



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola d'Enginyeria Agroalimentària  
i de Biosistemes de Barcelona



Trabajo de Final de Grado  
Ingeniería de Sistemas Biológicos

Septiembre de 2024

Autor: Pablo Gil Fernández

Tutora en empresa: Marta Pujol Abajo

Tutora académica: Irma Roig Villanova

# **ESTUDIO DE LOS GENES ASOCIADOS A LA MADURACIÓN CLIMATÉRICA DEL MELÓN MEDIANTE EL MAPEO FINO DEL *LOCUS* DE CARÁCTER CUANTITATIVO *MAK.10-1*.**



## Resumen

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie ampliamente cultivada a nivel global, con una significativa importancia económica gracias a la diversidad de formas, aromas y colores que presentan sus distintas variedades. Estas características no solo le otorgan un gran valor comercial, sino que también lo posicionan como un cultivo de interés tanto para el ámbito agrícola como científico. Un proceso esencial en el desarrollo de cualquier fruto es la maduración, la cual permite generar y dispersar las semillas para perpetuar la genética de la especie. En el melón existen dos tipos de maduración, la climatérica y no climatérica; la climatérica se caracteriza por producir un pico de la hormona etileno y aumentar la respiración celular, mientras que la no climatérica carece de dichas características. Este contraste hace del melón un organismo ideal para estudiar el proceso de maduración del fruto.

Con el objetivo de identificar los genes responsables de la maduración del fruto del melón, en este proyecto se ha realizado un mapeo fino del *locus* de carácter cuantitativo (QTL) *MAK.10-1*. A través de una segunda generación filial (F2) derivada de una línea de introgresión (IL) MAKR40 obtenida mediante el cruce de las variedades 'Ginsen makuwa' (Makuwa) y 'Védrantais' (Ved), se buscó acotar la región del genoma implicada en el retraso de la maduración.

Para el desarrollo del mapeo fino se hicieron germinar y se genotiparon unos 5000 individuos de la población F2, obteniendo 48 individuos F2 recombinantes en la región del QTL mediante el uso de marcadores flanqueantes. Los individuos recombinantes se llevaron a invernadero para el desarrollo del fruto y se fenotiparon caracteres relacionados con la maduración.

El análisis de los recombinantes permitió acotar la región del QTL a 150 kb, donde se encuentran 20 genes. Algunos de estos han sido estudiados en mayor profundidad, y se ha llegado a sugerir varios candidatos potenciales implicados en la regulación de la maduración climatérica del melón.

Este proyecto proporciona una base para la futura investigación de la maduración climatérica del melón y su mejora genética, con potenciales aplicaciones en el sector agronómico.

## Resum

El meló (*Cucumis melo* L.) és una espècie àmpliament cultivada a nivell global, amb una significativa importància econòmica gràcies a la diversitat de formes, aromes i colors que presenten les seves diferents varietats. Aquestes característiques no sols li atorguen un gran valor comercial, sinó que també el posicionen com un cultiu d'interès tant per a l'àmbit agrícola com a científic. Un procés essencial en el desenvolupament de qualsevol fruit és la maduració, la qual permet generar i dispersar les llavors per a perpetuar la genètica de l'espècie. En el meló existeixen dos tipus de maduració, la climatèrica i no climatèrica; la climatèrica es caracteritza per produir un pic de l'hormona d'etilè i augmentar la respiració cel·lular, mentre que la no climatèrica manca d'aquestes característiques. Aquest contrast fa del meló un organisme prometededor per a estudiar el procés de maduració del fruit.

Amb l'objectiu d'estudiar els gens responsables de la maduració del fruit del meló, en aquest projecte s'ha realitzat un mapatge fi del locus de caràcter quantitatiu (QTL) MAK.10-1. A través d'una segona generació filial (F2) derivada d'una línia de introgressió (IL) MAKR40 obtinguda mitjançant l'encreuament de les varietats 'Ginsen makuwa' (Makuwa) i 'Védrantais' (Ved), es va buscar delimitar la regió del genoma implicada en el retard de la maduració.

Per al desenvolupament del mapatge fi es van fer germinar i es van genotipar uns 5000 individus de la població F2, obtenint 48 individus F2 recombinants a la regió del QTL mitjançant l'ús de marcadors flanquejants. Els individus recombinants es van emportar a hivernacle per al desenvolupament del fruit i es van fenotipar caràcters relacionats amb la maduració.

L'anàlisi dels recombinants va permetre delimitar la regió del QTL a 150 kb, on es troben 20 gens. Alguns d'aquests han estat estudiats en major profunditat, i s'ha arribat a suggerir diversos candidats potencials implicats en la regulació de la maduració climatèrica del meló.

Aquest projecte proporciona una base per a la futura recerca de la maduració climatèrica del meló i la seva millora genètica, amb potencials aplicacions en el sector agronòmic.

## Abstract

The melon (*Cucumis melo* L.) is a widely cultivated species globally, with significant economic importance thanks to the diversity of shapes, flavours and colours its different varieties. These characteristics not only give it great commercial value, but also position it as a crop of interest for both agricultural and scientific purposes. An essential process in the development of any fruit is ripening, which makes it possible to generate and disperse seeds to perpetuate the genetics of the species. In melon there are two types of ripening, the climacteric and non-climacteric; the climacteric one is characterised by the production of an ethylene peak and an increase in cellular respiration, while the non-climacteric lacks these characteristics. This contrast makes the melon a promising organism to study the fruit ripening process.

With the objective of studying the genes responsible for the melon fruit ripening, in this project a fine mapping of the quantitative trait locus (QTL) MAK.10-1 has been carried out. Through an F2 derived from an introgression line (IL) MAKR40 obtained through the enhancement of the 'Ginsen makuwa' (Makuwa) and 'Védrantais' (Ved) varieties, we will seek to delimit the region of the genome involved in the delay in ripening.

To develop the fine mapping near 5000 individuals from the F2 population were germinated and genotyped, obtaining 48 F2 recombinant individuals in the QTL region by using flanking markers. The recombinant individuals were imported into the greenhouse for the fruit development and were phenotyped for ripening-related characters.

The analysis of the recombinants allowed to delimit the QTL region to 150 kb, where 20 genes are found. Some of these have been studied in greater depth, and several potential candidates involved in the regulation of climacteric ripening of melon are suggested.

This project provides a basis for future research on the climacteric ripening of melo and the genetic harvest, with potential applications in the agronomic sector.

## Sumario

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	12
SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	15
GLOSARIO	17
AGRADECIMIENTOS	19
1. INTRODUCCIÓN	20
El melón.....	20
Maduración del melón .....	24
Estudio de los <i>loci</i> de caracteres cuantitativos .....	25
Antecedentes.....	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 Material vegetal .....	34
3.2 Extracción de ADN.....	38
3.2.1. Extracción rápida de ADN .....	38
3.2.2. Extracción de ADN Doyle .....	38
3.3 Diseño del genotipado.....	39
3.4 Genotipado.....	40
3.5 Fenotipado.....	41
3.6 Análisis de datos .....	42
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1. Obtención de plantas recombinantes en el intervalo del QTL <i>MAK.10-1</i> y caracterización genotípica de las plantas recombinantes mediante marcadores internos. ....	43
4.2. Caracterización fenotípica de los recombinantes obtenidos, sus parentales y obtención de la semilla F3.....	45
4.3. Estudio bioinformático de los genes dentro de la región de interés.....	53
5 CONCLUSIONES	60
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7 ANEXOS	67
Anexo A – Marcadores y secuencias .....	67

---

<b>Anexo B – Resultados de las pruebas estadísticas .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo C – Genes, ortólogos y función.....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo D - Fotografías de los melones durante el fenotipado.....</b>	<b>81</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Área geográfica natural de <i>Cucumis</i> (sombreado) y origen del material genético. Triángulos, clado asiático/australiano; círculos, clado africano. _____	21
<b>Figura 2.</b> Producción media de melones cantalupos y otros melones en cada país del 2000-2022. _____	22
<b>Figura 3.</b> Producción y área de cosecha de melones cantalupos y otros melones a nivel mundial del 2000-2022. _____	23
<b>Figura 4.</b> Producción y área de cosecha de melones cantalupos y otros melones en España del 2000-2022. _____	23
<b>Figura 5.</b> Características de la maduración climatérica y no climatérica en el melón. _____	25
<b>Figura 6.</b> Mapa genético del cromosoma 10 del melón donde aparecen los marcadores y el gen CmKFB. _____	26
<b>Figura 7.</b> Representación del <i>single nucleotide polymorphism</i> . _____	27
<b>Figura 8.</b> Representación gráfica de los pasos de una PCR. _____	28
<b>Figura 9.</b> Funcionamiento de la tecnología PACE para ADN. _____	29
<b>Figura 10.</b> Representación gráfica de las ILs/NILs (A) y de las RILS (B). _____	30
<b>Figura 11.</b> Representación de los cruces realizados para llegar hasta la población F2 de este proyecto. _____	31
<b>Figura 12.</b> Representación de los marcadores y regiones del QTL <i>MAK_10-1</i> para cada línea. ____	32
<b>Figura 13.</b> Germinación de las semillas. _____	35
<b>Figura 14.</b> Germinación de las semillas en la cámara. _____	35
<b>Figura 15.</b> Distribución de las plantas en el invernadero del CRAG. _____	36

- Figura 16.** Distribución de las plantas en las instalaciones del IRTA. \_\_\_\_\_ 37
- Figura 17.** A) Organización de las plantas crecidas. B) Polinización manual de una flor femenina (izquierda) con una masculina (derecha). \_\_\_\_\_ 37
- Figura 18.** Representación de los marcadores y su posición. En verde, los marcadores flanqueantes; en azul, marcadores internos dentro de la región de interés. \_\_\_\_\_ 39
- Figura 19.** Fenotipado de los rasgos: A) Aparición temprana de la capa de abscisión (EALF), marcada con un círculo rojo; B) Cambio temprano de color (EC) \_\_\_\_\_ 41
- Figura 20.** Interfaz de los resultados obtenidos en el *LightCycler*. Cada triángulo representa un individuo y cada color un genotipo: azul, alelo X; rojo, heterocigoto; rojo, alelo Y; rosa, desconocido; gris, negativo. \_\_\_\_\_ 43
- Figura 21.** Diagrama de cajas para el rasgo formación temprana de la capa de abscisión (EALF) medida en DAPs. \_\_\_\_\_ 47
- Figura 22.** Diagrama de cajas para el rasgo cambio temprano de color (EC) medido en DAPs. \_\_\_\_ 48
- Figura 23.** Diagrama de cajas para el rasgo aparición temprana del aroma (EARO) medida en DAPs. \_\_\_\_\_ 49
- Figura 24.** Diagrama de cajas para el rasgo cosecha (DAPs). \_\_\_\_\_ 49
- Figura 25.** Diagrama de cajas para el rasgo peso del fruto (FW) medido en g. \_\_\_\_\_ 50
- Figura 26.** Diagrama de cajas para el rasgo firmeza de la pulpa (FF) medida en kg/cm<sup>2</sup>. \_\_\_\_\_ 51
- Figura 27.** Diagrama de cajas para el rasgo contenido de sólidos solubles (SSC) medido en °Brix. 52
- Figura 28.** Representación de los genes en el cromosoma 10 entre las posiciones de los cebadores y su distancia entre ellos, extraído de la base de datos de *Melonomics* (v4.0). Verde, distancia entre marcadores flanqueantes; azul, distancia entre el marcador interno y el flanqueante. \_\_\_\_\_ 53

- Figura 29.** Evolución de la expresión del gen *MELO3C012471* durante los días después de la polinización en las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védrantais’. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. \_\_\_\_\_ 55
- Figura 30.** A) Expresión del gen *MELO3C012465* en diferentes tejidos de la planta del melón. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012465* durante los días después de la polinización en las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védrantais’. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. \_\_\_\_\_ 56
- Figura 31.** A) Expresión del gen *MELO3C012462* en diferentes tejidos de la planta del melón. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012462* durante los días después de la polinización en las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védrantais’. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. \_\_\_\_\_ 57
- Figura 32.** A) Expresión del gen *MELO3C012466* en diferentes tejidos de la planta del melón. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012466* durante los días después de la polinización en las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védrantais’. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. \_\_\_\_\_ 58
- Figura 33.** A) Expresión del gen *MELO3C012472* en diferentes tejidos de la planta del melón. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012472* durante los días después de la polinización en las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védrantais’. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. \_\_\_\_\_ 59
- Figura anexo B-1.** Representaciones gráficas de la prueba de Games-Howell. El valor de cada nodo corresponde al rango promedio de cada grupo, y cada línea corresponde a la diferencia significativa entre dos grupos. \_\_\_\_\_ 75
- Figura anexo D-1.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo: 1QMAK10\_4, *Makuwa\_2*, *Makuwa\_9* y MAKR40\_33. \_\_\_\_\_ 81
- Figura anexo D-2.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo: *F1 MxV\_19*, MAKR40\_33, MAKR40\_36 y MAKR40\_38. \_\_\_\_\_ 82

**Figura anexo D-3.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo: R4, R16, R6 y R25. \_\_\_\_\_ 83

**Figura anexo D-4.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo: R25, R35 y Ved\_36. \_\_\_\_\_ 84

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Nombres con las posiciones de los marcadores utilizados y nucleótido detectado. En verde los flanqueantes, en azul los marcadores internos. _____	39
<b>Tabla 2.</b> Volúmenes necesarios para la PCR PACE2.0 _____	40
<b>Tabla 3.</b> Programa del LightCycler para la PCR PACE2.0. _____	40
<b>Tabla 4.</b> Genotipo de los individuos recombinantes para cada marcador. A, genotipo 'Védrantais'; B, genotipo 'Ginsen makuwa'; H, genotipo heterocigoto. _____	44
<b>Tabla 5.</b> Genotipo de cada grupo de recombinantes para cada marcador. A, genotipo 'Védrantais'; B, genotipo 'Ginsen makuwa'; H, genotipo heterocigoto. _____	44
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Chi-cuadrado para la segregación mendeliana de los alelos en la población F2 para cada marcador. A, genotipo 'Védrantais'; B, genotipo 'Ginsen makuwa'; H, heterocigoto. _____	45
<b>Tabla 7.</b> Valores de la media, desviación y error estándar de las líneas para las características fenotípicas formación temprana de la capa de abscisión (EALF), cambio de color temprano (EC), producción temprana de aroma (EARO), cosecha, peso del fruto (FW), contenido de sólidos solubles (SSC) y firmeza de la pulpa (FF). _____	46
<b>Tabla 8.</b> Asociación fenotipo-genotipo para cada línea estudiada. A, genotipo 'Védrantais'; B, genotipo Makuwa; H, genotipo heterocigoto. _____	53
<b>Tabla 9.</b> Listado de genes en la región acotada de 150 kb. _____	54
<b>Tabla anexo A-1.</b> Marcadores y secuencias correspondientes a cada uno. _____	67
<b>Tabla anexo B-1.</b> Prueba de normalidad entre grupos para todos los rasgos analizados: FW, SSC, FF, EALF, EC, EARO y cosecha. _____	68

<b>Tabla anexo B-2.</b> Prueba ANOVA y de homogeneidad de varianzas entre grupos para los rasgos EALF y FW. _____	69
<b>Tabla anexo B-3.</b> Prueba de Tukey para el rasgo EALF. _____	70
<b>Tabla anexo B-4.</b> Pruebas de ANOVA de Welch y comparaciones múltiples para el rasgo peso del fruto. _____	70
<b>Tabla anexo B-5.</b> Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los rasgos SSC, FF, EC, EARO y cosecha. _____	717
<b>Tabla anexo B-6.</b> Comparaciones múltiples por parejas para los rasgos SSC, FF, EC, EARO y cosecha. _____	72
<b>Tabla anexo C-1.</b> Genes del melón, ortólogos en otros organismos y función. _____	75



## Símbolos y acrónimos

cM: centimorgan.

DAPs: *Days After Pollination*, días después de la polinización.

EALF: *Earliness of Abscission Layer Formation*, formación temprana de la capa de abscisión.

EARO: *Earliness of Aroma production*, producción temprana de aroma.

EC: *Earliness of Color change*, cambio temprano del color.

FF: *Flesh Firmness*, firmeza de la pulpa.

FW: *Fruit Weight*, peso del fruto.

Fw: forward, directo.

ILs/NILs: *Introgression Lines/Near Isogenic Lines*, Líneas de introgresión/Líneas casi isogénicas.

NGS: *Next Generation Sequencing*, Secuenciación de nueva generación.

pb: pares de bases; Kb: Kilo pares de bases ( $10^3$ ); Mb: Mega pares de bases ( $10^6$ ).

M: molar (mol/L); mM: milimolar (mmol/L).

QTL: *Quantitative Trait Locus*, *Locus* de carácter cuantitativo.

Rv: reverse, complementario

SSC: *Soluble Solids Content*, contenido de sólidos solubles.

Ved: 'Védrantais'

.



## Glosario

Ácido abscísico: fitohormona encargada de varios procesos como desarrollo, maduración y respuestas a estrés en la planta.

ADN monocatenario: hebra de ADN solitaria, separada de su complementaria.

Clado: agrupación de organismos que incluye el antepasado común junto a sus descendientes.

Diploide: organismo o célula poseedor de dos juegos de cromosomas.

Etileno: hormona vegetal (fitohormona) relacionada con muchos procesos de la planta, así como la maduración de los frutos climatéricos.

Factores de transcripción: proteínas altamente específicas encargadas de regular la expresión de los genes.

Fenotipo: Medida de una característica física resultante de la interacción del genotipo y el ambiente

ILs/NILs: Líneas de poblaciones de plantas donde un segmento de su genoma pertenece a otro organismo; si el fragmento es grande se considera IL, mientras que, si es muy pequeño, NIL.

Introgresión: introducción de fragmentos de la genética de un organismo en otro distinto.

LDH: Línea Doble Haploide.

Locus (singular)/Loci (plural): posición o posiciones fijas del genoma en las que se encuentran uno o varios genes o marcadores.

Monoica: planta que posee flores masculinas y femeninas separadamente.

NGS: *Next Generation Sequencing*, tecnologías de vanguardia para la secuenciación masiva de genomas.

Ortólogo: genes en diferentes especies que proceden de un ancestro común, pero separados por la especiación.

Pepónide: tipo de fruto con interior carnoso y semillas unidas a las tres placentas.

QTL: regiones del ADN asociados a un carácter cuantitativo.

RILs: Líneas de poblaciones de plantas fruto de la sucesiva autofecundación de la F1 proveniente del cruce de dos líneas puras para formar una nueva con la genética de los parentales.

Tricoma: excrecencia epidérmica que aparece como un relieve sobre la superficie de cualquier órgano vegetal. Deriva de células epidérmicas especializadas y puede tener diferentes funciones.

## Agradecimientos

Durante el desarrollo y la realización de este proyecto muchas personas han estado acompañándome, haciendo el camino más llevadero, divertido e interesante, pero, sobre todo, inolvidable.

Este proyecto marca un punto final (o no) a mis estudios universitarios, una etapa que todo estudiante recuerda, frutos de todo el esfuerzo, trabajo, triunfos, derrotas y amistades cosechados a lo largo de estos años. Es inevitable echar la vista atrás y reflexionar acerca de todo lo logrado, y aún más ambiciosamente en todo lo que queda por llegar, ya que esto es solo el principio de la gran historia que es la vida.

Dicho esto, quiero agradecer al centro del CRAG por dejarme aprender junto a grandes profesionales del mundo de la genética y la ciencia, en un ambiente tan cercano y comprensivo. Gracias por transmitirme el conocimiento necesario para poder llevar a cabo este trabajo, despertando aún más mi interés en el sector. Mi más sincero agradecimiento a Marta Pujol por la oportunidad de seguir tan de cerca un proyecto como este y enseñarme más sobre la realidad científica. Muchas gracias también al grupo del melón por hacerme sentir tan acogido durante todo el trabajo, haciéndome sentir cómodo durante todo este tiempo, especialmente a mi gran amiga Montse, que me ha guiado más veces de las que recuerdo y con la que siempre estaré en deuda por toda su ayuda, amabilidad y constancia.

A Irma Roig y Joan Casals les expreso mi gratitud por confiar en mí para realizar este proyecto (junto a algún otro) y por compartir su pasión por la biología molecular y la genética como hacen. Su entusiasmo me inspira a buscar el conocimiento allá donde voy e interesarme aún más por el bello mundo que nos rodea.

También a todos mis compañeros y amigos, que no solo han pasado por mi vida, sino que se han quedado. Me dejan maravillosos recuerdos que, con toda certeza, rememoraré durante mucho tiempo. Gracias por hacerme sentir mejor y hacerme creer en mí mismo, incluso cuando más bajas han sido mis horas. No podría enorgullecerme más de todas las amistades forjadas en el camino y cuyos lazos, aunque cada vez se hagan más largos, seguirán siendo irrompibles.

A mis estimados padres, por estar siempre a mi lado y brindarme todas las oportunidades posibles para que pudiera labrarme mi futuro como yo deseaba, cuidando de mí siempre y aguantando todos mis defectos e inquietudes (que no son pocos).

Por si no ha quedado claro, me siento inmensamente agradecido por la experiencia universitaria y el camino recorrido hasta ahora. El trayecto no ha sido nunca fácil, pero eso es precisamente lo que me motiva a seguir adelante.

Por el viaje, antes que el destino. *SIC PARVIS MAGNA.*

# 1. Introducción

## El melón

### -Descripción:

El melón (*Cucumis melo* L.) es una planta de indiscutible importancia económica y alimentaria que ha sido cultivada durante milenios en diversas partes del mundo <sup>1</sup>. Se caracteriza por ser una especie diploide ( $2n = 2x = 24$ ) con un genoma estimado de 450 Mega pares de bases (Mpb), dicotiledónea, monoica, herbácea y anual. Pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, un grupo de plantas que abarca más de 1000 especies distintas. Dentro de esta familia, el melón comparte parentesco con otras plantas ampliamente cultivadas, como la calabaza (*Cucurbita pepo*), el pepino (*Cucumis sativus*) y la sandía (*Citrullus lanatus*).

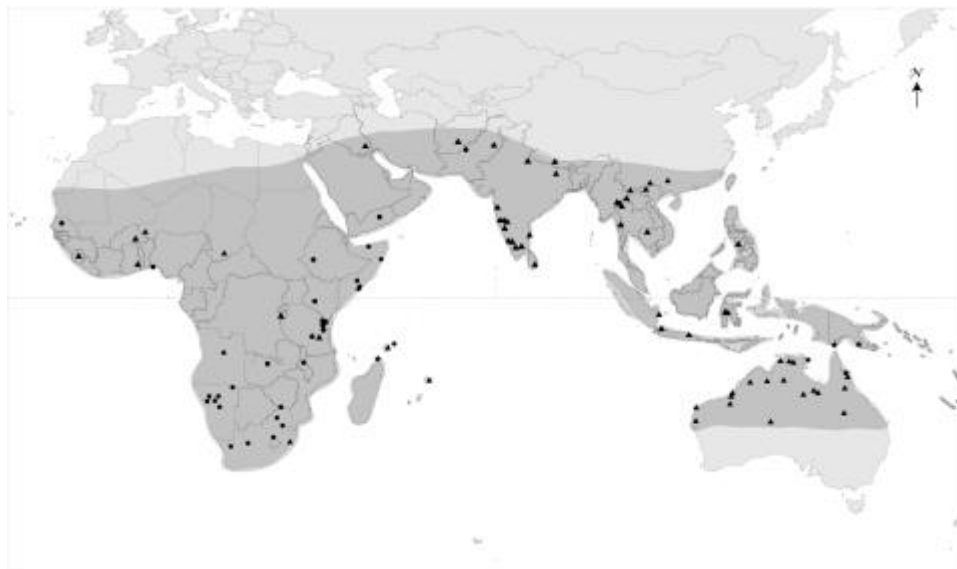
El melón presenta un sistema radicular extenso, el cual puede alcanzar profundidades de dos metros; no posee tronco y el desarrollo del tallo es rastrero o trepador, el cual está recubierto de tricomas que actúan como defensa. Las hojas son grandes y palmadas, con peciolo acanalado. Las flores masculinas son las primeras en aparecer en la planta, fácilmente diferenciables a las femeninas debido a que estas contienen un ovario ínfero que les proporciona un mayor tamaño. Su fruto es una pepónide de gran diversidad morfológica que contiene las semillas, normalmente ovaladas y planas (aunque existen formas irregulares) y de longitud máxima de un par de centímetros <sup>2</sup>.

A día de hoy y gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS) se dispone de un genoma de referencia de calidad (LDH92v4) que ha proporcionado la información necesaria para poder desarrollar múltiples marcadores moleculares basados en su secuencia de ADN <sup>3,4</sup>.

### -Origen

El origen del melón se había atribuido al continente africano, pese a que los parientes más cercanos del melón actual se encuentran en Asia y Australia. Estudios más actuales afirman el origen asiático a causa de que sus más cercanos parientes, *C. trigonus* y *C. picrocarpus*, fueron

encontrados en la India y Australia respectivamente, las cuales se separaron hace aproximadamente 3 millones de años (Ma) del melón actual <sup>5</sup>. De este modo, se sugiere Asia como el centro de origen para el antepasado común del melón, siendo África y Australia los otros centros de domesticación <sup>6,7</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Área geográfica natural de *Cucumis* (sombreado) y origen del material genético.

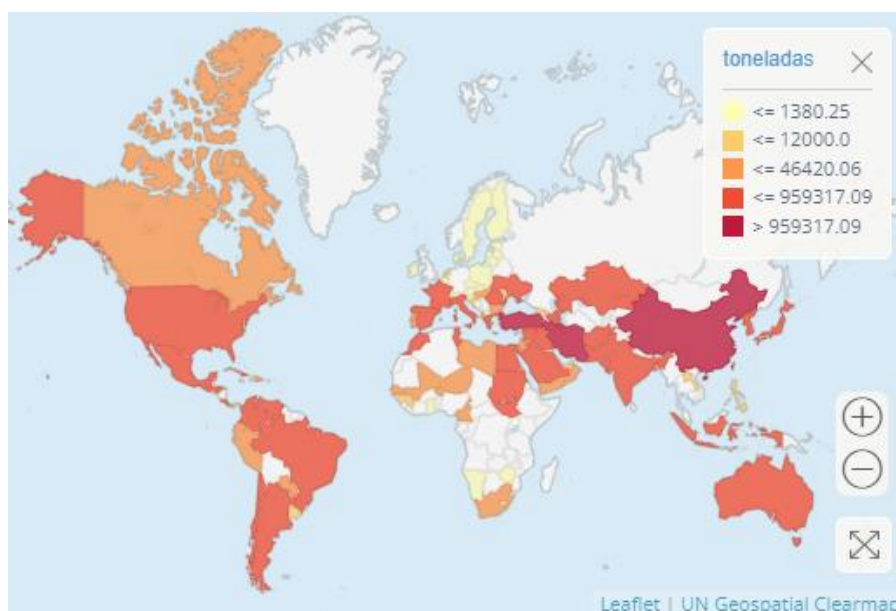
Triángulos, clado asiático/australiano; círculos, clado africano. Fuente: <sup>5</sup>.

Debido a estos eventos, el melón se ha clasificado en dos subespecies, la asiática *C. melo* ssp. *melo* (*melo*) y la africana *C. melo* ssp. *agrestis* (*agrestis*), basados en la pubescencia del ovario <sup>8</sup>; estas a su vez se agrupan en 16 grupos botánicos <sup>9</sup>: *conomon*, *Makuwa*, *chinensis*, *momordica*, *chito*, *tibish* y *acidulus* pertenecen a la subespecie *agrestis*, mientras que *cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chate* y *dudam* pertenecen a la subespecie *melo* <sup>10</sup>.

Conocer los centros de domesticación de este cultivo ha sido esencial para poder introgresar resistencias frente diferentes tipos de estrés provenientes de las variedades silvestres a las tradicionales, con la finalidad de obtener variedades mejoradas <sup>5</sup>.

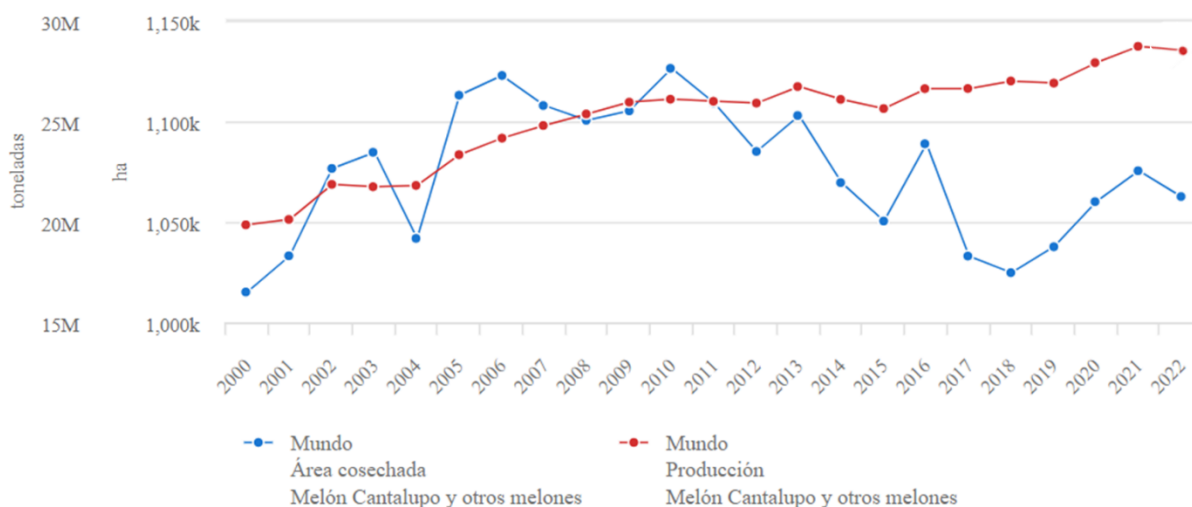
## - Producción en el mundo

A nivel económico el melón representa un cultivo de notoria importancia (Figura 2), con una producción, en el 2022, de 28.558.068 toneladas (t) a nivel mundial, y más de 1.062.000 hectáreas (ha) destinadas a su siembra. En el año 2022 China se encuentra encabezando la lista de producción y área de cultivo de melón; con 14.200.547,65 t y 387.797 ha, seguida de Turquía (1.587.230 t y 62.724 ha), India (1.498.000 t y 68.000 ha), Kazajistán (1.214.412,76 t y 49.383 ha), Afganistán (809.194,26 t y 75884 ha), Guatemala (736656,13 t y 33437 ha), Irán (700000 t y 32000 ha), Brasil (699281 t y 27457 ha), Bangladesh (599939 t y 27570 ha) e Italia (590230 t y 22890 ha).



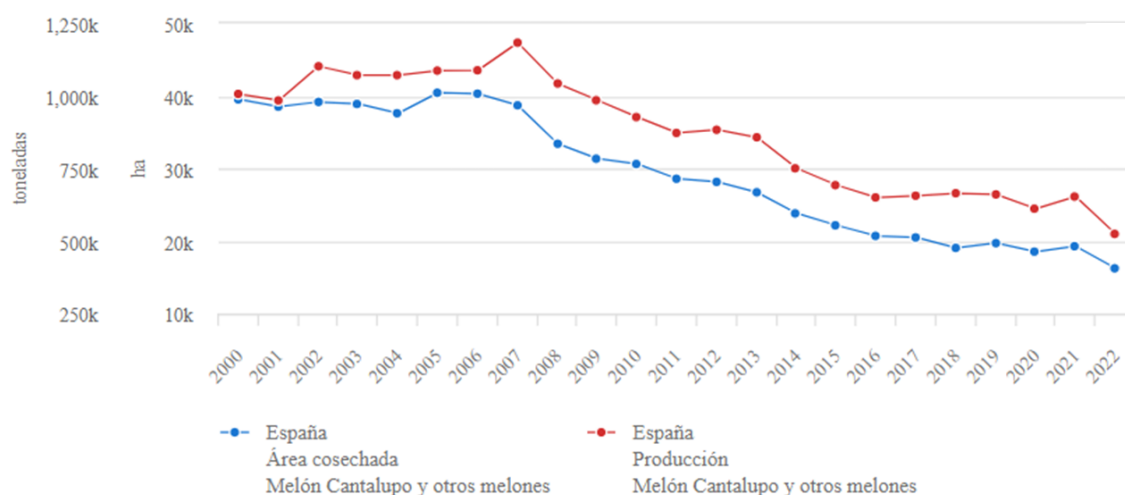
**Figura 2.** Producción media de melones cantalupos y otros melones en cada país del 2000-2022. Fuente: <sup>11</sup>.

Se observa la producción ascendente de melón en todo el mundo año tras año; en el año 2000 se produjeron alrededor de 20 millones de toneladas, mientras que en el 2022 se llegaron a más de 28,5 millones de toneladas. Paralelamente, el área destinada a su cultivo es muy variable si se compara año tras año; en el 2000 se empleaban alrededor de 1015 kha, mientras que en el 2022 fueron utilizadas algo más de 1062 kha<sup>11</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Producción y área de cosecha de melones cantalupos y otros melones a nivel mundial del 2000-2022. Fuente: <sup>11</sup>.

España se encuentra como el decimotercer país productor de melones en el mundo (569871 t y 18211 ha). A nivel nacional la producción de melones cantalupos y otros melones se ha visto mermada, con una tendencia a reducirse año tras año; esta situación ha sido provocada principalmente por la inestabilidad climática, la afección de la especie por la virosis y la rentabilidad económica del agricultor <sup>11, 12</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Producción y área de cosecha de melones cantalupos y otros melones en España del 2000-2022. Fuente: <sup>11</sup>.

## Maduración del melón

La maduración es el último paso en el desarrollo de los frutos carnosas como el melón, lo que conlleva multitud de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que suceden de forma coordinada, y los cambios propician que el fruto sea atractivo para aquel que lo consume. De esta forma, se favorece la propagación de las semillas y, por tanto, de los genes. Hay numerosos cambios relacionados con la maduración, como pueden ser la degradación de clorofila y acumulación de pigmentos, azúcares, compuestos volátiles y abscisión del fruto, entre otros <sup>13</sup>. Gracias a estas características, los frutos carnosos se dividen en dos grandes grupos, las variedades climatéricas y no climatéricas <sup>14</sup> (Figura 5).

La principal diferencia entre las variedades climatéricas y no climatéricas se fundamenta en la forma en que empieza el proceso de maduración. En el caso de los frutos climatéricos, se da por un aumento de la respiración y la producción de etileno; los cambios fenotípicos asociados a esta maduración en el melón son la abscisión del fruto, degradación de la clorofila, disminución de la firmeza de la pulpa, producción de aroma y síntesis de compuestos volátiles <sup>13</sup>. El tomate (*Solanum lycopersicum*) ha sido el fruto modelo para estudiar este tipo de maduración <sup>15</sup>. Contrariamente, en los frutos no climatéricos la regulación de la maduración es dada por el ácido abscísico y otras hormonas como auxinas y ácido jasmónico, por lo que el incremento de la respiración y producción de etileno no suceden. La fresa (*Fragaria x ananassa*) es el organismo modelo para el estudio de este tipo de maduración <sup>16</sup>.

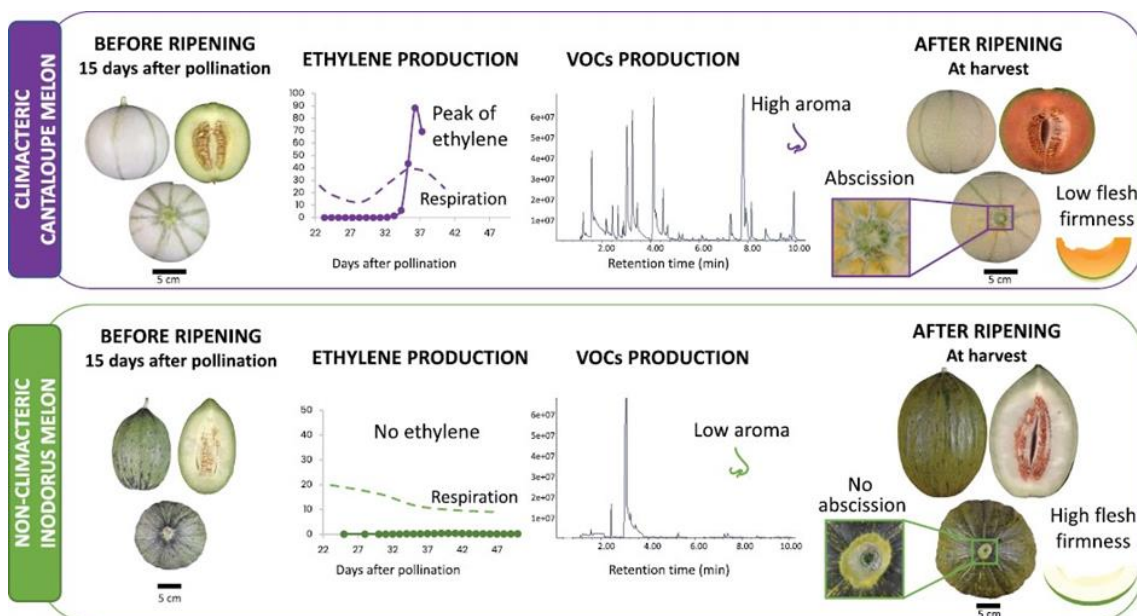


Figura 5. Características de la maduración climática y no climática en el melón. Fuente: <sup>13</sup>.

De este modo, hormonas, genes, factores de transcripción y modificaciones epigenéticas son los considerados reguladores de la maduración <sup>17, 13</sup>.

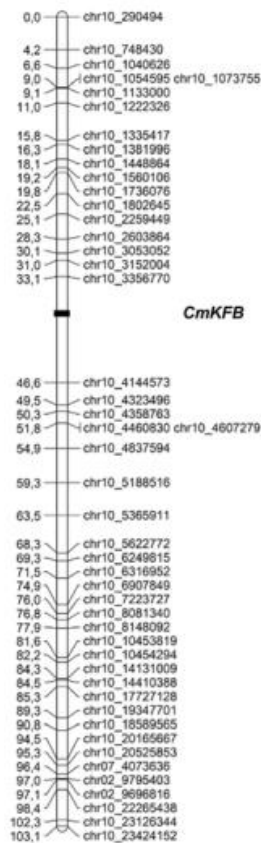
En el caso del melón, coexisten ambos tipos de maduración en la misma especie (Figura 5), hecho que le confiere un gran potencial como organismo modelo para el estudio de caracteres relacionados con la maduración. La maduración es un carácter cuantitativo regulado por multitud de genes. Gracias al descubrimiento de múltiples genes (*Quantitative Trait Locus*, QTLs) reguladores de la maduración de este tipo de fruto, se han podido realizar diferentes cruces entre variedades climáticas y no climáticas, para estudiar la determinación genética de la maduración <sup>18, 19</sup>.

### Estudio de los *loci* de caracteres cuantitativos

-Mapas genéticos

Los mapas genéticos constituyen una herramienta imprescindible para el estudio de QTLs (Figura 6). Se realizan para representar gráficamente la localización relativa de distintos loci en los cromosomas; se construyen a partir de las frecuencias de recombinación, los cuales permiten

conocer la distribución de estos loci en los cromosomas, predecir su transmisión a la descendencia y estudiar su herencia, al igual que poder estudiar relaciones entre distintos loci<sup>20, 21</sup>.



**Figura 6.** Mapa genético del cromosoma 10 del melón donde aparecen los marcadores y el gen

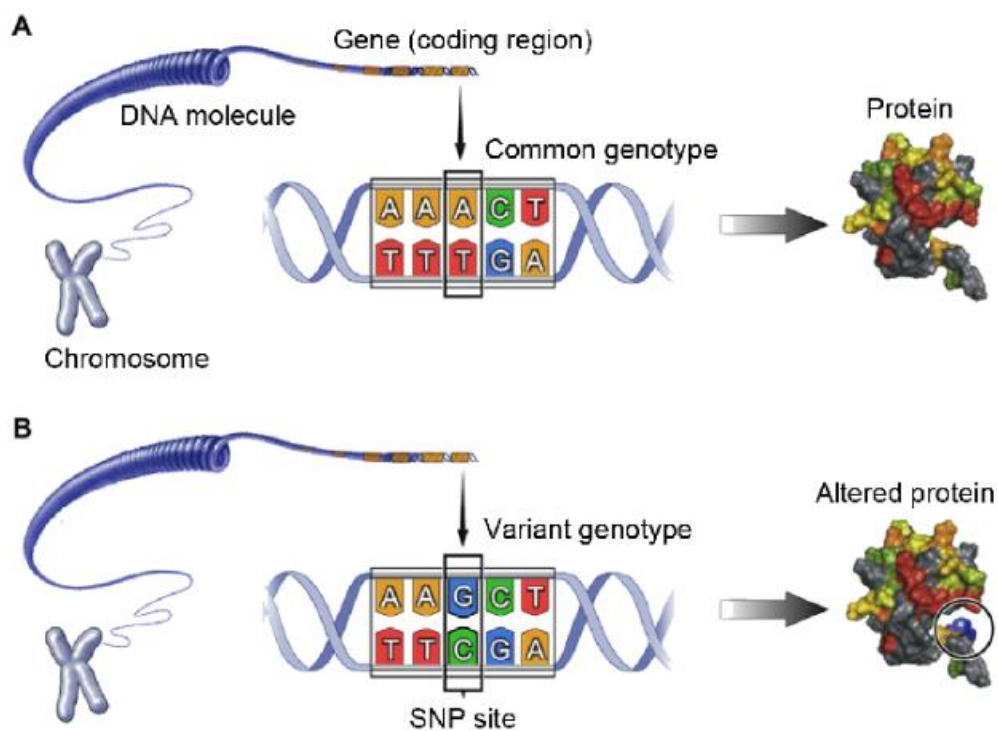
CmKFB. Fuente: <sup>19</sup>.

Con este objetivo, se han desarrollado una gran cantidad de marcadores moleculares que permiten etiquetar genes e inferir el genotipo para un gen que regula un carácter. Los marcadores se tratan de variaciones o polimorfismos a nivel molecular, principalmente en la secuencia de ADN, de los cuales se conoce su localización y el gen al que están asociados. Esto permite catalogar genotipos y fenotipos, lo que proporciona información muy útil a la hora de realizar un programa de mejora vegetal o control genético de la expresión de los caracteres<sup>22</sup>.

Los marcadores moleculares son entonces herramientas imprescindibles para los estudios genéticos. Con esta base, se han caracterizado diferentes tipos de marcadores en función de las distintas variaciones en la secuencia de ADN basados en la técnica de la reacción en cadena de la

polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR); de entre los más utilizados se encuentran los polimorfismos de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*), repeticiones de secuencias simples o microsatélites (*Simple Sequence Repeat, SSR*), secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS*), ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (*Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD*) y polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP*), entre otros <sup>23</sup>.

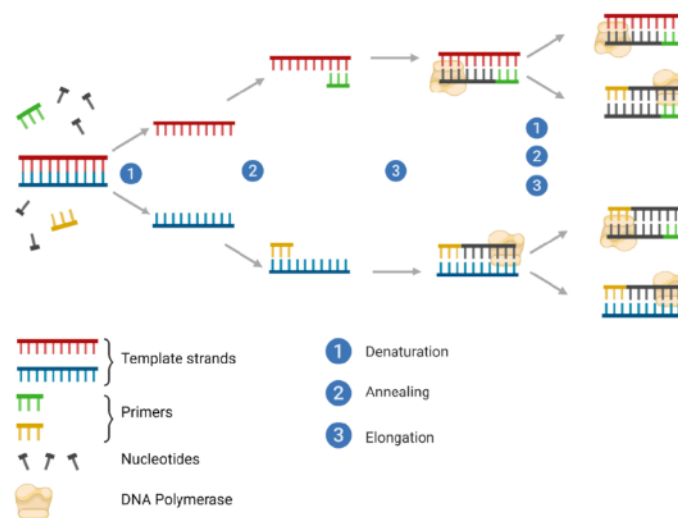
Tomando en especial consideración los SNP, estos se definen como las variaciones de un único nucleótido en la misma posición entre individuos de la misma especie, con una tasa de aparición de la variación superior al 1 %. Esto puede conllevar un cambio de aminoácidos en la proteína y alterar su función siempre y cuando el SNP se encuentre en una región codificante <sup>24</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** Representación del *single nucleotide polymorphism*. Fuente:<sup>25</sup>.

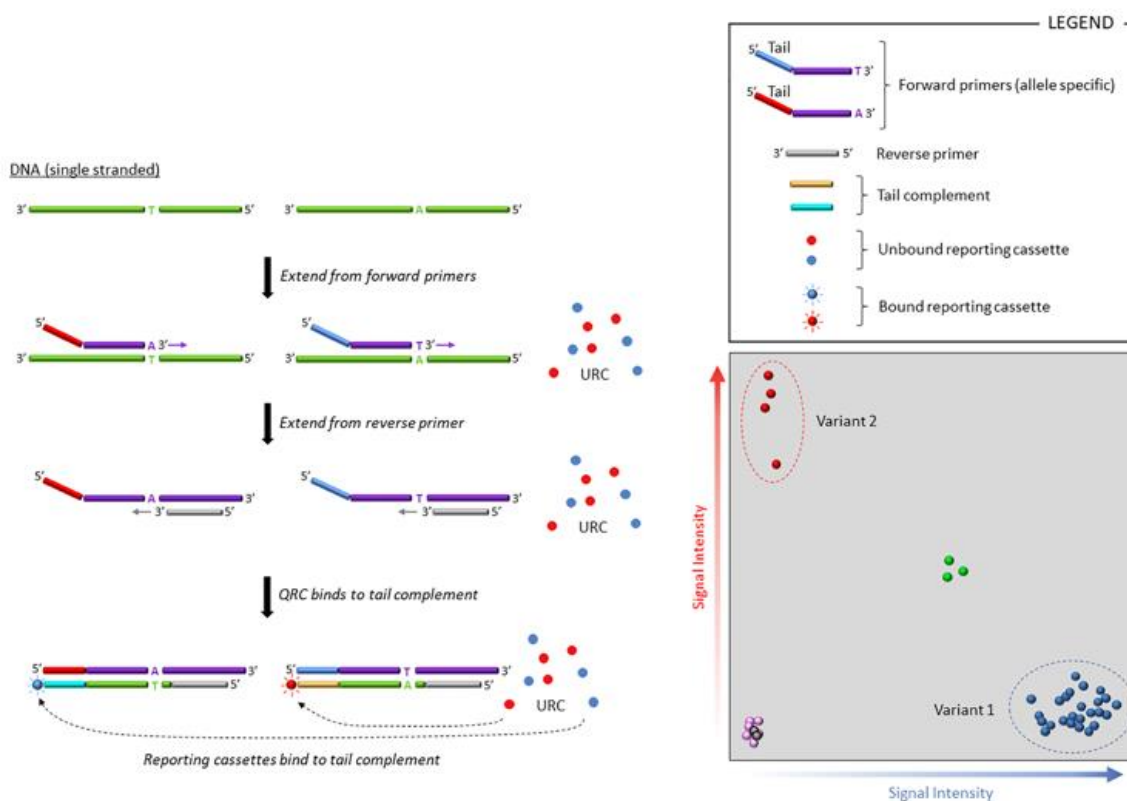
En la realización de este proyecto ha sido esencial el empleo de la técnica *PCR Allelic Competitive Extension* (PACE2.0 *genotyping*) basado en la identificación de distintos SNP mediante fluorocromos.

La PCR es una técnica molecular empleada para amplificar fragmentos de ADN, flanqueados por cebadores llamados directos (*Forward, Fw*) y complementarios (*Reverse, Rv*), los cuales son de secuencias conocidas y delimitan la región que se va a amplificar; la enzima ADN polimerasa es capaz de añadir los nucleótidos complementarios a la cadena monocatenaria de ADN, partiendo de los cebadores. El proceso de la PCR se reduce a tres pasos principales: desnaturalización, alineamiento y elongación (Figura 8). Durante la desnaturalización se separa la doble cadena de ADN mediante alta temperatura y se convierte en ADN de una única cadena; en el alineamiento, los cebadores se unen a las secuencias complementarias de cada cadena monocatenaria de ADN; y en la elongación la polimerasa va añadiendo los nucleótidos correspondientes a la cadena. Este proceso se repite durante varios ciclos, con lo que se replica exponencialmente la cantidad de material genético inicial por cada ciclo.



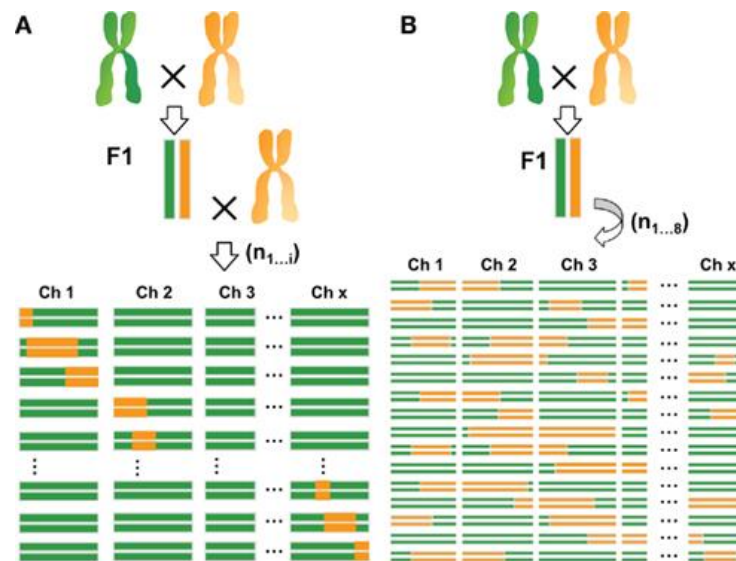
**Figura 8.** Representación gráfica de los pasos de una PCR. Fuente: <sup>26</sup>.

La tecnología de genotipado de SNP PACE2.0 contiene una mezcla de reacción (*master mix*) con los elementos necesarios para la realización de la PCR (ADN polimerasa, solución tampón, dNTPs y cebadores con fluorescencia) además de una mezcla de ensayo (*assay mix*) de tres cebadores, dos directos (uno para cada SNP) y un común complementario. De este modo y para cada combinación alélica, se obtiene una fluorescencia como respuesta al hallazgo del SNP (Figura 9).



**Figura 9.** Funcionamiento de la tecnología PACE para ADN. Adaptado de <sup>27</sup>.

El mapeo fino trata de identificar las distintas variaciones genéticas que afectan causalmente algún rasgo de interés. De esta forma, podemos acotar los genes candidatos de una región asociada a alguna característica específica, y observar las diferentes particularidades que afectan a la expresión de dicha característica <sup>28</sup>. Este proceso de mapeo fino es útil para el campo de la genética, gracias a diferentes tipos de poblaciones que hacen posible el estudio de atributos específicos. Las más usadas son poblaciones derivadas de retrocruzamientos, líneas de introgresión (ILs), líneas casi isogénicas (NILs) y líneas endogámicas recombinantes (RILs), fundamentadas en el cruce de variedades que difieren en el fenotipo de interés <sup>29,30</sup> (Figura 10).



**Figura 10.** Representación gráfica de las ILs/NILs (A) y de las RILs (B). Fuente: <sup>31</sup>.

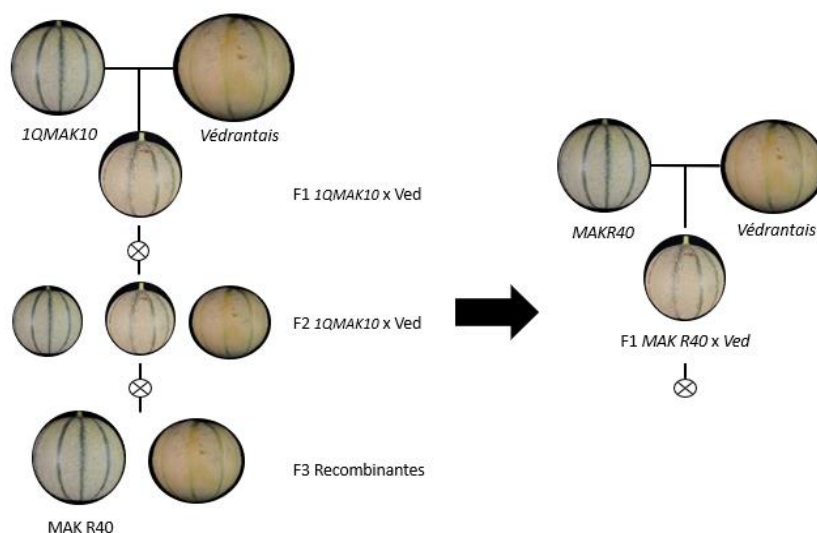
### Antecedentes

Durante estos últimos años, en el centro de investigación *Centre for Research in Agricultural Genomics* (CRAG) y el *Institute of Agrifood Research and Technology* (IRTA) y gracias al trabajo del equipo de Marta Pujol y Jordi García-Mas, en colaboración con otras entidades como el Instituto de Biología Molecular y Celular en Plantas (IBMCP) y la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), se han obtenido grandes avances respecto a la genética del melón.

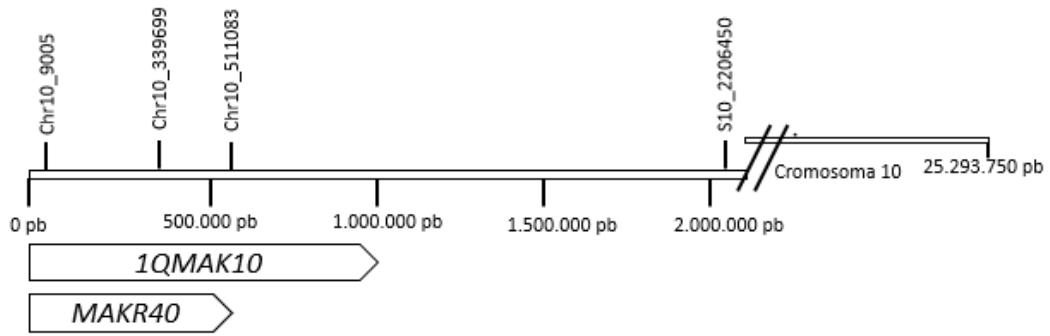
En el 2016 se publicó el desarrollo de una población de ILs en melón de la variedad japonesa ‘Ginsen makuwa’ (Makuwa), ligeramente climatérica, en un fondo genético de la variedad Charentais francesa, ‘Védrantais’ (altamente climatérica, Ved). Este estudio dio como frutos una colección de 27 ILs con las que se detectaron varios QTLs, hasta 47, relacionados con la calidad del fruto, floración y maduración. Una de estas líneas, la llamada ‘MAK\_10-1’ (en adelante nombrada *1QMAK10*), contenía en su genoma tan solo una introgresión del melón ‘Ginsen makuwa’ en el cromosoma 10 de 1,05 Mb situada en el inicio del cromosoma. Esta línea fue la que dio nombre al QTL *MAK.10-1*, el cual demostró alterar la maduración climatérica del melón:

en el momento de su cosecha no formaba capa de abscisión, su carne era más firme y carecía de aroma<sup>32</sup>. Estos resultados se confirmaron el año siguiente<sup>33</sup>, y se concluyó que las características anteriormente mencionadas se retrasaban en la línea *1QMAK10* respecto al parental Ved.

En el 2020 en el CRAG se sembraron las nuevas semillas F2 obtenidas del cruce entre la línea '*1QMAK10*' y Ved para seleccionar individuos recombinantes y disminuir el intervalo del QTL. Estas fueron genotipadas mediante marcadores internos y fenotipadas, de modo que se pudo descubrir que el QTL se situaba al principio de la introgresión. En el año siguiente se produjo la F3 de algunas líneas para lograr la homocigosis en la introgresión de los individuos recombinantes (Figura 11), además de desarrollar más marcadores para aumentar la resolución al principio de la introgresión. Prosiguiendo en el mapeo fino, se obtuvo la línea *MAKR40* (Figura 11), un recombinante cuya introgresión en el cromosoma 10 es muy reducida, pero sigue manteniendo las características de la maduración retrasada de *1QMAK10*, de modo que la región se acotó aún más (Figura 12).



**Figura 11.** Representación de los cruces realizados para llegar hasta la población F2 de este proyecto.



**Figura 12.** Representación de los marcadores y regiones del QTL *MAK\_10-1* para cada línea.

## 2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo de final de grado es el estudio de los genes asociados a la maduración del melón (*Cucumis melo L.*) mediante el mapeo fino del QTL *MAK.10-1*, encargado de demorar la maduración climatérica en melón.

Objetivos específicos:

- 1- Obtención de plantas recombinantes en el intervalo del QTL *MAK.10-1* y caracterización genotípica de las plantas recombinantes mediante marcadores moleculares.
- 2- Caracterización fenotípica de los recombinantes obtenidos, sus parentales y obtención de la semilla F3.
- 3- Estudio bioinformático de los genes dentro de la región de interés.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Material vegetal

-Obtención de las semillas previa al inicio de este proyecto

Para la realización del mapeo fino, la línea *MAKR40* se cruzó con el parental 'Védrantais' produciendo la F1. Esta fue autopolinizada y las semillas F2 se guardaron para la selección de recombinantes al inicio de este trabajo.

- Germinación de las semillas y condiciones iniciales

Inicialmente se hicieron germinar aproximadamente 3000 individuos de la población F2 (*MAKR40* x Ved) con la intención de obtener, al menos, 50 individuos recombinantes. Se tuvo esta consideración partiendo de un estudio anterior en una población RIL entre las variedades 'Védrantais' y 'Piel de Sapo', donde se halló la tasa de recombinación en el cromosoma 10 de aproximadamente 4 centiMorgan (cM) en esta región, con lo que se esperó una tasa aún menor<sup>19</sup>. Al no llegar a la cifra de los 50 recombinantes, se decidió sembrar otros 2000 individuos.

Se utilizaron las líneas control *MAKR40*, *F1 MxV* (Ved x *MAKR40*) y *1QMAK10*, las cuales contienen la introgresión del QTL, y las líneas puras 'Védrantais' y 'Ginsen makuwa'. Para cada línea se utilizaron nueve replicas.

Con el fin de obtener material genético de las distintas semillas de la población F2 y los controles, se hicieron germinar las semillas distribuyendo en placas de Petri alrededor de 100 semillas. Estas fueron tratadas con el fungicida tiram (0,01 M), y se lavaron con agua; se colocó papel húmedo, tanto en la base como en la cubierta de la placa y se introdujeron de nuevo las semillas. Por último, se sellaron las placas con Parafilm con tal de evitar la pérdida de humedad (Figura 13).



**Figura 13.** Germinación de las semillas.

Seguidamente se trasladaron a la cámara de germinación, a una temperatura de 28 °C y con un fotoperíodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad (Figura 14).



**Figura 14.** Germinación de las semillas en la cámara.

En cuanto comenzaron a surgir los primeros brotes, tras 4 o 5 días, las semillas germinadas se transfirieron al invernadero. Se dispusieron en macetas biodegradables con vermiculita, sustrato B y perlita en proporción 1:3:1, se ajustaron las condiciones de cultivo a una temperatura de 28 °C y un fotoperíodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad (Figura 15). Se controló su crecimiento hasta que se expandieron los cotiledones y brotaron las primeras hojas jóvenes, momento en el cual se pudo empezar a extraer ADN de las plantas y comenzar su genotipado.



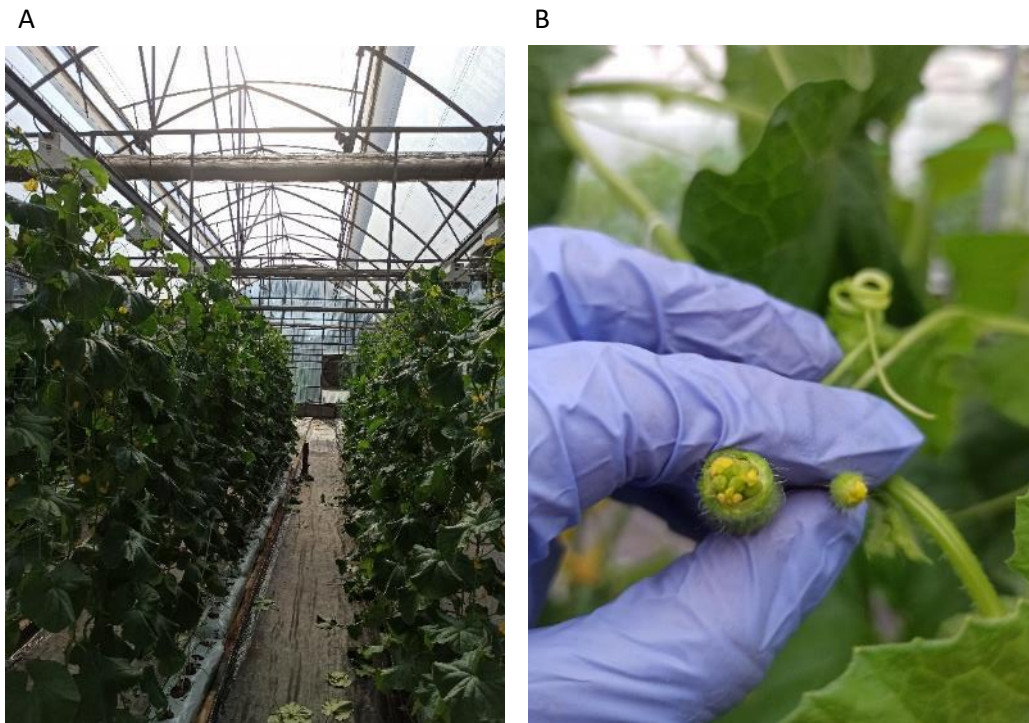
**Figura 15.** Distribución de las plantas en el invernadero del CRAG.

Tras la selección de los individuos recombinantes se procedió, durante principios y mediados del mes de mayo, a su traslado a las instalaciones del IRTA de Torre Marimón, en Caldes de Montbui. Se plantaron en sacos de sustrato de fibra de coco un máximo de 4 plantas por saco para optimizar su crecimiento (Figura 16), y se colocaron tanto los individuos recombinantes como los controles del proyecto.



**Figura 16.** Distribución de las plantas en las instalaciones del IRTA.

Se dejaron crecer las plantas realizando podas cuando era necesario, y se desplegó una malla de plástico para permitir el desarrollo vertical de las plantas. Cuatro semanas después de la plantación, alrededor de finales del mes de mayo, surgieron las primeras flores femeninas, instante en el que se inició el período de polinización (Figura 17).



**Figura 17.** A) Organización de las plantas crecidas. B) Polinización manual de una flor femenina (izquierda) con una masculina (derecha).

La polinización de cada planta se llevó a cabo hasta un máximo de tres flores femeninas por planta y utilizando el polen de tres flores masculinas por cada femenina, con tal de asegurar la fecundación del ovario y aumentar las probabilidades de obtener frutos cuajados. Cada flor femenina polinizada fue etiquetada con el nombre del individuo, tipo de cruce y fecha, además de cubierta con una bolsa de tela para evitar la polinización cruzada.

### 3.2 Extracción de ADN

Durante el proyecto se realizaron dos tipos de extracciones de ADN, de diferente duración, según los diferentes propósitos. La primera se trataba de una extracción rápida para seleccionar raudamente los individuos; la segunda fue una extracción más lenta y rigurosa, para asegurar la pureza y la conservación del ADN durante un mayor período de tiempo.

#### 3.2.1. Extracción rápida de ADN

Primeramente, se introdujeron bolas de acero en cada tubo (1,1 mL) de la caja de 96 microtubos para extracción de ADN. Tras esto, se cortó de cada planta una pequeña sección de una hoja joven y se colocó ordenadamente cada muestra de hoja en un tubo. A continuación, se añadió a cada tubo un volumen de 57  $\mu$ L de NaOH (0,3 M) y se trituraron las muestras en el *TissueLyser (mixer mill)* durante 30 segundos a 30 Hz. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 2 minutos. En este punto, se incubaron los tubos por un minuto a 96  $^{\circ}$ C y, después de enfriarse las muestras, se añadió a cada tubo un volumen de 200  $\mu$ L de Tris-HCl (0,75 M). Por último, se volvieron a centrifugar las muestras y se transfirió el sobrenadante a una placa PCR, en la cual se realiza una dilución 1:15 con el fin de reducir las impurezas y asegurar el éxito de la PCR.

#### 3.2.2. Extracción de ADN Doyle

Se colocaron bolas de acero en los 96 tubos para extracción de ADN junto con material vegetal proveniente de hojas jóvenes de cada individuo. Se añadieron 340  $\mu$ L de CTAB (solución tampón, 2% CTAB (p/v), 1,4 M NaCl, 0,2% 2- $\beta$ -Mercaptoetanol, 20 mM EDTA pH 8, 100 mM TRIS-HCl pH 8), se trituraron las muestras con el *mixer mill* y se centrifugaron. Seguidamente se incubaron a 65  $^{\circ}$ C durante 30-45 minutos, y se añadieron 340  $\mu$ L de cloroformo y ácido isoamílico en proporción 24:1, mezclados por inversión. Se centrifugaron de nuevo las muestras durante 30 minutos a 3000 rpm, se transfirió el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu$ L de etanol 70% a una temperatura de -20

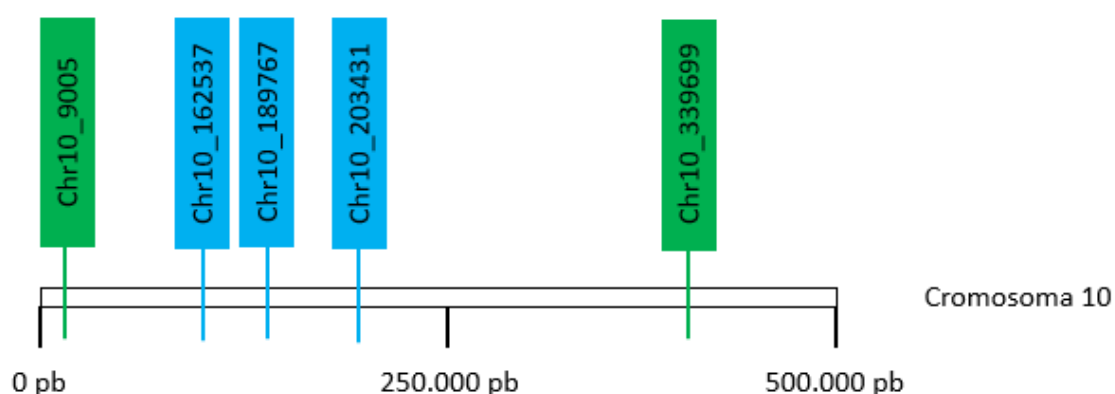
°C. Se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante, dejando secar las muestras. Por último, se adicionan 50 µL de agua ultrapura (Mili-Q) y se guardaron durante un mínimo de 2 horas, para poder luego ser conservadas en el congelador a -20 °C.

### 3.3 Diseño del genotipado

Con tal de poder realizar el genotipado, se tuvieron que diseñar tres cebadores: dos directos (*forward*, *Fw*) y uno complementario (*Reverse*, *Rv*) común para cada secuencia, ubicados alrededor de 50 pb del SNP que se deseaba identificar, mediante el programa 'Primer Picker' (Anexo A). Se utilizaron cebadores flanqueantes para hallar los individuos recombinantes y delimitar la nueva región del QTL; luego, se escogieron cebadores dentro de esta región para conocer el punto de recombinación de los individuos recombinantes (Tabla 1 y Figura 18), y posteriormente poder agruparlos según su genotipo.

**Tabla 1.** Nombres con las posiciones de los marcadores moleculares utilizados y nucleótido detectado. En verde los flanqueantes, en azul los marcadores internos.

Marcador molecular	Nucleótido
Chr10_9005	T/C
Chr10_162537	G/A
Chr10_189767	T/C
Chr10_203431	A/G
Chr10_339699	C/T



**Figura 18.** Representación de los marcadores y su posición. En verde, los marcadores flanqueantes; en azul, marcadores internos dentro de la región de interés.

### 3.4 Genotipado

Para el genotipado de las plantas se utilizó la tecnología PACE (“PCR Allelic Competitive Extention”). Se efectuó la mezcla de los tres cebadores y se añadieron junto al *MasterMix* de PACE (Tabla 2) en un microtubo. Tras la distribución en la placa, se introdujo en la misma el ADN extraído de cada planta en un rango de concentraciones de 20-100 ng/ $\mu$ L y se cubrió con un film adhesivo. Posteriormente, se colocó la placa óptica en el termociclador (LightCycler480 de Roche) con el correspondiente programa (Tabla 3), y se analizaron los resultados de la fluorescencia asociadas a cada genotipo.

**Tabla 2.** Volúmenes necesarios para la PCR PACE2.0

Placa de 96 pozos	Placa de 384 pozos
5 $\mu$ L de MasterMix PACE2.0	2,5 $\mu$ L de MasterMix PACE2.0
0,138 $\mu$ L de PACE2.0 <i>assay</i> (cebadores)	0,069 $\mu$ L de PACE2.0 <i>assay</i> (cebadores)
5 $\mu$ L de ADN	5 $\mu$ L de ADN
Total 10 $\mu$ L	Total 5 $\mu$ L

**Tabla 3.** Programa del LightCycler para la PCR PACE2.0. *Ramp rate*: velocidad de incremento de temperatura ( $^{\circ}$ C/s). Cuantificación: detección de la fluorescencia del ADN amplificado.

Nombre	Ciclos	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo	<i>Ramp rate</i>	Cuantificación
<i>Hot-start</i>	1	94	00:15:00	4,4	Ninguna
<i>Touch-down</i>	10	94	00:00:20	4,4	Ninguna
		65	00:01:00	2,2*	Ninguna
<i>PCR</i>	35	94	00:00:20	2,2	Ninguna
		57	00:01:00	2,2	Ninguna

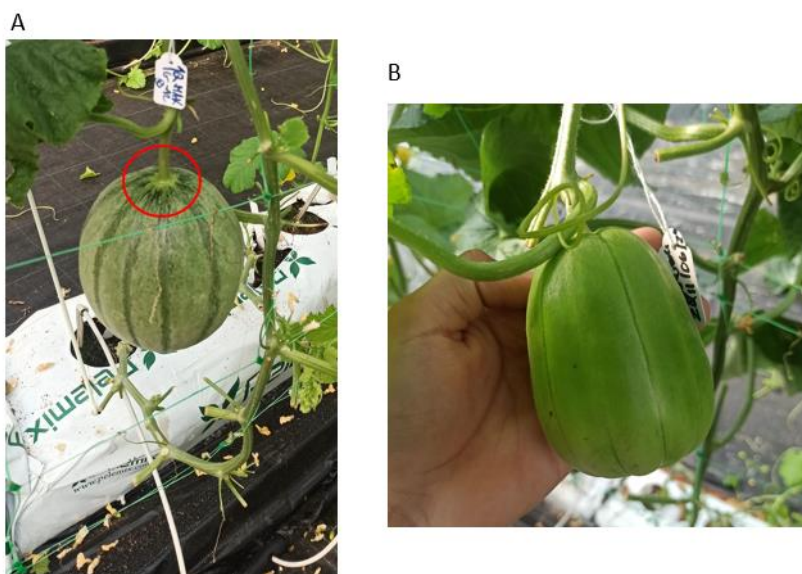
<i>Read plate</i>	1	37	00:01:00	2,2	Ninguna
		37	00:00:01	4,4	Una
<i>Acquisition</i>	1	57	00:00:01	2,2	Una

\*Ajustando Sec Target (°C) = 57 y Step Size (°C) = 0,8

### 3.5 Fenotipado

Se supervisó la maduración de los melones antes y después de su cosecha.

Por un lado, diariamente se revisaron los melones en las plantas para determinar la aparición de rasgos como la temprana aparición de aroma (EARO) mediante análisis sensorial, la aparición temprana de la capa de abscisión (EALF) con la observación del estado del pedúnculo del melón, el cambio de color (EC) y los días hasta su cosecha (Figura 19).



**Figura 19.** Fenotipado de los rasgos: A) Aparición temprana de la capa de abscisión (EALF), marcada con un círculo rojo; B) Cambio temprano de color (EC)

Por otro lado, después de la cosecha se fotografió (Anexo C) y pesó cada uno de los melones; se escaneó la mitad de cada melón con *'Tomato Analyzer' software*<sup>34</sup>. Posteriormente se

determinaron las características firmeza de la pulpa (FF) y el contenido de sólidos solubles (SSC). La FF se determinó ejerciendo presión ( $\text{kg/cm}^2$ ) con un penetrómetro, repitiéndose el proceso 4 veces en distintos puntos del fruto. Para el parámetro SSC se cubrieron con una tela porciones pequeñas de la carne del melón y se frotó contra el refractómetro, el cual mide en °Brix los sólidos disueltos.

### **3.6 Análisis de datos**

Para el análisis de los datos obtenidos durante el fenotipado se realizaron contrastes de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk), test de análisis y homogeneidad de varianzas (ANOVA y prueba de Levene) y comparaciones múltiples (pruebas de Tukey). Para las variables que no seguían una homogeneidad de varianzas y normalidad de residuos se utilizaron métodos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis y de Games-Howell). El procesado de los datos se realizó mediante los programas Excel, IBM SPSS Statistics y R Studio.

## 4 Resultados y discusión

### 4.1. Obtención de plantas recombinantes en el intervalo del QTL *MAK.10-1* y caracterización genotípica de las plantas recombinantes mediante marcadores moleculares.

Con el objetivo general de identificar el o los genes implicados en la regulación de la maduración climatérica del melón, se realizó el genotipado de los aproximadamente 5000 individuos de la F2 obtenida del cruce MAKR40 x Ved (MxV). Se genotiparon (Figura 20) mediante marcadores flanqueantes (apartado 3.3 y 3.4) encontrándose 48 recombinantes a los cuales se les nombró 'R' seguido de un número, los cuales se trasladaron a campo (Tabla 4). Posteriormente, los recombinantes obtenidos se agruparon mediante su genotipo y se les asignaron letras de la A hasta la I (Tabla 5).

Se utilizaron 9 réplicas de cada línea utilizada como control: *1QMAK10* contenía la introgresión de 1,05 Mpb de Makuwa; MAKR40 contenía la introgresión reducida de alrededor de 500 Kb; la F1 MxV se encontraba en heterocigosis para la región de 500 Kb; Makuwa y Ved eran líneas puras.



**Figura 20.** Interfaz de los resultados obtenidos en el *LightCycler*. Cada triángulo representa un individuo y cada color un genotipo: azul, alelo X; rojo, heterocigoto; verde, alelo Y; rosa, desconocido; gris, negativo.

**Tabla 4.** Genotipo de los individuos recombinantes para cada marcador. A, genotipo 'Védrantais'; B, genotipo 'Ginsen makuwa'; H, genotipo heterocigoto; Negative, resultado no concluyente.

Muestras	Marcadores				
	9005	162537	189767	203431	339699
Ved	A	A	A	A	A
R8	A	A	A	A	H
R16	A	A	A	A	H
R17	A	A	A	A	H
R23	A	A	A	A	H
R37	A	A	Negative	A	H
R40	A	A	A	A	H
R43	A	A	A	A	H
R49	A	A	A	A	H
R50	A	A	A	H	H
R1	H	H	H	H	A
R4	H	H	H	H	A
R10	H	Negative	H	H	A
R11	H	H	H	H	A
R12	H	H	H	H	A
R24	H	H	H	H	A
R26	H	H	H	H	A
R44	H	H	H	H	A
R45	H	H	H	H	A
R15	H	H	H	H	A
R18	H	H	H	H	A
R21	H	H	H	A	A
R46	H	H	H	A	A
R6	H	H	H	A	A

Muestras	Marcadores				
	9005	162537	189767	203431	339699
F1	H	H	H	H	H
R9	H	H	H	H	B
R14	H	H	H	H	B
R32	H	H	H	H	B
R19	H	H	H	H	B
R25	H	H	H	H	B
R33	H	H	H	H	B
R27	H	H	H	B	B
R54	H	H	B	B	B
R2	B	B	B	B	H
R3	B	B	B	B	H
R5	B	B	B	B	H
R7	B	B	B	B	H
R13	B	B	B	B	H
R30	B	B	B	B	H
R38	B	B	B	B	H
R39	B	B	B	B	H
R47	B	B	B	B	H
R53	B	B	B	B	H
R57	B	B	B	B	H
R35	B	B	B	B	H
R41	B	B	B	B	H
R34	B	B	B	B	H
R36	B	B	B	H	H
R42	B	B	B	H	H
R29	B	B	B	H	H

**Tabla 5.** Genotipo de cada grupo de recombinantes para cada marcador. A, genotipo 'Védrantais'; B, genotipo 'Ginsen makuwa'; H, genotipo heterocigoto.

Grupos de recombinantes	Marcadores					Recombinantes	Recuento
	9005	162537	189767	203431	339699		
A	H	H	H	H	A	R4, R11, R15, R18, R24, R26, R1, R10, R12, R44, R45	11
B	A	A	A	A	H	R8, R16, R17, R23, R37, R40, R43, R49	8
C	H	H	H	A	A	R6, R21, R46	3
D	H	H	H	H	B	R9, R14, R19, R32, R33, R25	6
E	B	B	B	B	H	R2, R3, R5, R7, R13, R30, R34, R35, R38, R39, R41, R47, R53, R57	14
F	B	B	B	H	H	R29, R36, R42	3
G	H	H	H	B	B	R27	1
H	H	H	B	B	B	R54	1
I	A	A	A	H	H	R50	1

Tras la selección de los recombinantes, se realizó una prueba Chi cuadrado para conocer si la distribución de los alelos en la población seguía una segregación mendeliana 1:2:1 (Tabla 6). Con la prueba se comprobó que la segregación de alelos para cada marcador flanqueante era no significativa (valor p superior a 0,05), por lo que se ajustaba a las leyes de Mendel.

**Tabla 6.** Prueba de Chi-cuadrado para la segregación mendeliana de los alelos en la población F2 para cada marcador. A, genotipo ‘Védrantais’; B, genotipo ‘Ginsen makuwa’; H, heterocigoto.

	9005	339699	Esperados para el marcador 9005 (1:2:1)	Esperados para el marcador 339699 (1:2:1)	Total individuos analizados para el marcador 9005	Total individuos analizados para el marcador 339699
A	1291	1294	1271,75	1281,25	5087	5125
B	1250	1264	1271,75	1281,25		
H	2546	2567	2543,5	2562,5		
Chi-cuadrado	0,6658	0,3670				
Valor p	0,7168	0,8323				

Con los datos obtenidos se pudo recalcular la tasa de recombinación como se muestra en la ecuación (1) para la región en el cromosoma 10 de nuestra población F2:

$$Tasa\ de\ recombinación = \frac{\text{número de plantas recombinantes}}{\text{número de plantas analizadas}} * 100 = \frac{48}{5087} * 100 = 0,94\ cM \quad (1)$$

Este valor difiere de la información inicial utilizada para determinar el número aproximado de recombinantes, de alrededor de 4 cM para las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védrantais’<sup>19</sup>. De este modo, para la introgresión del genoma de ‘Ginsen makuwa’ en el fondo genético ‘Védrantais’, la probabilidad de encontrar un individuo recombinante en la región del QTL *MAK.10-1* es cuatro veces menor.

#### 4.2. Caracterización fenotípica de los recombinantes obtenidos, sus parentales y obtención de la semilla F3.

Una vez genotipados los individuos recombinantes se procedió a fenotipar distintos caracteres cuando las plantas habían producido frutos. Las medias de los datos obtenidos durante el crecimiento en planta reflejaron las distintas aptitudes climatéricas de los rasgos EALF, EC, EARO hasta la cosecha y FW, SSC y FF después de la cosecha (Tabla 7), en los que Ved mostró síntomas altamente climatéricos como baja EALF y EARO similares a los presentados en estudios anteriores<sup>35</sup>, al contrario que Makuwa, que mostró síntomas levemente climatéricos. Asimismo, todos los datos del análisis estadístico se encuentran en el Anexo B, y las fotos de los melones en el anexo D.

**Tabla 7.** Valores de la media, desviación y error estándar de las líneas para las características fenotípicas formación temprana de la capa de abscisión (EALF), cambio de color temprano (EC), producción temprana de aroma (EARO), cosecha, peso del fruto (FW), contenido de sólidos solubles (SSC) y firmeza de la pulpa (FF).

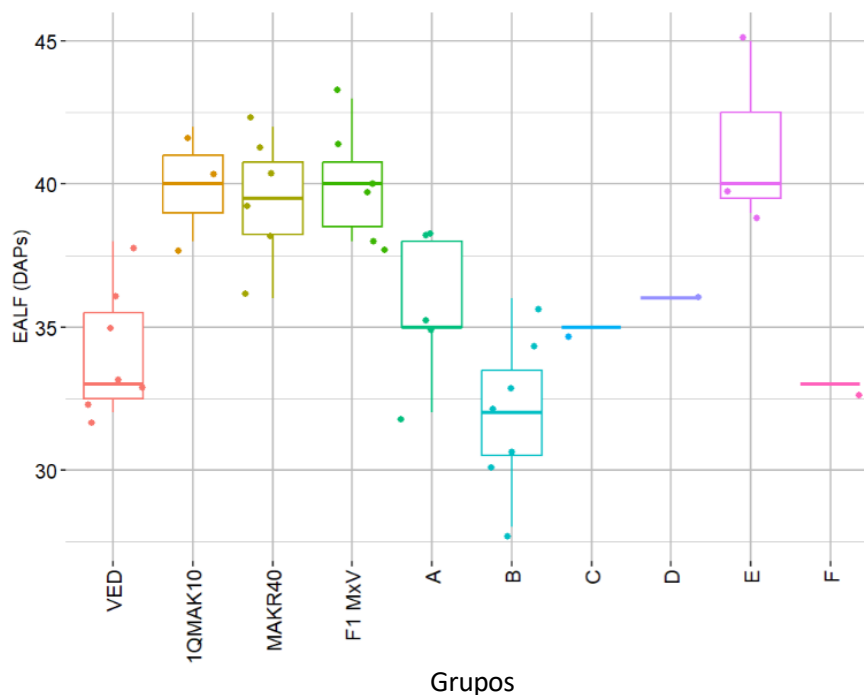
Línea	FW (g)			SSC (°Brix)			FF (kg/cm <sup>2</sup> )			Recuento
	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	
Ved	1258,57	248,90	94,07	6,57	0,61	0,23	2,05	1,27	0,48	3
Makuwa	363,67	138,66	56,61	9,37	1,65	0,67	1,85	1,24	0,51	6
MAKR40	1535,33	131,66	53,75	6,92	0,66	0,27	5,79	1,09	0,44	6
1QMAK10	1530,67	241,42	139,38	9,33	1,53	0,88	6,03	1,70	0,98	6
F1 MxV	1656,67	362,47	147,98	7,80	1,30	0,53	4,99	1,08	0,44	7

Grupos de recombinantes	FW (g)			SSC (°Brix)			FF (kg/cm <sup>2</sup> )			Recuento
	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	
A	1293,33	155,24	63,38	7,93	7,93	3,24	5,83	1,37	0,56	6
B	1156,29	409,12	154,63	7,47	7,47	2,82	3,32	1,52	0,57	7
C	1548,00	449,72	318,00	6,50	6,50	4,60	2,35	0,51	0,36	2
D	1177,33	68,13	39,33	8,73	8,73	5,04	7,43	1,01	0,58	3
E	1419,25	355,55	125,70	8,50	8,50	3,01	7,15	0,81	0,29	8
F	1118,00	141,42	100,00	8,75	8,75	6,19	8,19	0,53	0,38	2

Línea	EALF (DAPs)			EC (DAPs)			EARO (DAPs)			DAPs-H Media
	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	
Ved	33,00	1,26	0,48	33,57	1,40	0,53	33,00	1,13	0,43	38,57
Makuwa	43,25	6,18	2,52	28,83	4,07	1,66	35,00	4,69	1,91	43,00
MAKR40	39,33	2,16	0,88	40,00	1,83	0,75	42,00	4,80	1,96	43,33
1QMAK10	40,00	2,00	1,15	40,00	2,83	1,63	38,00	4,24	2,45	43,00
F1 MxV	40,00	1,90	0,77	39,60	1,67	0,68	38,40	3,65	1,49	42,17

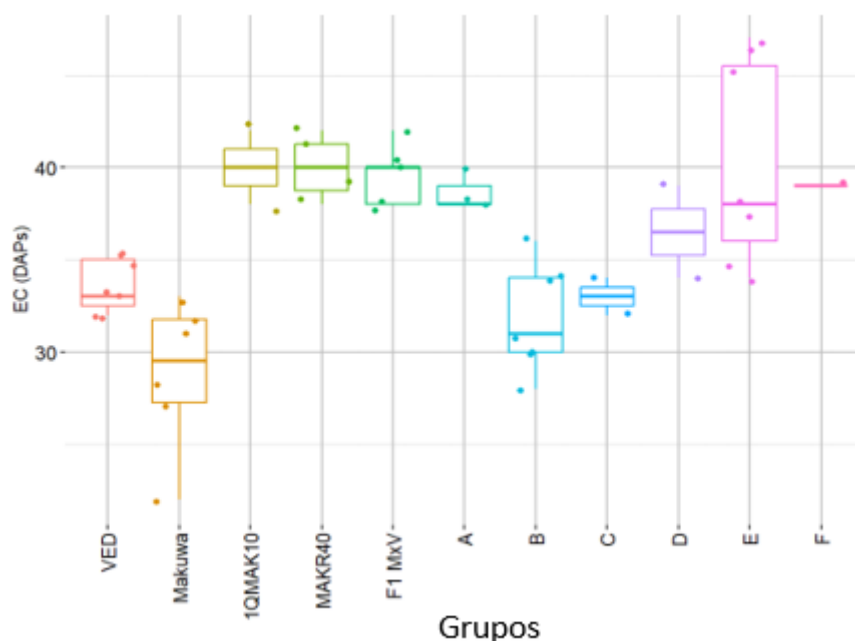
Grupos de recombinantes	EALF (DAPs)			EC (DAPs)			EARO (DAPs)			DAPs-H Media
	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	Media	D. estándar	E. estándar	
A	35,60	2,51	1,02	38,67	38,67	15,79	38,40	3,05	1,24	39,50
B	32,00	2,65	1,00	31,86	31,86	12,04	31,86	2,41	0,91	34,57
C	35,00	-	-	33,00	33,00	23,33	36,50	2,12	1,50	39,00
D	36,00	-	-	36,50	36,50	21,07	35,00	-	-	36,33
E	41,33	-	-	40,29	40,29	14,24	41,20	4,87	1,72	42,50
F	33,00	-	-	39,00	39,00	27,58	34,50	0,71	0,50	41,50

‘Védrañtais’ presentó síntomas de maduración climatérica con la formación de la capa de abscisión (EALF) de forma muy temprana, a diferencia de Makuwa, *MAKR40*, *F1 MxV* y *1QMAK10* (Tabla 7 y figura 21). Con la ANOVA y la prueba de Tukey (Tablas Anexo B-2 y B-3) pudieron catalogarse por un lado Ved y el grupo B, y los grupos E, Makuwa, *MAKR40*, *F1 MxV* y *1QMAK10* por otro lado. Los datos obtenidos respecto al rasgo EALF difieren respecto a estudios anteriores donde la línea *1QMAK10* no presentó formación de la capa de abscisión<sup>36</sup>. En este caso sí formaron capa de abscisión, aunque más tarde que el parental Ved, lo que indicó que este rasgo se vio influenciado fuertemente por el ambiente, lo que ha provocado una diferencia en la expresión del gen responsable de la formación de la capa de abscisión.



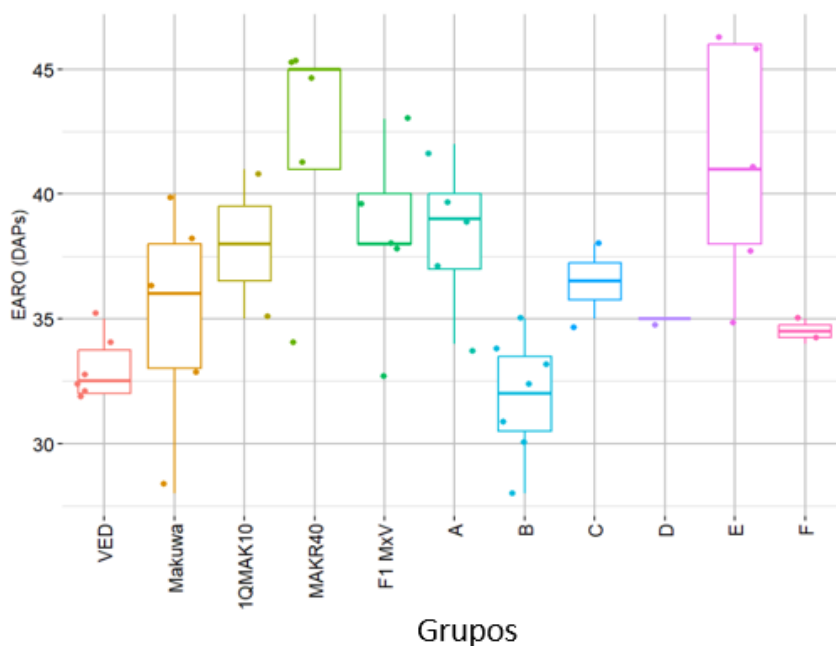
**Figura 21.** Diagrama de cajas para el rasgo formación temprana de la capa de abscisión (EALF) medida en DAPs.

Por otra parte, el rasgo cambio temprano de color (EC) mostró disparidad en *MAKR40*, *F1 MxV* y *1QMAK10*, las cuales presentaron un cambio de color tardío con relación a los parentales (Tabla 7 y figura 22), cambiando de color alrededor de los 30 DAPs; esto demuestra que la introgresión retrasa el rasgo cambio de color, generalmente indicativo de la madurez de los frutos. Para esta característica no pudieron agruparse individuos de forma clara ya que se encontraron numerosas diferencias significativas entre las líneas, aunque el grupo E y las líneas de introgresión *MAKR40*, *F1 MxV* y *1QMAK10* compartieron medias similares (Tablas anexo B-5 y B-6), al igual que Ved y el grupo B y el C. Este rasgo fue de difícil interpretación durante su medición ya que los cambios de color también fueron parcialmente causados por una mayor o menor exposición a la luz solar, de forma que este rasgo se vio influenciado por el ambiente; esto resultó en que no fue una buena característica para acotar el QTL.



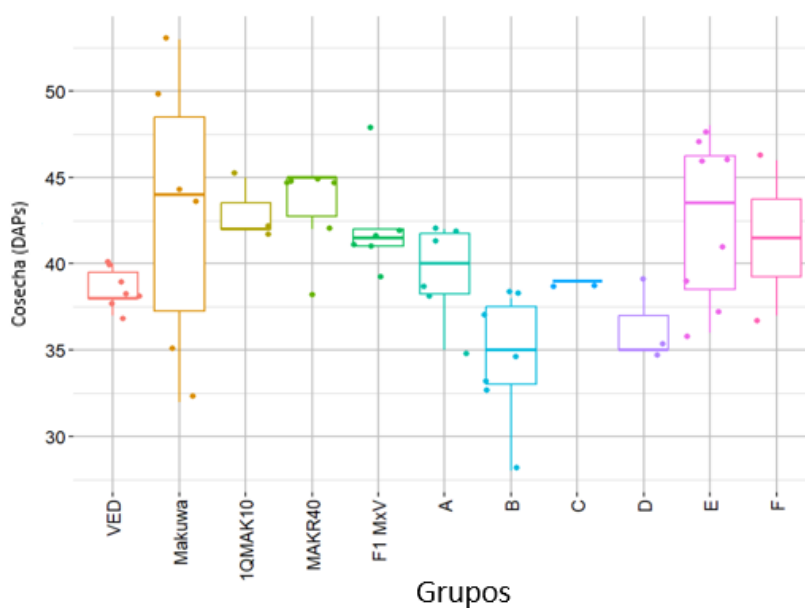
**Figura 22.** Diagrama de cajas para el rasgo cambio temprano de color (EC) medido en DAPs.

La aparición temprana de aroma (EARO) también se vio alterada para *MAKR40*, *F1 MxV* y *1QMAK10*, las cuales produjeron aroma más tarde que los parentales (Tabla 7 y figura 23). No se encontraron diferencias significativas entre Makuwa y las demás líneas (Tablas anexo B-5 y B-6), del mismo modo que tampoco se hallaron diferencias entre las líneas *F1 MxV*, *MAKR40* y los grupos A y E, ni entre 'Védrantais' y el grupo B. Este rasgo fue de difícil cuantificación debido a su naturaleza subjetiva y la falta de metodologías más precisas para la obtención de datos más fiables, además de estar influenciado fuertemente por el ambiente<sup>37</sup>; por estos motivos, tampoco brindó información fidedigna para el acotado del QTL. Estudios futuros podrían hacer uso de técnicas más fiables como la cromatografía de gases para la obtención de datos más robustos de la producción de aroma.



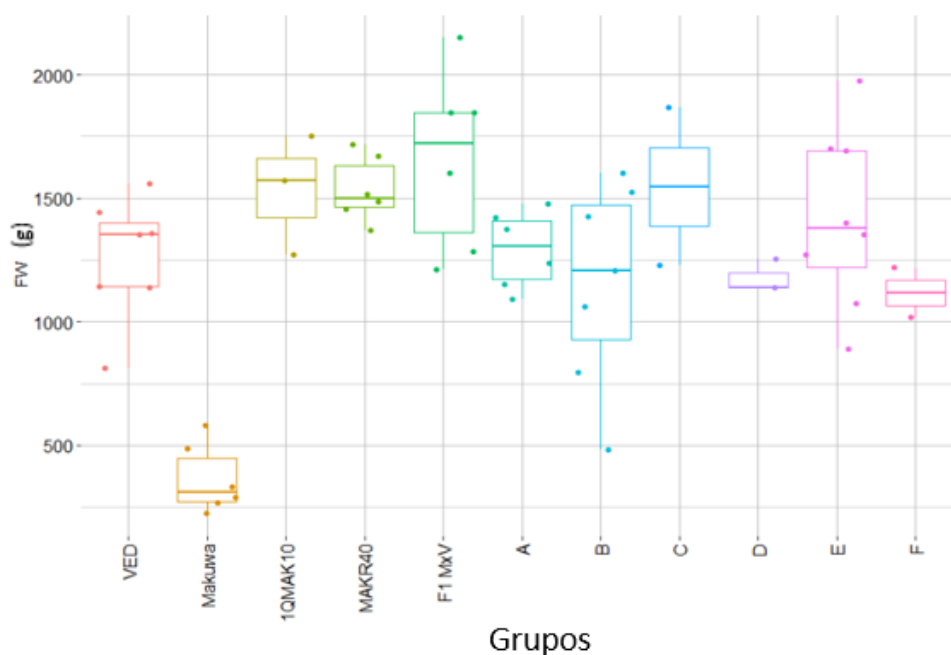
**Figura 23.** Diagrama de cajas para el rasgo aparición temprana del aroma (EARO) medida en DAPs.

Los individuos 'Védrañtais' fueron cosechados antes en comparación con las demás líneas al mostrar síntomas de maduración (Tabla 7 y figura 24). Para el grupo A no se hallaron diferencias significativas frente el resto. El grupo E no presentó diferencias significativas respecto al grupo A, *F1 MxV*, *Makuwa*, *MAKR40* y *Ved*. Para el grupo B no hallaron diferencias significativas frente a *Ved* (Tablas anexo B-5 y B-6).



**Figura 24.** Diagrama de cajas para el rasgo cosecha (DAPs).

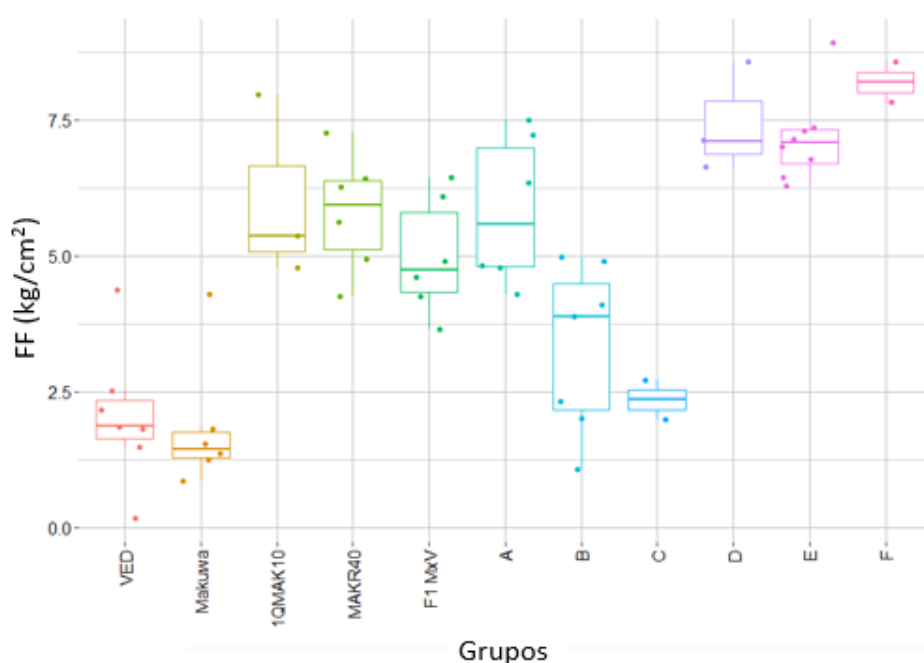
En el caso del peso del fruto (Tabla 7 y figura 25) todas las líneas compartieron pesos similares a excepción del parental Makuwa, que presentó un peso y tamaño menor que Ved. Esto indicó que los diferentes grupos parentales con un fondo genético 'Védrantais' presentaron un FW cercano a Ved, por lo que este rasgo no se vio afectado por la introgresión de Makuwa. Esto se confirmó con la prueba ANOVA de Welch (Tabla anexo B-4), lo que concuerda con la información proporcionada por estudios anteriores<sup>36</sup>.



**Figura 25.** Diagrama de cajas para el rasgo peso del fruto (FW) medido en g.

Para la firmeza de la pulpa (FF) (Tabla 7 y figura 26) se observó disparidad entre las medias, en las cuales las líneas de Makuwa y Ved compartieron similitud. Este hecho fue desconcertante, ya que las líneas de introgresión mostraron una FF superior a la de los parentales, lo que podría significar que la línea Makuwa no fue cosechada adecuadamente, o que exista un efecto pleiotrópico de los alelos de Makuwa en el fondo genético de 'Védrantais'. Esta variedad exótica tan solo se había plantado una vez en el CRAG y, junto a los hechos de que sus síntomas de maduración son escasos y la ausencia de valores de referencia, fue difícil determinar una fecha óptima para su cosecha.

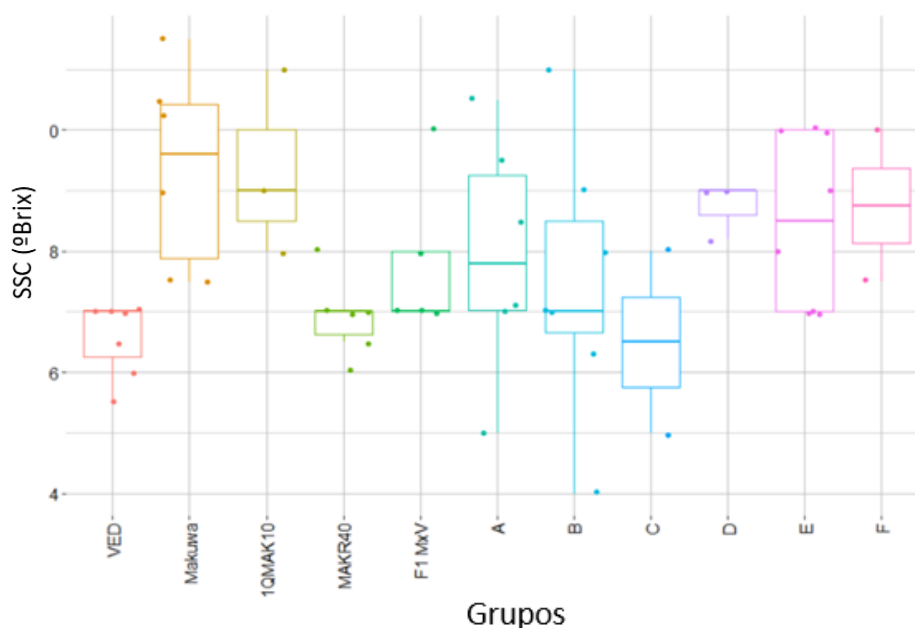
Los recombinantes para esta característica presentaron tres claros subgrupos (Tabla 7 y figura 17): los grupos D, E y F compartieron un FF similar, al igual que B y C; A presentó un fenotipo intermedio. Esto indicó que aquellos grupos con genotipo heterocigoto o Makuwa tendían a un mayor FF en su momento de cosecha, a diferencia de los grupos con genotipo 'Védrantais'. En comparación con estudios anteriores, para el rasgo FF se observaron diferencias respecto a la firmeza de Ved, para la que se midieron valores inferiores; para la línea *1QMAK10* los valores obtenidos coincidieron con la información previa, en la que las líneas de introgresión de Makuwa en fondo genético Ved mostraron unos valores de firmeza superiores a los del parental Ved<sup>36,38</sup>.



**Figura 26.** Diagrama de cajas para el rasgo firmeza de la pulpa (FF) medida en kg/cm<sup>2</sup>.

En cuanto al contenido de sólidos solubles (Tabla 7 y figura 27) la línea MAKR40 presentó una media cercana a la de 'Védrantais', mientras que las líneas *1QMAK10* y Makuwa compartieron valores de sólidos solubles superiores. *1QMAK10* contiene una introgresión mayor que MAKR40 y a F1, por lo que existe la posibilidad de la presencia de otros genes en la introgresión relacionados con el contenido de sólidos. La línea *F1 MxV* presentó un valor de sólidos solubles intermedio entre Ved y Makuwa. El grupo C presentó la cifra más baja de sólidos solubles mientras que los grupos A, D, E y F albergaron los mayores contenidos en azúcares; fueron estos tres últimos

grupos aquellos con el valor de SSC más cercano al parental Makuwa, y el grupo B mostró un fenotipo intermedio, aunque no se observaron grandes diferencias en el contenido de sólidos solubles (Tablas anexo B-5 y B-6). Los valores obtenidos para el SSC en Ved presentaron ligeras diferencias en comparación con los datos previos, pero este efecto se debe a una importante interacción con el ambiente. Por otro lado, los datos corroboran un mayor contenido de sólidos solubles en la línea con la introgresión *1QMAK10* <sup>36</sup>.



**Figura 27.** Diagrama de cajas para el rasgo contenido de sólidos solubles (SSC) medido en °Brix.

Con toda la información que se obtuvo en el fenotipado, se pudo concluir que, para cuando el QTL se halla en heterocigosis, el fenotipo dominante corresponde a Makuwa, con un retraso en la maduración. Se agruparon los datos junto al genotipo al que pertenecen para construir una tabla de asociación genotipo-fenotipo (Tabla 8) y poder visualizar con más claridad y facilidad como se desarrollan los rasgos relacionados con la maduración en función de cada genotipo. Gracias a los rasgos como firmeza de la pulpa y aparición de la capa de abscisión que fueron determinantes para poder realizar las agrupaciones, se clasificaron las líneas asociándolas al tipo de maduración característica del parental.

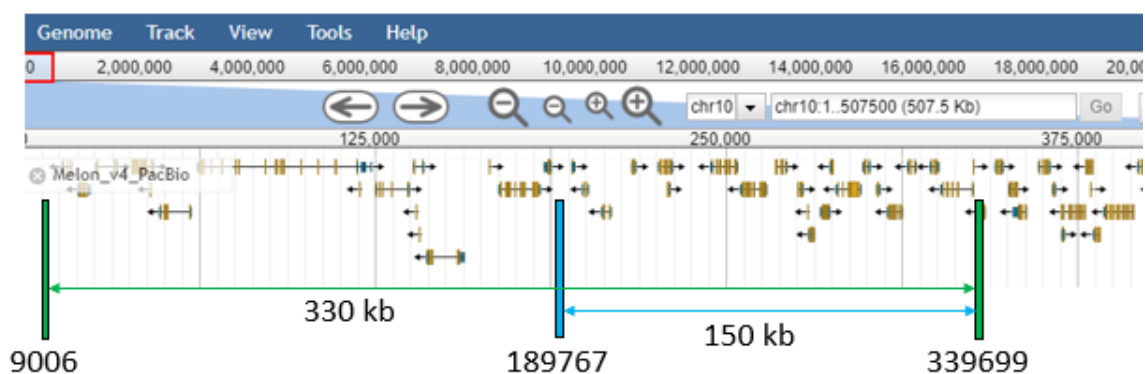
Grupos	Marcadores					FW (g)	SSC (%Brix)	FF (kg/cm <sup>2</sup> )	EALF (DAPs)	EC (DAPs)	EARO (DAPs)	H (DAPs)	Recuento	Maduración
	9005	162537	189767	203431	339699									
VED	A	A	A	A	A	1258,57	6,57	2,05	33,00	33,57	33,00	38,57	7	VED
Makuwa	B	B	B	B	B	363,67	9,37	1,85	43,25	28,83	35,00	43,00	6	MAK10
1QMAK10	B	B	B	B	B	1535,33	6,92	5,79	39,33	40,00	42,00	43,33	3	MAK10
MAKR40	B	B	B	B	B	1530,67	9,33	6,03	40,00	40,00	38,00	43,00	6	MAK10
F1 MxV	H	H	H	H	H	1656,67	7,80	4,99	40,00	39,60	38,40	42,17	6	MAK10
A	H	H	H	H	A	1293,33	7,93	5,83	35,60	38,67	38,40	39,50	6	MAK10
B	A	A	A	A	H	1156,29	7,47	3,32	32,00	31,86	31,86	34,57	7	VED
C	H	H	H	A	A	1548,00	6,50	2,35	35,00	33,00	36,50	39,00	2	VED
D	H	H	H	H	B	1177,33	8,73	7,43	36,00	36,50	35,00	36,33	3	MAK10
E	B	B	B	B	H	1419,25	8,50	7,15	41,33	40,29	41,20	42,50	8	MAK10
F	B	B	B	H	H	1118,00	8,75	8,19	33,00	39,00	34,50	41,50	2	MAK10

**Tabla 8.** Asociación fenotipo-genotipo para cada línea estudiada. A, genotipo 'Védrañtais'; B, genotipo Makuwa; H, genotipo heterocigoto. Rasgos fenotípicos: formación temprana de la capa de abscisión (EALF), cambio de color temprano (EC), producción temprana de aroma (EARO), cosecha, peso del fruto (FW), contenido de sólidos solubles (SSC) y firmeza de la pulpa (FF).

Mediante la asociación genotipo-fenotipo se observó que el grupo A mostró rasgos fenotípicos similares a MAK10, lo que sitúa el QTL antes del marcador 339699 por estar en heterocigosis. Los grupos B y C se comportaron como Ved fenotípicamente, lo que permitió delimitar la región después del marcador 189767. Los grupos D, E y F asociados al fenotipo MAK10 coincidieron con la probable posición del QTL entre las posiciones 189767 y 339699 del cromosoma 10.

#### 4.3. Estudio bioinformático de los genes dentro de la región de interés.

Para el estudio del QTL *MAK.10-1* se investigó acerca de los genes localizados en la región del genoma del QTL, delimitada por los cebadores flanqueantes. Mediante la base de datos de *Melonomics* (v4.0) se encontraron un total de 38 genes, entre las posiciones 9006 pb y 339699 pb (330 kb) del cromosoma 10 (Figura 28).



**Figura 28.** Representación de los genes en el cromosoma 10 entre las posiciones de los cebadores y su distancia entre ellos, extraído de la base de datos de *Melonomics* (v4.0). Verde, distancia entre marcadores flanqueantes; azul, distancia entre el marcador interno y el flanqueante.

Basados en los datos preliminares obtenidos gracias a las características FF y EALF aún por confirmar en la siguiente temporada, con el mapeo pudo delimitarse de nuevo la región del QTL.

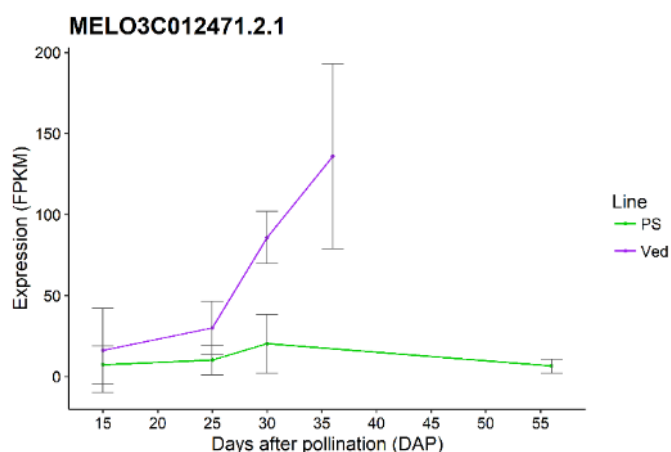
Este hecho permitió reducir de 330 kb a 150 kb la región con el QTL responsable del retraso de la maduración, hallándose un total de 20 genes (Figura 28). Se investigaron los genes encontrados en esta región, mediante su función (Tabla 9) y genes ortólogos en organismos vegetales emparentados y algunos otros organismos más estudiados (Anexo C).

**Tabla 9.** Listado de genes en la región acotada de 150 kb.

Nombre del gen	Posición inicial	Posición final	Función del gen
MELO3C012477.1	205641	208930	Aspartic proteinase nepenthesin-1
MELO3C012476.1	216378	217884	NADPH:quinone oxidoreductase-like
MELO3C012475.1	225819	231236	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 6-like
MELO3C000333.1	228976	229963	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, putative
MELO3C012474.1	244521	254202	Amidohydrolase family
MELO3C012472.1	255014	264515	beta-galactosidase
MELO3C012471.1	267554	271607	protein NRT1/ PTR FAMILY 5.4
MELO3C012470.1	275521	277486	two-component response regulator ORR9-like
MELO3C034022.1	278950	279297	Unknown protein
MELO3C012469.1	279328	281296	annexin D4-like
MELO3C012468.1	283544	286995	Annexin
MELO3C034025.1	286958	287902	Annexin
MELO3C012467.1	289073	298013	F-box protein isoform X1
MELO3C012466.1	298669	301533	Cytochrome C oxidase assembly factor
MELO3C012465.1	303478	305119	Glutaredoxin family protein
MELO3C012464.1	307339	313044	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD12-like
MELO3C012463.1	314579	317642	E3 ubiquitin-protein ligase
MELO3C012462.1	322662	325830	F-box protein SKIP5
MELO3C012461.1	326380	338131	Protein LNK2
MELO3C012460.1	338032	338187	Unknown protein

Del listado de genes mencionados (Tabla 9) se indagaron sobre aquellos posibles candidatos mediante la base de datos de 'Melonet DB'<sup>39</sup> y conocer así su grado de implicación durante la maduración. Además, se comparó la expresión de estos genes mediante los resultados de una secuenciación de RNA (*RNA-seq.*) entre la variedad 'Piel de Sapo' y 'Védrantais', para comprender mejor la relativa expresión de los genes en función del genotipo<sup>40</sup>.

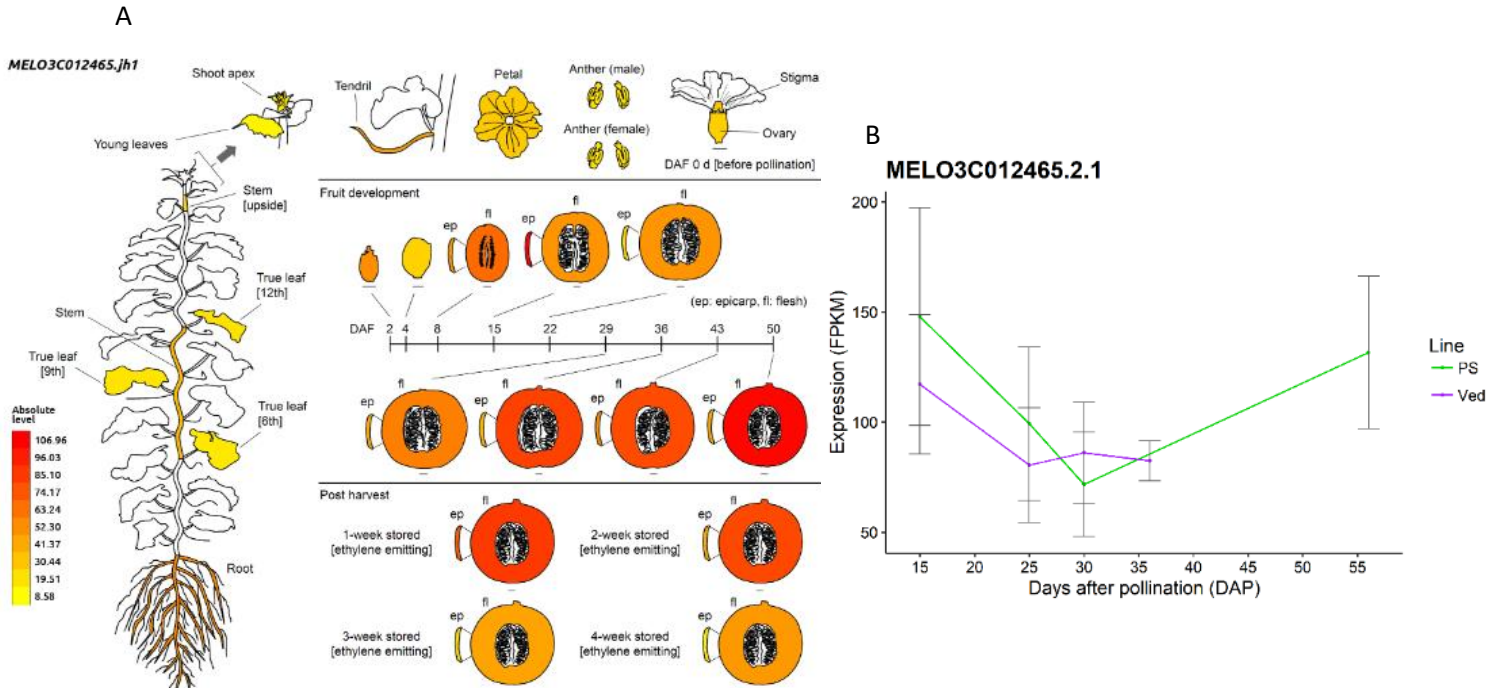
El gen *MELO3C012471* codifica la proteína del grupo NRT1/ PTR; estas proteínas se han estudiado en *Arabidopsis thaliana* y se tratan de transportadoras de nitrato y di/tripéptidos, que son capaces de transportar también hormonas como auxinas, giberelinas y ácido abscísico<sup>41</sup>. Este gen no dio resultados para la base de datos de Melonet, pero gracias al *RNA-seq.* (Figura 29) se puede observar la creciente expresión del gen durante la maduración del fruto en Ved que, junto a su potencial correlación con el transporte de hormonas, lo convierte en un gen prometedor.



**Figura 29.** Evolución de la expresión del gen *MELO3C012471* durante los días después de la polinización en las variedades 'Piel de Sapo' y 'Védrantais'. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq.* Fuente: <sup>40</sup>.

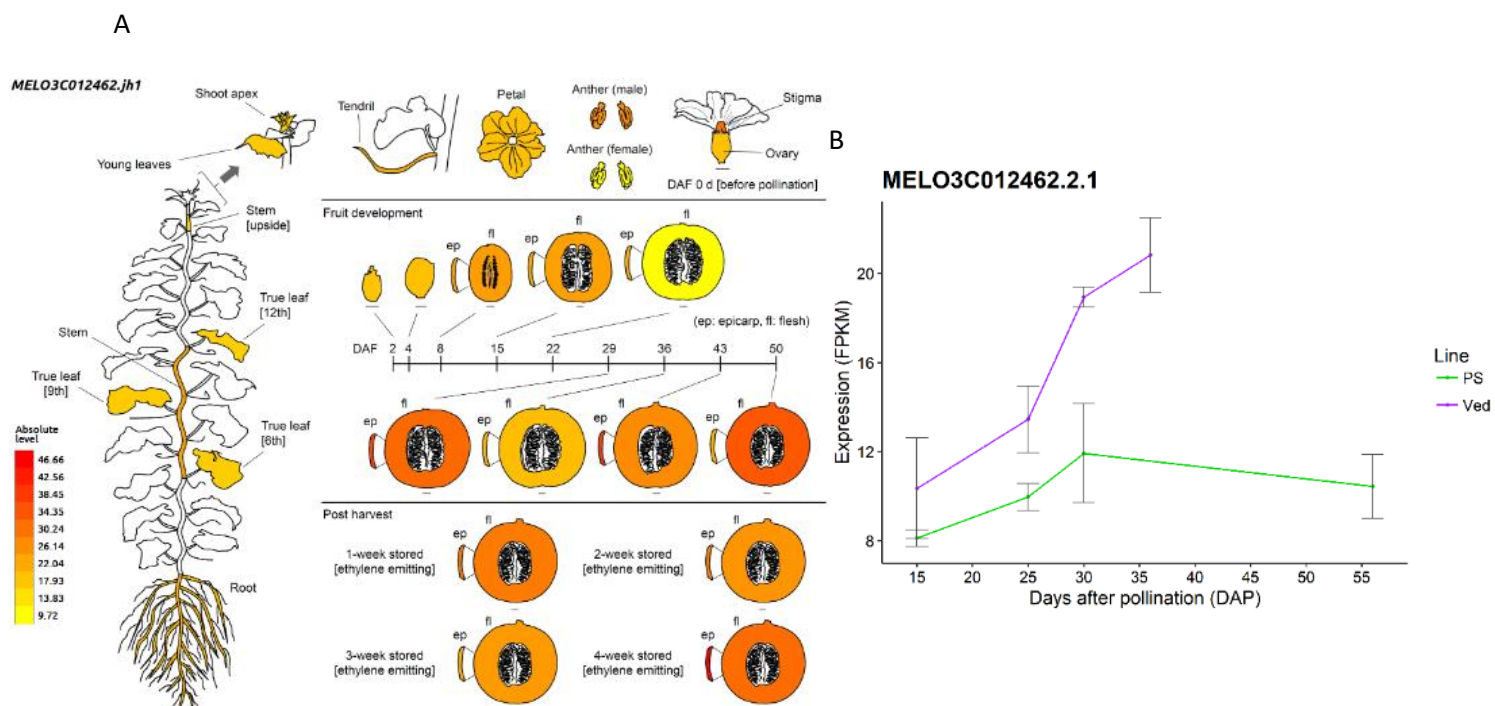
Otro gen candidato es *MELO3C012465*, que expresa una proteína de la familia de las glutarredoxinas. Estas son pequeñas proteínas con un par de cisteínas en su sitio activo, las cuales actúan como donadoras de electrones para el ribonucleótido reductasa y catalizan la regulación redox dependiente de glutatión. Esto resulta en la implicación de estas proteínas en respuestas inmunes y neurodegeneraciones<sup>42</sup>. En plantas, se encargan de defender a la planta frente al estrés oxidativo<sup>43</sup>. Este gen está elevadamente expresado durante el desarrollo del fruto

e implicado durante las primeras semanas tras la cosecha del melón (Figura 30-A); el gen tiene una expresión decreciente en Ved de 15 a 25 DAPs que se estabiliza hasta la cosecha, mientras que en PS aumenta durante la maduración (Figura 30-B).



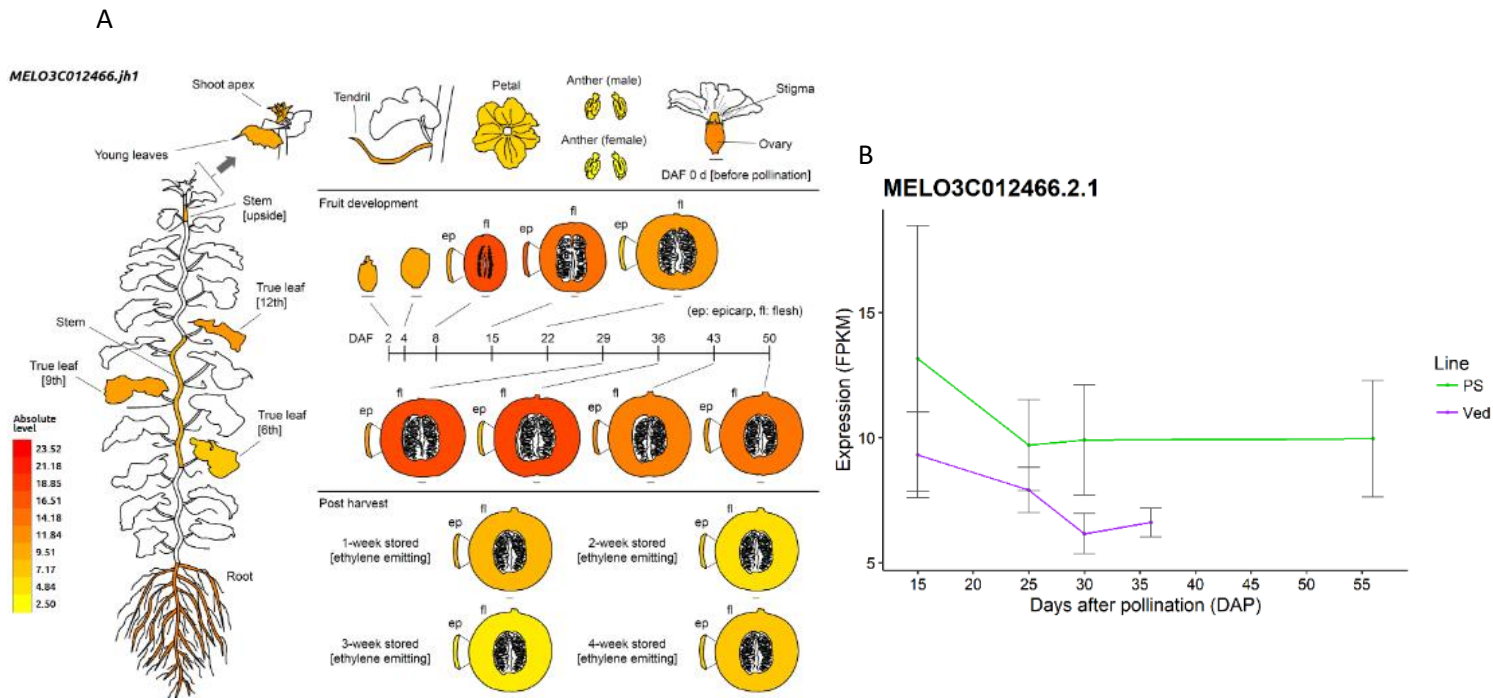
**Figura 30.** A) Expresión del gen *MELO3C012465* en diferentes tejidos de la planta del melón. Fuente: Melonet DB. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012465* durante los días después de la polinización en las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védrañtais’. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. Fuente: <sup>40</sup>.

El tercer gen candidato es el *MELO3C012462*, relacionado con las proteínas de caja F *SKIP5*. Este grupo de proteínas de la caja F son reconocidas por interactuar con las proteínas SKP, RBX1 y CULLIN1 para formar la enzima E3 ubiquitina sintetasa, encargada de catalizar la ubiquitinación (degradación) de proteínas<sup>44</sup>. Durante la maduración el gen se expresa menos que los anteriores candidatos, aunque sigue siendo relevante (Figura 31-A); la expresión del gen es creciente en Ved y en PS hasta alrededor de los 35 DAPs, momento en el que se estabiliza la expresión en PS (Figura 31-B).



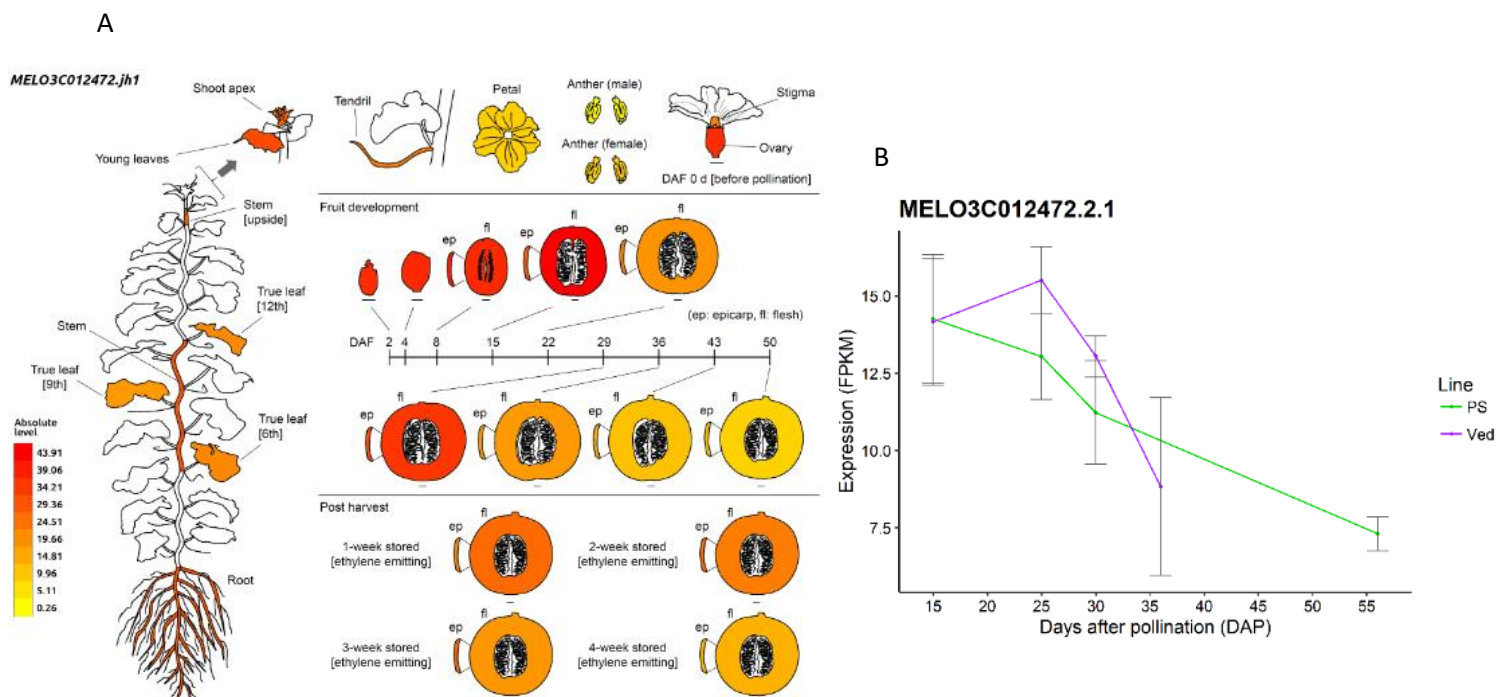
**Figura 31.** A) Expresión del gen *MELO3C012462* en diferentes tejidos de la planta del melón. Fuente: Melonet DB. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012462* durante los días después de la polinización en las variedades 'Piel de Sapo' y 'Védrantais'. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. Fuente: <sup>40</sup>.

El cuarto gen considerado es *MELO3C012466*, el cual corresponde al factor de ensamblaje del citocromo C oxidasa. Este complejo es el responsable de la fosforilación oxidativa (respiración celular) en las mitocondrias de los organismos eucariotas, y resulta en la producción de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) mediante un gradiente electroquímico, ya que el complejo se encarga de la reducción del oxígeno molecular a agua y la translocación de protones<sup>45</sup>. Durante el desarrollo del fruto su expresión es muy abundante, pero disminuye tras los 35 DAPs la cosecha del fruto (Figura 32-A). En Ved y PS la expresión del gen parece seguir un mismo patrón, con estabilidad en la expresión del gen después de ciertos DAPs (Figura 32-B).



**Figura 32.** A) Expresión del gen *MELO3C012466* en diferentes tejidos de la planta del melón. Fuente: Melonet DB. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012466* durante los días después de la polinización en las variedades 'Piel de Sapo' y 'Védraçais'. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. Fuente: <sup>40</sup>.

El último gen candidato es *MELO3C012472*, que expresa la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima pertenece a la familia de las glucosidasas, las cuales se encargan de catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos. La  $\beta$ -galactosidasa ha sido reconocida como una de las enzimas principales implicadas en el reblandecimiento de los tejidos durante la maduración de frutas como el caqui (*Diospyros kaki L.*) y el melón <sup>46,47</sup>. Durante el desarrollo del fruto el gen se expresa elevadamente, y va reduciendo su expresión a lo largo del tiempo (Figura 33).



**Figura 33.** A) Expresión del gen *MELO3C012472* en diferentes tejidos de la planta del melón. Fuente: Melonet DB. B) Evolución de la expresión del gen *MELO3C012472* durante los días después de la polinización en las variedades ‘Piel de Sapo’ y ‘Védraçais’. Datos obtenidos de análisis mediante *RNA-seq*. Fuente: <sup>40</sup>.

Todos los genes anteriormente mencionados son potenciales candidatos en la regulación de la maduración levemente climatérica, para la introgresión genética en el cromosoma 10 del melón Makuwa en el fondo genético ‘Védraçais’.

Cabe destacar que los datos de expresión génica en Ved y PS proporcionadas por el *RNA-seq*, ponen en evidencia la expresión diferencial de los genes en las variedades altamente climatéricas y no climatéricas como son Ved y PS. Este caso es extrapolable a la genética de Makuwa, por lo que la expresión de estos genes podría ser distinta a la de ‘Védraçais’, pudiendo ser esta diferencia la causa de las diferencias en la maduración de estas dos variedades. Para poder profundizar en este asunto, se podría realizar una secuenciación de la variedad Makuwa, junto a análisis bioinformáticos y controles de expresión en busca de posibles cambios nucleotídicos causantes de la expresión diferencial de estos genes, como se ha hecho ya entre otras variedades<sup>48</sup>.

## 5 Conclusiones

Con los resultados obtenidos para el proyecto de este mapeo fino, se ha podido acotar la región genómica responsable de la regulación de la maduración, para la introgresión de 'Ginsen makuwa' en el fondo genético de 'Védrantais'.

Los grupos de recombinantes analizados demostraron fenotipos de maduración diferenciales, como EALF y FF, gracias a los que se pudieron clasificar según el fenotipo, y acotar una nueva longitud del QTL *MAK.10-1* de aproximadamente 150 kb a partir de la posición chr10\_189767 pb hasta la chr10\_339699 pb.

Además, se seleccionaron varios genes presentes en estas 150 Kb, posibles candidatos que podrían ser responsables de la regulación climática de la introgresión, de los cuales *MELO3C012472* y *MELO3C012465* se postulan como los principales responsables de la regulación de la maduración climática.

### Perspectivas futuras

Los resultados obtenidos durante este proyecto ayudarán a comprender mejor el comportamiento de la introgresión, y asentarlos como base de futuras investigaciones para hallar el verdadero gen o genes responsables de la regulación climática. Durante el siguiente año se proseguirá con el mapeo fino para acotar aún más la región, además de un test de progeñe con la finalidad de contrastar los datos preliminares obtenidos durante este proyecto.

## 6 Referencias bibliográficas

1. Kerje, T. & Grum, M. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. *Acta Hort.* 37–44 (2000) doi:10.17660/ActaHortic.2000.510.5.
2. Kirkbride, J. H. *Biosystematic Monograph of the Genus Cucumis (Cucurbitaceae): Botanical Identification of Cucumbers and Melons*. (Parkway Publishers, Inc., 1993).
3. Castanera, R., Ruggieri, V., Pujol, M., Garcia-Mas, J. & Casacuberta, J. M. An Improved Melon Reference Genome With Single-Molecule Sequencing Uncovers a Recent Burst of Transposable Elements With Potential Impact on Genes. *Front. Plant Sci.* **10**, 1815 (2019).
4. Garcia-Mas, J. *et al.* The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 11872–11877 (2012).
5. Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H. & Renner, S. S. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14269–14273 (2010).
6. Endl, J. *et al.* Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. *Am. J. Bot.* **105**, 1662–1671 (2018).
7. Chomicki, G., Schaefer, H. & Renner, S. S. Origin and domestication of Cucurbitaceae crops: insights from phylogenies, genomics and archaeology. *New Phytol.* **226**, 1240–1255 (2020).
8. Jeffrey, C. A review of Cucurbitaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* **81**, 233–247 (2008).

9. Pitrat, M., Hanelt, P. & Hammer, K. Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. *Acta Hortic.* 29–36 (2000) doi:10.17660/ActaHortic.2000.510.4.
10. Esteras, C. *et al.* SNP genotyping in melons: genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theor. Appl. Genet.* **126**, 1285–1303 (2013).
11. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT (access: 12 of May, 2024) <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>.
12. Reche Mármol, J. *Cultivo Del Melón En Invernadero*. (Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, 2008).
13. Pujol, M. & Garcia-Mas, J. Regulation of climacteric fruit ripening in melon: recent advances and future challenges. *J. Exp. Bot.* **74**, 6224–6236 (2023).
14. Paul, V., Pandey, R. & Srivastava, G. C. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene—An overview. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 1–21 (2012).
15. Alexander, L. & Grierson, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* **53**, 2039–2055 (2002).
16. Li, B.-J., Grierson, D., Shi, Y. & Chen, K.-S. Roles of abscisic acid in regulating ripening and quality of strawberry, a model non-climacteric fruit. *Hortic. Res.* **9**, uhac089 (2022).
17. Pech, J. C., Bouzayen, M. & Latché, A. Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Sci.* **175**, 114–120 (2008).

18. Oren, E. *et al.* QTL mapping and genomic analyses of earliness and fruit ripening traits in a melon recombinant inbred lines population supported by de novo assembly of their parental genomes. *Hortic. Res.* **9**, uhab081 (2022).
19. Pereira, L. *et al.* QTL mapping of melon fruit quality traits using a high-density GBS-based genetic map. *BMC Plant Biol.* **18**, 324 (2018).
20. Ferreira Fernández, J. J., Ordás Pérez, A. & Pérez de la Vega, M. *La genética de los caracteres cuantitativos en la mejora vegetal del siglo XXI*. (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), 2012).
21. Zhao, H. *et al.* Genetic Mapping and QTL Analysis of Fruit Traits in Melon (*Cucumis melo* L.). *Curr. Issues Mol. Biol.* **45**, 3419–3433 (2023).
22. Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R. & Pandey, B. K. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics* **2**, 141–162 (2020).
23. Al-Samarai, F. R. & Al-Kazaz, A. A. Molecular Markers: an Introduction and Applications. *Eur. J. Mol. Biotechnol.* (2015) doi:10.13187/ejmb.2015.9.118.
24. Syvänen, A.-C. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nat. Genet.* **37**, S5–S10 (2005).
25. Sanroman Iglesias, M. & Grzelczak, M. Using gold nanoparticles to detect single-nucleotide polymorphisms: toward liquid biopsy. *Beilstein J. Nanotechnol.* **11**, 263–284 (2020).
26. Tytgat, O. Bringing Science to the Scene: Novel strategies for portable DNA profiling. Ghent University. Faculty of Pharmaceutical Sciences (2022) <http://hdl.handle.net/1854/LU-8764465>.

27. Harper, H. *et al.* Detecting SARS-CoV-2 variants with SNP genotyping. *PLOS ONE* **16**, e0243185 (2021).
28. Zou, Y., Carbonetto, P., Wang, G. & Stephens, M. Fine-mapping from summary data with the “Sum of Single Effects” model. *PLOS Genet.* **18**, e1010299 (2022).
29. Argyris, J. M. *et al.* QTL Analyses in Multiple Populations Employed for the Fine Mapping and Identification of Candidate Genes at a Locus Affecting Sugar Accumulation in Melon (*Cucumis melo* L.). *Front. Plant Sci.* **8**, (2017).
30. Keurentjes, J. J. B. *et al.* Development of a Near-Isogenic Line Population of *Arabidopsis thaliana* and Comparison of Mapping Power With a Recombinant Inbred Line Population. *Genetics* **175**, 891–905 (2007).
31. Fernie, A. & Klee, H. The Use of Natural Genetic Diversity in the Understanding of Metabolic Organization and Regulation. *Front. Plant Sci.* **2**, (2011).
32. Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A. J. & Picó, B. A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits. *BMC Plant Biol.* **16**, 154 (2016).
33. Perpiñá Martín, G., Cebolla Cornejo, J., Esteras Gómez, C., Monforte Gilabert, A. J. & Picó Sirvent, M. B. MAK-10 : A Long Shelf-life Charentais Breeding Line Developed by Introgression of a Genomic Region from Makuwa Melon. in *HortScience* vol. 52 1633–1638 (American Society for Horticultural Science, 2017).

34. Gonzalo, M. *et al.* Tomato Fruit Shape Analysis Using Morphometric and Morphology Attributes Implemented in Tomato Analyzer Software Program. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **134**, (2009).
35. Santo Domingo, M. *et al.* Fruit Morphology and Ripening-Related QTLs in a Newly Developed Introgression Line Collection of the Elite Varieties 'Védrantais' and 'Piel de Sapo'. *Plants* **11**, 3120 (2022).
36. Perpiñá, G., Cebolla-Cornejo, J., Esteras, C., Monforte, A. J. & Picó, B. 'MAK-10': A Long Shelf-life Charentais Breeding Line Developed by Introgression of a Genomic Region from Makuwa Melon. (2017) doi:10.21273/HORTSCI12068-17.
37. Perpiñá, G. *et al.* Analysis of aroma-related volatile compounds affected by 'Ginsen Makuwa' genomic regions introgressed in 'Vedrantais' melon background. *Sci. Hortic.* **276**, 109664 (2021).
38. Perpiñá, G., Castro, G., Esteras, C and Picó B. New Charentais Lines with Delayed Climacteric Ripening Derived from an Introgression Lines Collection. 2016 & 2017 CGC Reports – The Cucurbit Genetics Cooperative (CGC). <https://cucurbit.info/2017/07/2016-2017-cgc-reports/> (2017).
39. Yano, R., Nonaka, S. & Ezura, H. Melonet-DB, a Grand RNA-Seq Gene Expression Atlas in Melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Physiol.* **59**, e4 (2018).
40. Santo Domingo, M. *et al.* The ethylene-responsive transcription factor ERF024 is a novel regulator of climacteric fruit ripening in melon. *Plant J.* **119**, 1844–1858 (2024).

41. Chiba, Y. *et al.* Identification of Arabidopsis thaliana NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *J. Plant Res.* **128**, 679–686 (2015).
42. Ogata, F. T., Branco, V., Vale, F. F. & Coppo, L. Glutaredoxin: Discovery, redox defense and much more. *Redox Biol.* **43**, 101975 (2021).
43. Meyer, Y. *et al.* Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1783**, 589–600 (2008).
44. Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T. & Genschik, P. F-box proteins everywhere. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 631–638 (2006).
45. Watson, S. A. & McStay, G. P. Functions of Cytochrome c Oxidase Assembly Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7254 (2020).
46. NAKAMURA, A., MAEDA, H., MIZUNO, M., KOSHI, Y. & NAGAMATSU, Y.  $\beta$ -Galactosidase and Its Significance in Ripening of “Saijyo” Japanese Persimmon Fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 68–76 (2003).
47. Supapvanich, S. & Tucker, G. Cell Wall Hydrolysis in Netted Melon Fruit (*Cucumis melo* var. *reticulatus* L. Naud) during Storage. *Chiang Mai J. Sci.* **40**, 447–458 (2013).
48. Flores-León, A. *et al.* Spanish Melon Landraces: Revealing Useful Diversity by Genomic, Morphological, and Metabolomic Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 7162 (2022).

## 7 Anexos

### Anexo A – Cebadores y secuencias

**Tabla anexo A-1.** Cebadores y secuencias correspondientes a cada uno. La letra A corresponde a los directos; la letra B corresponde a los complementarios

Chr10_339699_A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAACAAGCAAAATGTTTAGAGTTTAGTGTTTTT
Chr10_339699_A2	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTCAAGCAAAATGTTTAGAGTTTAGTGTTTTT
Chr10_339699_C1	CCCTCGGTATTCCGAACGTTACATA
Chr10_9005_A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCCTTTTCCACTATCATTGTTTAG
Chr10_9005_A2	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTCAAGCAAAATGTTTAGAGTTTAGTGTTTTT
Chr10_9005_C1	CCCTCGGTATTCCGAACGTTACATA
Chr10_189767_A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAGTATAACCTTTCTTGTGTTGATAAAACATT
Chr10_189767_A2	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTGTATAACCTTTCTTGTGTTGATAAAACATC
Chr10_189767_C	AATCAAATATCTAACTTCCACACAGCCAAA
Chr10_16253_A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTTTTGACCTCTCAAGCAATTCAAAG
Chr10_16253_A2	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTTGTTTTTGACCTCTCAAGCAATTCAAAA
Chr10_162537_C1	GGAACATTAACAGAGTTACTCGATATGTTT
Chr10_203431_A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAATTTATCAAATTGTCCATAGTGCATTTTAGT
Chr10_203431.A2	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTTATCAAATTGTCCATAGTGCATTTTAGC
Chr10_203431_C1	CCTTCTACTACTAGAAAGAGATGTTTCAGTA

## Anexo B – Resultados de las pruebas estadísticas

Algunos de los melones cosechados durante el desarrollo del proyecto padecieron el efecto del *cracking*, donde los melones se agrietaron a causa de un riego excesivo o posibles deficiencias en nutrientes; estos fueron excluidos del análisis fenotípico ya que las mediciones se vieron alteradas por este efecto, por lo que se redujeron el número de réplicas para varios grupos de recombinantes, pasando de 48 individuos a 28 los recombinantes analizados.

Algunos de los grupos de individuos recombinantes como C, D, F, G, H e I (Tabla 3) no fueron incluidos en ningún análisis estadístico debido a que no hubo replicas suficientes para el mismo genotipo. Por ese mismo motivo, en algunos grupos de recombinantes algunos estadísticos se omitieron por ausencia del rasgo en cuestión y falta de valores (Tabla 7).

Con la información del test de Shapiro-Wilk (Tabla anexo B-1) se identificaron para los rasgos peso del fruto y aparición temprana de la capa de abscisión normalidad de residuos, las cuales presentaron un valor de significancia superior al 0,05. El peso del fruto fue un rasgo para el que no se cumplió la hipótesis de igualdad de varianzas, por lo que se utilizó la prueba ANOVA de Welch y Games-Howell para agruparlos (Tabla anexo B-4). El rasgo capa de abscisión sí cumplió la hipótesis de igualdad de varianzas, por lo que se pudo utilizar el test de Tukey. El resto de las características fenotípicas no siguieron una distribución normal (significancia menor a 0,05), por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis junto a la prueba de Games-Howell (Tabla anexo B-5) y así comparar los grupos entre ellos.

---

**Tabla anexo B-1.** Prueba de normalidad entre grupos para todos los rasgos analizados: formación temprana de la capa de abscisión (EALF), cambio de color temprano (EC), producción temprana de aroma (EARO) y cosecha medidas en DAPs, peso del fruto (FW) medido en g, contenido de sólidos solubles (SSC) medido en °Brix y firmeza de la pulpa (FF) medida en kg/cm<sup>2</sup>.

## Pruebas de normalidad

Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
FW (g)	A	,203	6	,200*	,935	6	,616
	B	,174	7	,200*	,938	7	,624
	E	,152	8	,200*	,977	8	,944
	F1 MxV	,228	5	,200*	,954	5	,769
	MAKR40	,225	6	,200*	,935	6	,616
	Makuwa	,257	6	,200*	,886	6	,296
	VED	,218	7	,200*	,935	7	,597
	SSC (°Brix)	A	,163	6	,200*	,974	6
B		,156	7	,200*	,979	7	,952
E		,231	8	,200*	,800	8	,028
F1 MxV		,330	5	,079	,735	5	,021
MAKR40		,283	6	,143	,921	6	,514
Makuwa		,204	6	,200*	,909	6	,429
VED		,331	7	,020	,773	7	,022
FF (kg/cm <sup>2</sup> )		A	,270	6	,197	,876	6
	B	,217	7	,200*	,908	7	,382
	E	,278	8	,070	,855	8	,108
	F1 MxV	,245	5	,200*	,899	5	,404
	MAKR40	,163	6	,200*	,983	6	,964
	Makuwa	,343	6	,026	,745	6	,018
	VED	,215	7	,200*	,929	7	,540

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

## Pruebas de normalidad

Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
EALF (DAPs)	A	,231	5	,200*	,881	5	,314
	B	,082	7	,200*	1,000	7	1,000
	E	,328	3	.	,871	3	,298
	F1 MxV	,187	6	,200*	,914	6	,466
	MAKR40	,121	6	,200*	,983	6	,964
	Makuwa	,298	4	.	,926	4	,572
	VED	,264	7	,149	,887	7	,262

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

## Pruebas de normalidad

Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
EC (DAPs)	A	,385	3	.	,750	3	,000
	B	,202	7	,200*	,936	7	,601
	E	,232	7	,200*	,860	7	,153
	F1 MxV	,231	5	,200*	,881	5	,314
	MAKR40	,208	4	.	,950	4	,714
	Makuwa	,203	6	,200*	,922	6	,523
	VED	,275	7	,117	,800	7	,041

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

## Pruebas de normalidad

Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
EARO (DAPs)	A	,178	5	,200*	,981	5	,940
	B	,111	7	,200*	,984	7	,976
	E	,238	5	,200*	,901	5	,415
	F1 MxV	,256	5	,200*	,955	5	,775
	MAKR40	,334	5	,071	,745	5	,026
	Makuwa	,184	5	,200*	,958	5	,795
	VED	,285	6	,138	,831	6	,110

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

## Pruebas de normalidad

Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Cosecha (DAPs)	A	,208	6	,200*	,897	6	,357
	B	,188	7	,200*	,889	7	,268
	E	,267	8	,099	,879	8	,184
	F1 MxV	,355	6	,017	,809	6	,071
	MAKR40	,386	6	,006	,691	6	,005
	Makuwa	,215	6	,200*	,934	6	,610
	VED	,264	7	,149	,887	7	,262

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Tabla anexo B-2.** Prueba ANOVA y de homogeneidad de varianzas entre grupos, para los rasgos formación temprana de la capa de abscisión (EALF) medida en DAPs y peso del fruto (FW) medido en

g.

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
EALF (DAPs)	Entre grupos	539,509	6	89,918	10,143	,000
	Dentro de grupos	274,807	31	8,865		
	Total	814,316	37			
FW	Entre grupos	6496223,850	6	1082703,975	13,109	,000
	Dentro de grupos	3221107,976	39	82592,512		
	Total	9717331,826	45			

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
EALF (DAPs)	Se basa en la media	1,255	6	31	,306
	Se basa en la mediana	,631	6	31	,705
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,631	6	12,035	,704
	Se basa en la media recortada	1,183	6	31	,341
FW	Se basa en la media	2,488	6	39	,039
	Se basa en la mediana	1,972	6	39	,093
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,972	6	27,691	,104
	Se basa en la media recortada	2,433	6	39	,043

**Tabla anexo B-3.** Prueba de Tukey para el rasgo formación temprana de la capa de abscisión (EALF) medido en DAPs.

**EALF (DAPs)**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
B	7	32,00			
VED	7	34,14	34,14		
A	5	35,60	35,60	35,60	
MAKR40	6		39,33	39,33	39,33
F1 MxV	6		40,00	40,00	40,00
E	3			41,33	41,33
Makuwa	4				43,25
Sig.		,489	,055	,064	,390

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,992.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Tabla anexo B-4.** Pruebas de ANOVA de Welch y comparaciones múltiples para el rasgo peso del fruto (FW) medido en g.

**Pruebas robustas de igualdad de medias**

FW (g)				
	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	37,196	6	17,123	,000

a. F distribuida de forma asintótica

## Comparaciones múltiples

Variable dependiente: FW (g)

Games-Howell

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
A	B	137,048	167,117	,976	-502,72	776,81
	E	-125,917	140,778	,965	-634,98	383,14
	F1 MxV	-363,333	160,979	,375	-1007,86	281,19
	MAKR40	-242,000	83,102	,145	-544,78	60,78
	Makuwa	929,667*	84,979	,000	620,95	1238,38
VED	34,762	113,431	1,000	-374,82	444,34	
B	A	-137,048	167,117	,976	-776,81	502,72
	E	-262,964	199,281	,831	-960,00	434,07
	F1 MxV	-500,381	214,030	,307	-1261,66	260,90
	MAKR40	-379,048	163,709	,345	-1017,31	259,21
	Makuwa	792,619*	164,669	,016	154,12	1431,12
VED	-102,286	181,000	,997	-759,41	554,83	
E	A	125,917	140,778	,965	-383,14	634,98
	B	262,964	199,281	,831	-434,07	960,00
	F1 MxV	-237,417	194,163	,871	-930,14	455,31
	MAKR40	-116,083	136,715	,972	-618,61	386,44
	Makuwa	1055,583*	137,864	,000	551,42	1559,74
VED	160,679	157,008	,939	-385,25	706,60	
F1 MxV	A	363,333	160,979	,375	-281,19	1007,86
	B	500,381	214,030	,307	-260,90	1261,66
	E	237,417	194,163	,871	-455,31	930,14
	MAKR40	121,333	157,438	,980	-524,12	766,79
	Makuwa	1293,000*	158,437	,001	648,05	1937,95
VED	398,095	175,349	,351	-257,80	1054,00	
MAKR40	A	242,000	83,102	,145	-60,78	544,78
	B	379,048	163,709	,345	-259,21	1017,31
	E	116,083	136,715	,972	-386,44	618,61
	F1 MxV	-121,333	157,438	,980	-766,79	524,12
	Makuwa	1171,667*	78,063	,000	888,66	1454,67
VED	276,762	108,347	,241	-121,45	674,98	
Makuwa	A	-929,667*	84,979	,000	-1238,38	-620,95
	B	-792,619*	164,669	,016	-1431,12	-154,12
	E	-1055,583*	137,864	,000	-1559,74	-551,42
	F1 MxV	-1293,000*	158,437	,001	-1937,95	-648,05
	MAKR40	-1171,667*	78,063	,000	-1454,67	-888,66
VED	-894,905*	109,793	,000	-1296,02	-493,79	
VED	A	-34,762	113,431	1,000	-444,34	374,82
	B	102,286	181,000	,997	-554,83	759,41
	E	-160,679	157,008	,939	-706,60	385,25
	F1 MxV	-398,095	175,349	,351	-1054,00	257,80
	MAKR40	-276,762	108,347	,241	-674,98	121,45
Makuwa	894,905*	109,793	,000	493,79	1296,02	

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**Tabla anexo B-5.** Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los rasgos contenido de sólidos solubles (SSC) medidos en °Brix, firmeza de la pulpa (FF) medida en kg/cm<sup>2</sup>, cambio temprano de color (EC), aparición temprana de aroma (EARO) y cosecha, medidas en DAPs.

## Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de SSC (°Brix) es la misma entre categorías de Grupo.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,015	Rechace la hipótesis nula.
2	La distribución de FF (kg/cm <sup>2</sup> ) es la misma entre categorías de Grupo.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.
3	La distribución de EC (DAPs) es la misma entre categorías de Grupo.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.
4	La distribución de EARO (DAPs) es la misma entre categorías de Grupo.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,001	Rechace la hipótesis nula.
5	La distribución de Cosecha (DAPs) es la misma entre categorías de Grupo.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,008	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,050.

**Tabla anexo B-6.** Comparaciones múltiples por parejas para los rasgos contenido de sólidos solubles (SSC) medidos en °Brix, firmeza de la pulpa (FF) medida en kg/cm<sup>2</sup>, cambio temprano de color (EC), aparición temprana de aroma (EARO) y cosecha, medidas en DAPs.

Comparaciones por parejas SSC (°Brix)						Comparaciones por parejas FF (kg/cm <sup>2</sup> )					
Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada <sup>a</sup>	Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada <sup>a</sup>
VED-MAKR40	3,595	7,135	,504	,614	1,000	Makuwa-VED	-2,512	7,467	-,336	,737	1,000
VED-B	9,500	6,855	1,386	,166	1,000	Makuwa-B	8,583	7,467	1,150	,250	1,000
VED-F1 MxV	11,929	7,509	1,589	,112	1,000	Makuwa-F1 MxV	17,167	7,749	2,215	,027	,561
VED-A	14,095	7,135	1,976	,048	1,000	Makuwa-MAKR40	23,000	7,749	2,968	,003	,063
VED-E	16,991	6,637	2,560	,010	,220	Makuwa-A	23,667	7,749	3,054	,002	,047
VED-Makuwa	24,345	7,135	3,412	,001	,014	Makuwa-E	32,021	7,248	4,418	,000	,000
MAKR40-B	5,905	7,135	,828	,408	1,000	VED-B	6,071	7,174	,846	,397	1,000
MAKR40-F1 MxV	8,333	7,765	1,073	,283	1,000	VED-F1 MxV	14,655	7,467	1,963	,050	1,000
MAKR40-A	10,500	7,404	1,418	,156	1,000	VED-MAKR40	20,488	7,467	2,744	,006	,127
MAKR40-E	13,396	6,926	1,934	,053	1,000	VED-A	21,155	7,467	2,833	,005	,097
MAKR40-Makuwa	-20,750	7,404	-2,803	,005	,106	VED-E	29,509	6,946	4,248	,000	,000
B-F1 MxV	-2,429	7,509	-,323	,746	1,000	B-F1 MxV	-8,583	7,467	-1,150	,250	1,000
B-A	4,595	7,135	,644	,520	1,000	B-MAKR40	-14,417	7,467	-1,931	,054	1,000
B-E	-7,491	6,637	-1,129	,259	1,000	B-A	15,083	7,467	2,020	,043	,911
B-Makuwa	-14,845	7,135	-2,081	,037	,787	B-E	-23,437	6,946	-3,374	,001	,016
F1 MxV-A	2,167	7,765	,279	,780	1,000	F1 MxV-MAKR40	-5,833	7,749	-,753	,452	1,000
F1 MxV-E	5,063	7,311	,692	,489	1,000	F1 MxV-A	6,500	7,749	,839	,402	1,000
F1 MxV-Makuwa	-12,417	7,765	-1,599	,110	1,000	F1 MxV-E	14,854	7,248	2,049	,040	,849
A-E	-2,896	6,926	-,418	,676	1,000	MAKR40-A	,667	7,749	,086	,931	1,000
A-Makuwa	-10,250	7,404	-1,384	,166	1,000	MAKR40-E	9,021	7,248	1,245	,213	1,000
E-Makuwa	-7,354	6,926	-1,062	,288	1,000	A-E	-8,354	7,248	-1,153	,249	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales. Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de ,05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales. Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de ,05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

## Comparaciones por parejas EC (DAPs)

Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada <sup>a</sup>
Makuwa-B	4,690	6,322	,742	,458	1,000
Makuwa-VED	-8,762	6,322	-1,386	,166	1,000
Makuwa-A	22,167	8,036	2,759	,006	,122
Makuwa-E	22,262	6,322	3,521	,000	,009
Makuwa-F1 MxV	24,333	6,881	3,536	,000	,009
Makuwa-MAKR40	25,333	7,336	3,454	,001	,012
B-VED	-4,071	6,074	-,670	,503	1,000
B-A	17,476	7,842	2,229	,026	,543
B-E	-17,571	6,074	-2,893	,004	,080
B-F1 MxV	-19,643	6,654	-2,952	,003	,066
B-MAKR40	-20,643	7,123	-2,898	,004	,079
VED-A	13,405	7,842	1,709	,087	1,000
VED-E	13,500	6,074	2,222	,026	,551
VED-F1 MxV	15,571	6,654	2,340	,019	,405
VED-MAKR40	16,571	7,123	2,327	,020	,420
A-E	-,095	7,842	-,012	,990	1,000
A-F1 MxV	-2,167	8,299	-,261	,794	1,000
A-MAKR40	-3,167	8,680	-,365	,715	1,000
E-F1 MxV	-2,071	6,654	-,311	,756	1,000
E-MAKR40	-3,071	7,123	-,431	,666	1,000
F1 MxV-MAKR40	-1,000	7,623	-,131	,896	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales. Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de ,05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

## Comparaciones por parejas EARO (DAPs)

Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada <sup>a</sup>
B-VED	-2,131	6,164	-,346	,730	1,000
B-Makuwa	-8,414	6,488	-1,297	,195	1,000
B-F1 MxV	-15,414	6,488	-2,376	,018	,368
B-A	16,014	6,488	2,468	,014	,285
B-E	-21,114	6,488	-3,255	,001	,024
B-MAKR40	-21,714	6,488	-3,347	,001	,017
VED-Makuwa	6,283	6,709	,937	,349	1,000
VED-F1 MxV	13,283	6,709	1,980	,048	1,000
VED-A	13,883	6,709	2,069	,039	,809
VED-E	18,983	6,709	2,830	,005	,098
VED-MAKR40	19,583	6,709	2,919	,004	,074
Makuwa-F1 MxV	7,000	7,007	,999	,318	1,000
Makuwa-A	7,600	7,007	1,085	,278	1,000
Makuwa-E	12,700	7,007	1,812	,070	1,000
Makuwa-MAKR40	13,300	7,007	1,898	,058	1,000
F1 MxV-A	,600	7,007	,086	,932	1,000
F1 MxV-E	5,700	7,007	,813	,416	1,000
F1 MxV-MAKR40	-6,300	7,007	-,899	,369	1,000
A-E	-5,100	7,007	-,728	,467	1,000
A-MAKR40	-5,700	7,007	-,813	,416	1,000
E-MAKR40	-,600	7,007	-,086	,932	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales. Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de ,05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

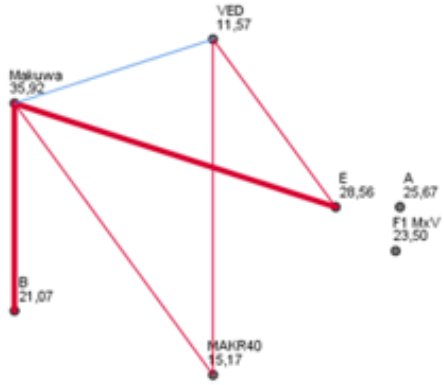
## Comparaciones por parejas Cosecha (DAPs)

Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada <sup>a</sup>
B-VED	-9,786	7,148	-1,369	,171	1,000
B-A	13,952	7,440	1,875	,061	1,000
B-Makuwa	-20,286	7,440	-2,727	,006	,134
B-E	-21,223	6,921	-3,066	,002	,046
B-F1 MxV	-22,119	7,440	-2,973	,003	,062
B-MAKR40	-24,952	7,440	-3,354	,001	,017
VED-A	4,167	7,440	,560	,575	1,000
VED-Makuwa	10,500	7,440	1,411	,158	1,000
VED-E	11,438	6,921	1,653	,098	1,000
VED-F1 MxV	12,333	7,440	1,658	,097	1,000
VED-MAKR40	15,167	7,440	2,038	,042	,872
A-Makuwa	-6,333	7,721	-,820	,412	1,000
A-E	-7,271	7,222	-1,007	,314	1,000
A-F1 MxV	-8,167	7,721	-1,058	,290	1,000
A-MAKR40	-11,000	7,721	-1,425	,154	1,000
Makuwa-E	,938	7,222	,130	,897	1,000
Makuwa-F1 MxV	1,833	7,721	,237	,812	1,000
Makuwa-MAKR40	4,667	7,721	,604	,546	1,000
E-F1 MxV	-,896	7,222	-,124	,901	1,000
E-MAKR40	-3,729	7,222	-,516	,606	1,000
F1 MxV-MAKR40	-2,833	7,721	-,367	,714	1,000

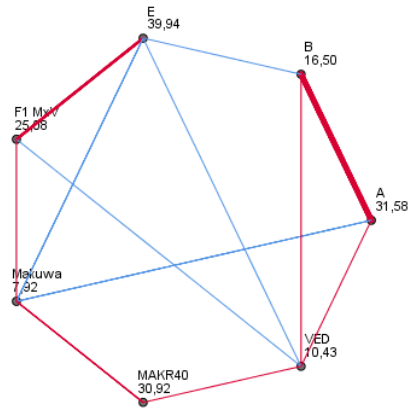
Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales. Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de ,05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

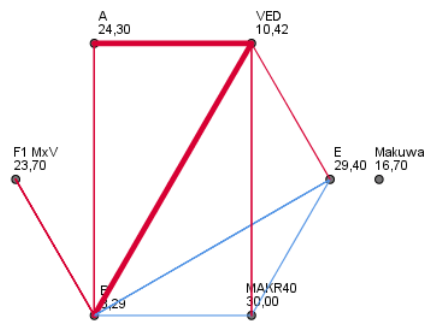
Comparaciones por parejas SSC (°Brix)



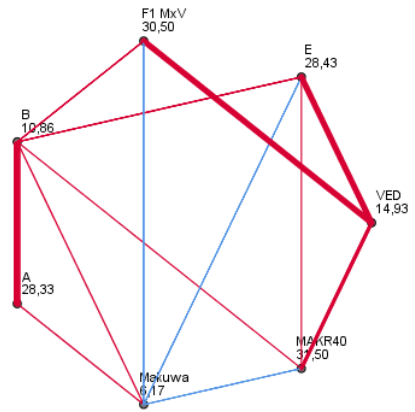
Comparaciones por parejas FF (kg/cm<sup>2</sup>)



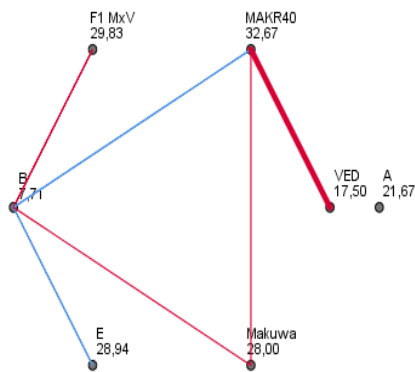
Comparaciones por parejas EC (DAPs)



Comparaciones por parejas EARO (DAPs)



Comparaciones por parejas Cosecha (DAPs)



**Figura anexo B-1.** Representaciones gráficas de la prueba de Games-Howell para los rasgos contenido de sólidos solubles (SSC) medidos en °Brix, firmeza de la pulpa (FF) medida en kg/cm<sup>2</sup>, cambio temprano de color (EC), aparición temprana de aroma (EARO) y cosecha, medidas en DAPs. El valor de cada nodo corresponde al rango promedio de cada grupo, y cada línea corresponde a la diferencia significativa entre dos grupos.

### Anexo C – Genes, ortólogos y función.

**Tabla anexo C-1.** Genes del melón, ortólogos en otros organismos y función.

Nombre del gen	Posición inicial	Posición final	A. thaliana	C. lanatus	C. sativus L.	Fragaria x ananassa	S. lycopersicum	Función del gen
MELO3C012 477.1	205641	208930	AT5G07030 AT1G09750 AT3G54400	CICG08G011750 CICG05G026860	CsaV3_5G036810 CsaV3_2G030370	FAN04G1203 FAN08G0695 FAN10G3439 FAN01G1946 FAN03G1193 FAN06G0498 FAN13G0648	Solyc04g076190.1So lyc12g087940.2	Aspartic proteinase nepenthes in-1
MELO3C012 476.1	216378	217884	AT3G27890	CICG05G026850 CICG01G007550	CsaV3_5G024520Cs aV3_5G036800	FAN03G1817 FAN10G2787 FAN06G1382 FAN06G3945 FAN10G3949	Solyc01g096420.3 Solyc01g096430.4	NADPH:qu inone oxidoreductase-like

MELO3C012 475.1	225819	231236	AT1G777 40 AT3G569 60 AT1G014 60 AT1G219 80 AT2G412 10 AT3G079 60 AT3G099 20 AT1G608 90 AT4G011 90 AT2G264 20 AT1G109 00	CICG10 G01986 0 CICG05 G00100 0 CICG04 G00449 0 CICG03 G00933 0 CICG09 G01447 0 CICG11 G01556 0 CICG09 G01446 0 CICG05 G02684 0 CICG09 G01445 0 CICG01 G00754 0	CsaV3_3G036240 CsaV3_6G037410 CsaV3_5G023290 CsaV3_5G036790 CsaV3_5G024510 CsaV3_3G008320 CsaV3_4G029670 CsaV3_4G028490	FAN10G24 31 FAN05G52 58 FAN13G30 42 FAN06G03 88 FAN01G08 13 FAN20G01 47 FAN02G27 26 FAN05G37 02 FAN01G17 29 FAN09G18 19 FAN06G12 32 FAN02G38 86 FAN27G12 63 FAN24G29 52 FAN10G33 33 FAN05G19 85 FAN08G05 98 FAN03G27 11 FAN06G18 33 FAN10G03 75 FAN03G16 25 FAN09G32 40 FAN15G32 41 FAN14G22 59 FAN04G04 93	Solyc10g078460.2 Solyc10g080750.3 Solyc09g008480.4 Solyc11g013180.2 Solyc12g013470.3 Solyc01g104140.3 Solyc09g055120.1 Solyc09g055140.1 Solyc01g096410.4 Solyc09g055130.1 Solyc11g042450.1 Solyc04g015470.3 Solyc04g017620.4 Solyc04g024980.3 Solyc12g019880.1 Solyc10g086320.2 Solyc04g024970.1	phosphati dylinositol 4- phosphate 5-kinase 6- like
--------------------	--------	--------	---	--	--	--	--	--

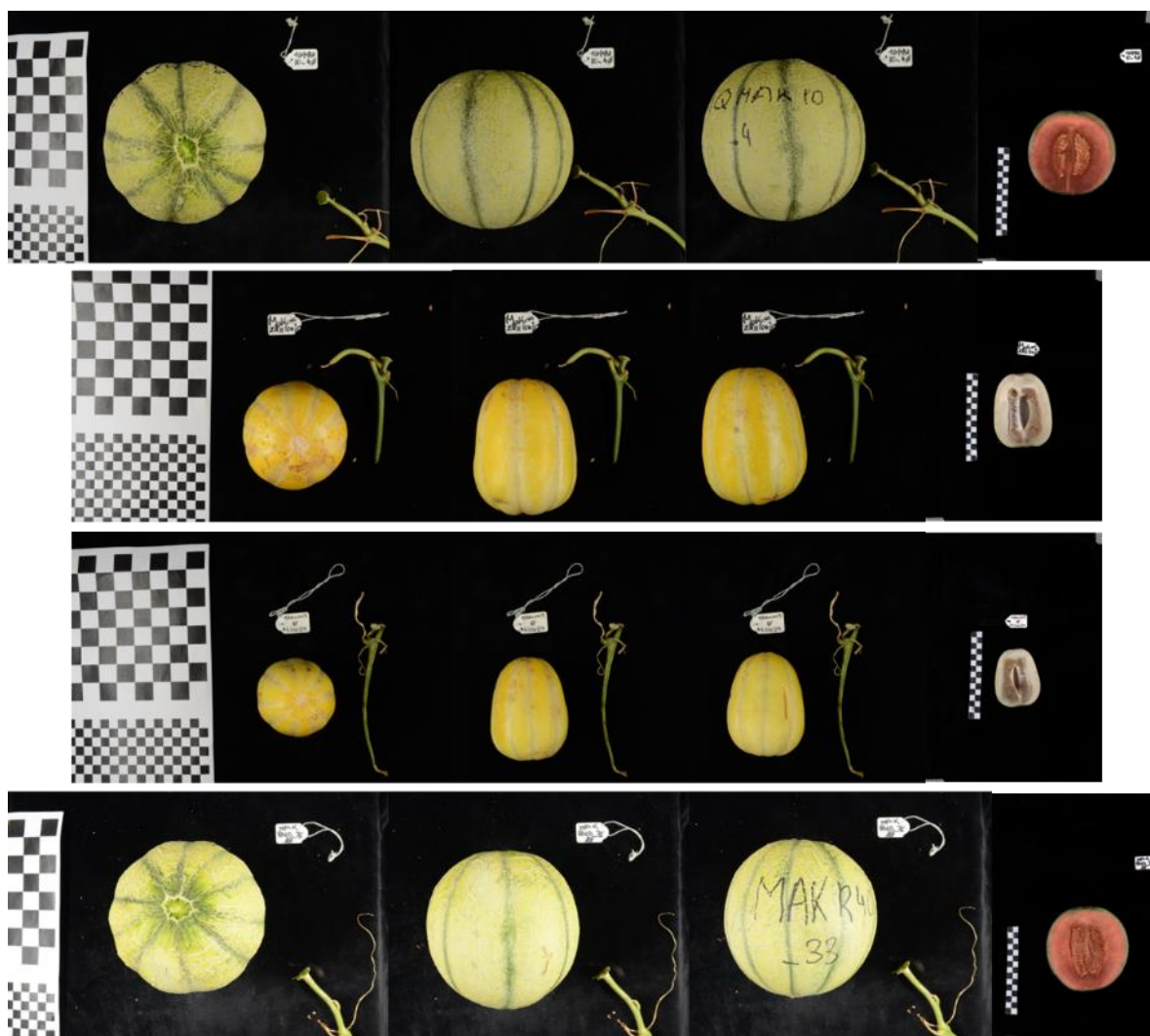
MELO3C 000333.1	2289 76	2299 63	AT1G77740 AT3G56960 AT1G01460 AT1G21980 AT2G41210 AT3G07960 AT3G09920 AT1G60890 AT4G01190 AT2G26420 AT1G10900	CICG10G 019860 CICG05G 001000 CICG04G 004490 CICG03G 009330 CICG09G 014470 CICG11G 015560 CICG09G 014460 CICG05G 026840 CICG09G 014450 CICG01G 007540	CsaV3_3G03624 0 CsaV3_6G03741 0 CsaV3_5G02329 0 CsaV3_5G03679 0 CsaV3_5G02451 0 CsaV3_3G00832 0 CsaV3_4G02967 0 CsaV3_4G02849 0	FAN10G2431 FAN05G5258 FAN13G3042 FAN06G0388 FAN01G0813 FAN20G0147 FAN02G2726 FAN05G3702 FAN01G1729 FAN09G1819 FAN06G1232 FAN02G3886 FAN27G1263 FAN24G2952 FAN10G3333 FAN05G1985 FAN08G0598 FAN03G2711 FAN06G1833 FAN10G0375 FAN03G1625 FAN09G3240 FAN15G3241 FAN14G2259 FAN04G0493	Solyc10g078460.2 Solyc10g080750.3 Solyc09g008480.4 Solyc11g013180.2 Solyc12g013470.3 Solyc01g104140.3 Solyc09g055120.1 Solyc09g055140.1 Solyc01g096410.4 Solyc09g055130.1 Solyc11g042450.1 Solyc04g015470.3 Solyc04g017620.4 Solyc04g024980.3 Solyc12g019880.1 Solyc10g086320.2 Solyc04g024970.1	Phosphatidyli nositol-4- phosphate 5- kinase, putative
MELO3C 012474.1	2445 21	2542 02	AT3G55850	CICG05G 026810	CsaV3_5G03677 0	FAN01G0546FAN10 G0529	Solyc08g014470.4	Amidohydroly se family
MELO3C 012472.1	2550 14	2645 15	AT3G54440	CICG05G 026800	CsaV3_5G03676 0	FAN10G3804 FAN06G0154 FAN10G2928 FAN03G1408	Solyc08g014480.4	beta- galactosidase

MELO3C 012471.1	2675 54	2716 07	AT1G22540 AT1G72125 AT1G72140 AT1G22550 AT1G72120 AT1G22570 AT1G72130 AT3G54450	CICG05G 026790 CICG01G 004550 CICG08G 000240 CICG08G 000250	CsaV3_5G00481 0 CsaV3_5G00480 0 CsaV3_5G04050 0 CsaV3_5G04051 0 CsaV3_5G04049 0 CsaV3_5G00477 0 CsaV3_5G03675 0	FAN03G1890 FAN18G2869 FAN10G0353 FAN10G3119 FAN03G0054 FAN08G3377 FAN06G3922 FAN03G0523 FAN06G0267 FAN03G3060 FAN04G1086 FAN08G0204 FAN13G1283 FAN06G3787 FAN08G0501 FAN04G0819 FAN03G1711 FAN18G0657 FAN18G3908 FAN08G1438	Solyc06g065020.3 Solyc08g007060.4 Solyc10g084940.3	protein NRT1/ PTR FAMILY 5.4
MELO3C 012470.1	2755 21	2774 86	AT2G41310 AT3G48100 AT2G07440 AT1G19050 AT3G56380 AT1G10470 AT5G62920 AT2G40670 AT3G57040 AT1G59940 AT1G74890	CICG06G 016650 CICG04G 004320 CICG08G 005790 CICG10G 016090 CICG05G 024950 CICG07G 005170 CICG01G 007500 CICG05G 026780	CsaV3_5G02448 0 CsaV3_5G03674 0 CsaV3_5G03194 0 CsaV3_3G04033 0 CsaV3_6G03434 0 CsaV3_4G02977 0 CsaV3_5G01103 0 CsaV3_1G00186 0	FAN09G0553 FAN22G1826 FAN01G2409 FAN02G2527 FAN08G1677 FAN15G3717 FAN06G1891 FAN17G2710 FAN11G1359 FAN07G2024 FAN27G0209 FAN20G2734 FAN12G2925 FAN13G1671 FAN21G0429 FAN24G2848 FAN27G0051 FAN16G0647 FAN25G2357 FAN03G2593 FAN18G3937 FAN04G0740 FAN03G1363 FAN24G0917 FAN20G3060 FAN16G1314 FAN06G4545 FAN06G3420 FAN10G0029	Solyc10g079600.2 Solyc10g079700.2 Solyc02g071220.3 Solyc03g044662.1 Solyc03g113720.3 Solyc06g048930.4 Solyc06g048600.3 Solyc05g006420.3	two- component response regulator ORR9-like
MELO3C 034022.1	2789 50	2792 97						Unknown protein
MELO3C 012469.1	2793 28	2812 96	AT2G38750	CICG03G 012720	CsaV3_5G03672 0	FAN01G0481 FAN06G2403 FAN10G3361 FAN03G1387	Solyc01g097550.4	annexin D4- like

MELO3C 012468.1	2835 44	2869 95	AT2G38750	CICG03G 012720	CsaV3_5G03673 0	FAN06G2403 FAN10G3361 FAN01G0481 FAN03G1387	Solyc01g097550.4	Annexin
MELO3C 034025.1	2869 58	2879 02			CsaV3_5G03672 0			Annexin
MELO3C 012467.1	2890 73	2980 13	AT3G54460	CICG05G 026770	CsaV3_5G03671 0	FAN03G2070 FAN01G2386 FAN06G4324	Solyc11g005250.3	F-box protein isoform X1
MELO3C 012466.1	2986 69	3015 33	AT1G10865	CICG05G 026760	CsaV3_5G03670 0	FAN27G3309	Solyc03g117900.3	Cytochrome C oxidase assembly factor
MELO3C 012465.1	3034 78	3051 19	AT5G06470 AT3G28850 AT3G57070 AT5G01420 AT5G13810 AT5G39865 AT5G03870 AT1G64500 AT2G41330 AT4G10630 AT3G11773 AT1G32760 AT5G58530	CICG01G 001470 CICG04G 004240 CICG02G 019370 CICG10G 018910 CICG01G 001750 CICG00G 001100 CICG10G 016050 CICG10G 014950 CICG05G 026750 CICG08G 008430 CICG10G 018170 CICG07G 004450 CICG09G 018350	CsaV3_5G00189 0 CsaV3_5G03669 0 CsaV3_5G03793 0 CsaV3_5G01036 0 CsaV3_6G00442 0 CsaV3_3G04041 0 CsaV3_3G04157 0 CsaV3_3G03814 0 CsaV3_5G00161 0 CsaV3_3G03734 0 CsaV3_4G02781 0 CsaV3_6G01599 0	FAN14G2392 FAN21G3428 FAN06G2563 FAN10G2514 FAN01G1645 FAN18G1660 FAN10G0737 FAN18G2051 FAN14G3350 FAN13G2252 FAN13G0361 FAN03G3522 FAN01G0019 FAN18G3375 FAN01G1286 FAN14G3237 FAN09G1332 FAN06G0790 FAN05G1456 FAN02G4352 FAN11G2437 FAN05G2655 FAN03G3242 FAN08G1480 FAN08G0549 FAN09G0630 FAN02G1316 FAN14G1432 FAN09G1809 FAN06G4534 FAN25G3024 FAN14G3071 FAN02G0355 FAN04G3141 FAN05G4056 FAN10G1075 FAN16G1921 FAN05G1502 FAN04G1844	Solyc06g082180.3 Solyc02g087850.1 Solyc04g039900.1 Solyc11g005270.1 Solyc08g083270.3 Solyc02g067400.3 Solyc03g078380.1 Solyc08g082590.3 Solyc09g009860.1 Solyc06g082170.2 Solyc10g079560.1 Solyc11g006430.1	Glutaredoxin family protein

MELO3C 012464.1	3073 39	3130 44	AT3G07940 AT4G05330 AT4G21160	CICG03G 006260 CICG01G 007750 CICG05G 026740 CICG01G 025140	CsaV3_5G02483 0 CsaV3_5G03668 0 CsaV3_1G03733 0 CsaV3_6G05235 0	FAN06G2877 FAN11G2531 FAN10G1675 FAN01G1841 FAN03G1166 FAN16G1545 FAN21G3916 FAN25G0509	Solyc08g043140.4 Solyc02g024020.3	ADP- ribosylation factor GTPase- activating protein AGD12-like
MELO3C 012463.1	3145 79	3176 42	AT5G53360 AT4G27880 AT3G58040 AT2G41980 AT3G61790 AT3G13672	CICG05G 008930 CICG05G 026730 CICG06G 001270 CICG02G 023800 CICG04G 000960 CICG01G 007730	CsaV3_5G03666 0 CsaV3_3G01989 0 CsaV3_4G02357 0 CsaV3_5G02481 0 CsaV3_3G01990 0 CsaV3_6G00720 0	FAN01G0791 FAN25G3445 FAN18G4579 FAN10G2362 FAN14G3712 FAN05G2380 FAN25G2707 FAN10G0560 FAN03G1304 FAN02G0877 FAN22G2369 FAN02G0067 FAN12G0258 FAN08G1092 FAN03G0696 FAN16G1472 FAN18G0170 FAN06G4373 FAN04G2917 FAN10G1937 FAN09G4557 FAN21G1472 FAN06G1298 FAN06G4473 FAN13G1589 FAN11G1387	Solyc10g080570.2 Solyc06g051980.4 Solyc02g069880.4 Solyc03g083270.4 Solyc10g009420.3 Solyc05g050580.3 Solyc01g096020.4 Solyc01g006190.3	E3 ubiquitin- protein ligase
MELO3C 012462.1	3226 62	3258 30	AT3G54480	CICG05G 026720	CsaV3_5G03665 0	FAN03G1179 FAN06G1602 FAN10G0293	Solyc11g005590.1	F-box protein SKIP5
MELO3C 012461.1	3263 80	3381 31	AT5G64170 AT3G54500	CICG05G 026710 CICG10G 009220	CsaV3_5G03664 0 CsaV3_4G00939 0	FAN01G0485 FAN03G1361 FAN10G4033 FAN06G1884	Solyc04g009050.4 Solyc01g068560.3 Solyc01g105120.4	Protein LNK2
MELO3C 012460.1	3380 32	3381 87						Unknown protein
MELO3C 012459.1	3392 84	3423 22	AT1G07615	CICG05G 026700	CsaV3_5G03663 0	FAN21G0377 FAN27G2561	Solyc04g058140.3	GTPase obg

## Anexo D - Fotografías de los melones durante el fenotipado



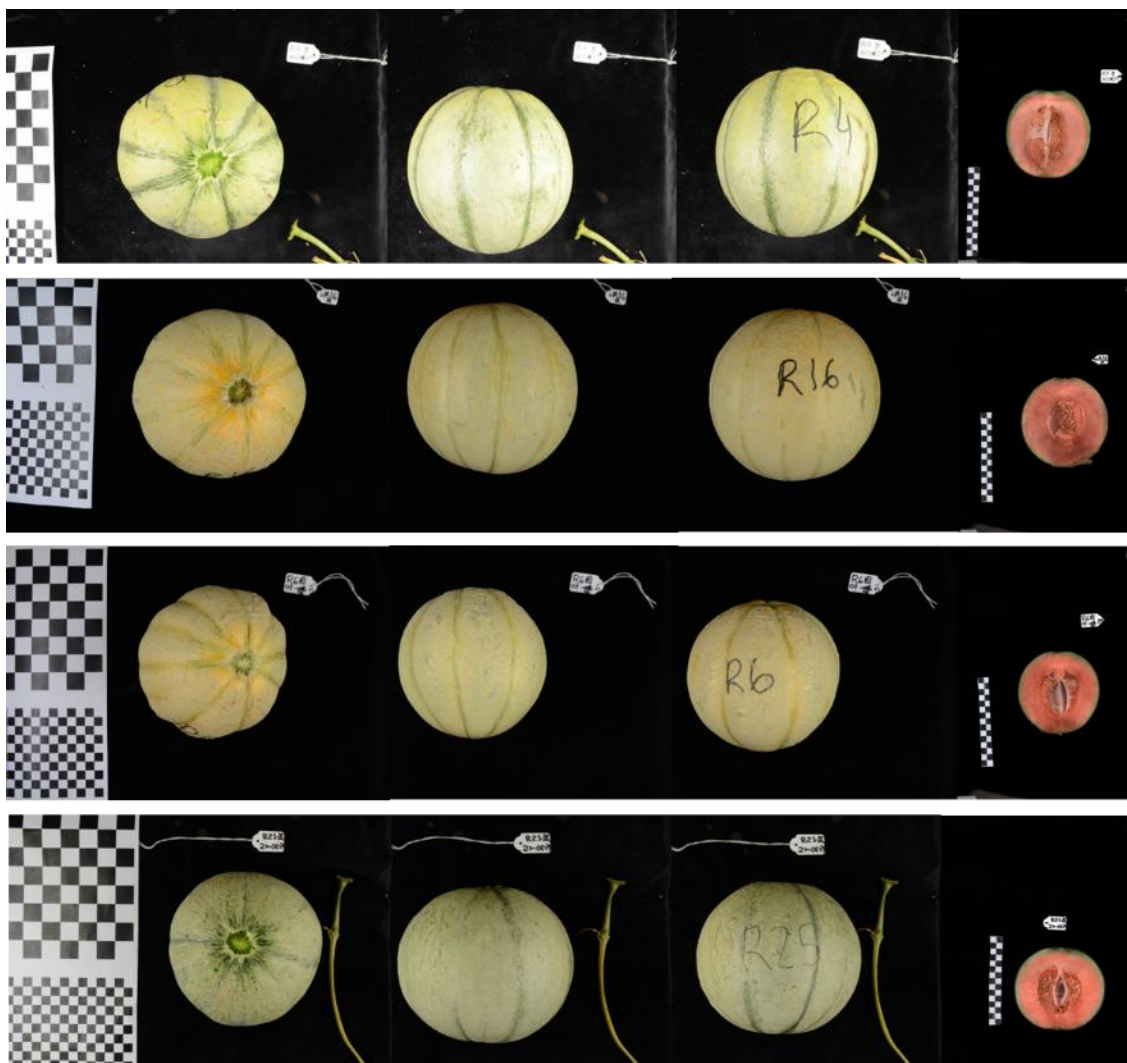
**Figura anexo D-1.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo:

*1QMAK10\_4, Makuwa\_2, Makuwa\_9 y MAKR40\_33.*



**Figura anexo D-2.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo: F1

*MxV\_19, MAKR40\_33, MAKR40\_36 y MAKR40\_38.*



**Figura anexo D-3.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo:

R4, R16, R6 y R25.



**Figura anexo D-4.** Imágenes de los melones en planta, perfiles y de la pulpa. De arriba abajo: R25, R35 y Ved\_36.