrantaís. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Resultats de l'anàlisi QTL. El gen responsable del color taronja es localitza al cromosoma 9. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Resultats de l'anàlisi QTL. El gen responsable del color verd es localitza al cromosoma 8. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Resultats obtinguts a partir de l'electroforesi en gen d'agarosa. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Rodopsina. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.youtube.com/watch?v=7QbU-ESvtaE>

Rresultats de la genotipificació del cromosoma 9. Les A són al·lels provinents de Vedrantaís i les B al·lels provinents de Pell de Gripau. [fotografia]. (elaboració pròpia).

S'aboca l'Agrobacterium. [fotografia]. (elaboració pròpia).

S'afegeix 350ul de isopropanol a la mostra. [fotografia]. (elaboració pròpia).

S'afegeix 500ul de cloroform:isoamil (24:1) a cadascuna de les mostres. [fotografia]. (elaboració pròpia).

S'afegeix 500ul del buffer Doyle a cada mostra. [fotografia]. (elaboració pròpia).

S'eixuguen els explants. [fotografia]. (elaboració pròpia).

S'exprimeix la polpa del meló extreta, per tal de que els sucres (dissolts) caiguin sobre el sensor. [fotografia]. (elaboració pròpia).

S'extreu polpa del meló per a la posterior prova de sucres. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Substrat i terra necessaris per preparar la barreja. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Taula que mostra el color de la polpa de cada meló. [fotografia]. (elaboració pròpia).

ThermoScience. (2016). *NanoDrop One*. Consultat 7 setembre 2019, des de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf>

Tissue Lyser. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Torratxes col·locades dins la plata i omplertes amb la barreja de substrat, terra i aigua. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Transcripció i traducció genètica. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://www.pinterest.es/pin/209769295116315763/>

Tret de microbales. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de <https://docplayer.es/71223113-L-ingenyeria-genetica-i-la-biotecnologia.html>

Tub que conté el DNA i les proteïnes i sucres. La capa superior és el DNA mentre que les proteïnes i els sucres es troben al fons precipitats. [fotografia]. (elaboració pròpia).

USA gov. (2019). *Vitamin A*. Consultat 3 agost 2019, des de <https://www.usa.gov/espanol/agencias-federales/biblioteca-nacional-de-medicina>

Variació dels fruits de la F2 en relació amb la F1 (híbrids), en set varietats de tomàquet. [fotografia]. (n.d.). Consultat des de https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Variacion-en-frutos-de-la-generacion-F-2-con-relacion-a-la-F-1-en-siete_fig1_259894158

Vòrtex. [fotografia]. (elaboració pròpia).

Wikipedia, autor desconegut. (2016). *Espectrofotómetro*. Consultat 4 juliol 2019, des de <https://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofot%C3%B3metro>

Wikipedia, autor desconegut. (2019). *Epistasia*. Consultat 5 octubre 2019, des de https://es.wikipedia.org/wiki/Epistasia#Epistasia_y_recombinaci%C3%B3n

Zahorí de Ideas. (2016). *Sketching científic CRAG* (1^a ed.). Barcelona: Consell editorial del CRAG.

ANNEX I. CÀLCULS SOLUCIÓ BUFFER

1r. Càlcul NaCl

100ml dó Doyle

1,4M NaCl

M=Molaritat=mols solut/L dó

Massa molecular: M(NaCl)=58.44 g/mol

$$100\text{ml dó Doyle} \cdot \frac{1\text{L dó}}{1000\text{ml dó}} \cdot \frac{1,4\text{mols NaCl}}{1\text{L dó}} \cdot \frac{58,44\text{g NaCl}}{1\text{mol NaCl}} = \boxed{8.18\text{g NaCl}}$$

2n. Càlcul Tris-HCl

100ml dó Doyle

100mM Tris-HCl

M=Molaritat=mols solut/L dó

mM=miliMolaritat=milimols solut/L dó

Massa molecular: M(Tris-HCl)=121.14 g/mol

$$100\text{ml dó Doyle} \cdot \frac{1\text{L dó}}{1000\text{mL dó}} \cdot \frac{100\text{Mmols Tris-HCl}}{1\text{L dó}} \cdot \frac{1\text{mol Tris-HCl}}{1000\text{Mmols Tris-HCl}} = \frac{121.14\text{g Tris-HCl}}{1\text{mol Tris-HCl}} = \boxed{1.2114\text{g Tris-HCl}}$$

3r. Càlcul EDTA, disodio

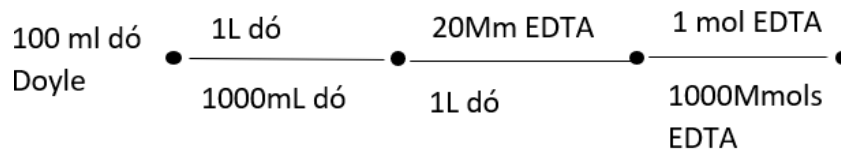
100ml dó Doyle

20mMEDTA

M=Molaritat=mols solut/L dó

mM=miliMolaritat=milimols solut/L dó

Massa molecular: M(EDTA)=372.24g/mol



$$\frac{372.24\text{g EDTA}}{1 \text{ mol EDTA}} = \boxed{0.745\text{g EDTA}}$$