



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrobiodiversidad Valenciana

**Tesis Doctoral**

**DESARROLLO DE LÍNEAS DE  
INTROGRESIÓN EN MELÓN PARA LA  
MEJORA DE LA CALIDAD DE ESTA  
ESPECIE**

*Tesis presentada por:*

**Gorka Perpiñá Martín**

**Directores:**

**Dra. María Belén Picó Sirvent**

**Dra. Cristina Esteras Gómez**

**Dr. Antonio José Monforte Gilabert**

**Valencia, enero 2020**





# AGRADECIMIENTOS

Es de bien nacido ser agradecido, por eso en primer lugar quiero agradecer a Belén la confianza depositada en mi para hacer esta tesis. Durante estos años me has enseñado no solo a investigar sino también me has enseñado a trabajar y a persistir, me has enseñado que el sabor del melón es una combinación perfecta entre el dulzor y la acidez. Creo que no te quedan muchas más cimas que alcanzar, lo siguiente sería opositar para quitarle el puesto a Deméter y poder plantar melón durante todo el año. Gracias de nuevo por estos años, los recordaré como el sabor del mejor melón.

Esta tesis nunca la hubiera terminado si no hubiese sido gracias a ti, Cristina. Gracias por estos años, por ayudarme y aguantarme durante todo este tiempo, sin ti esta tesis no hubiera sido lo mismo. Eres una pieza fundamental en este grupo y creo que vas a llegar muy lejos, siempre que vea un QTL me acordaré de ti. Gracias.

Toni, no he compartido tantos momentos contigo, pero quiero darte las gracias por los consejos, por la buena actitud y por tu aportación durante el proceso de tesis, ha sido un placer.

Quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a Jaime. Para mi eres otro director de tesis. Ojalá pudieras contagiar como un virus tu ética y conocimiento, ojalá muchos investigadores sean como tú. Gracias por enseñarme el mundo de los volátiles, de los azúcares y de las rutas metabólicas, ha sido una partida de ajedrez infinita.

Eva, GRACIAS POR TODO. Gracias por enseñarme todo sobre el cultivo de cucurbitáceas, por ayudarme siempre que has podido, por escucharme, por aceptarme en tu despacho y sobre todo por enseñarme que rendirse no es una opción. Solo quiero que sepas que para mí eres una parte fundamental del grupo y que vales mucho más de lo que te crees.

Me gustaría agradecer a Gabriel, han sido muchos años juntos, por todos los consejos, ayuda y momentos que hemos pasado, tú me has enseñado lo más importante, que la vida hay que vivirla. Echaré de menos tus historias. Nos vemos pronto.

Como un gambito de dama que no ves venir apareció Miguel, ha sido un placer compartir este tiempo, tú me has enseñado que todo se puede conseguir mediante “colaboración ciudadana”. Siempre has estado ahí para mostrarme las cosas desde otro punto de vista, se agradece.

Durante este camino es totalmente necesario estar motivado y con energía, por eso me gustaría agradecerles a todas las personas con los que compartí “algún momento” durante este trayecto. Irene, por contagiarme tus ganas de luchar. Leandro, por transmitirme toda la tranquilidad.

Elena, porque no se puede ser más simpática. Raúl, porque eres tú. Ana por tu risa pegadiza. Cristina, porque eres un ejemplo de conseguir lo que te propones. Alejandro, por tu actitud y nobleza. Cristina Roig, fuiste tú quien me enseñó la parte molecular. Glauber y Elaine, por toda la ayuda con los frutos “maduros e inmaduros”. Rosa, por tu ayuda estadística y la que no es estadística. Me gustaría agradecerle también todos los buenos momentos y consejos a la pareja indestructible (Estela y Loles), creo que haríamos un equipo perfecto, gracias por este tiempo. Los recordaré con la mejor sonrisa. A Pepe y J, porque siempre es mejor dos chupitos que uno. A todos y cada uno de los amigos de mi barrio, porque hay maneras de *ser y no necesito veros pa saber que no os olvidaré*, gracias por vuestro apoyo. Siempre es bueno mirar las cosas en retrospectiva, por eso me gustaría agradecer todo este tiempo a Miguel y José Vicente, aunque vosotros no lo veáis fuisteis los que me motivasteis a entrar en este mundo, gracias.

A Pedro y Sagrario, por darme todo vuestro cariño sin pedirlo, no tengo suficientes palabras de gratitud para vosotros. Gracias por enseñarme que *a veces cargamos las cosas con una importancia que solo existe en nuestra cabeza*. Este es el mayor trabajo que os puedo dedicar, os quiero. A mi hermano y mejor amigo Unai. Aunque partamos del mismo cigoto siempre has ido un paso por delante, gracias por enseñarme a ser valiente, te lo mereces todo y creo que sin tu apoyo esta tapia ya hubiese caído, gracias por ser como eres.

A la coautora de esta tesis, Maribel. Gracias por darme la energía que necesito, gracias por enseñarme tanto en la vida, gracias por mostrarme la realidad en pequeñas dosis, gracias por estar siempre. Eres increíble y te lo mereces todo, que nada ni nadie te corte las alas, porque me encanta verte volar. El viaje se ha hecho largo, pero ya termina. Gracias.

# ÍNDICE

ABSTRACT .....	13
RESUMEN.....	14
RESUM.....	15
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL .....	19
1.1. Importancia económica del melón.....	19
1.2. Taxonomía, origen y variabilidad genética .....	20
1.3. El grupo Makuwa y el grupo Cantalupensis.....	24
1.4. Marcadores genéticos y mapas genéticos y físicos en melón.....	25
1.5. Métodos de genotipado de SNPs .....	29
1.6. Desarrollo de líneas de introgresión para el mapeo de QTLs.....	31
1.7. Mejora de la calidad del fruto en melón .....	33
1.7.1. Morfología del fruto .....	35
1.7.2. Apariencia externa del fruto.....	37
1.7.3. Apariencia interna del fruto melón.....	38
1.7.4. Comportamiento en la maduración .....	39
1.7.5. Aroma.....	41
1.7.6. Contenido en sólidos solubles y ácidos orgánicos .....	46
1.8. Estructura de la presente tesis doctoral.....	48
OBJETIVO GENERAL .....	53
Objetivos específicos.....	53
CAPÍTULO 2: A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits.....	59
2.1. Abstract.....	59
2.2. Background.....	60
2.3. Results and Discussion .....	62
2.3.1. Development of the IL population .....	62
2.3.2. Parent phenotypes .....	63
2.3.3. Association analysis in backcross families .....	64
2.3.4. QTL analysis in the IL population .....	66
2.3.5. Stability of QTL detection in Backcrosses and ILs .....	88
2.4. Conclusion.....	89
2.5. Methods .....	91
2.5.1. Plant material .....	91

2.5.2. Breeding Scheme .....	91
2.5.3. Markers and genotyping methods .....	92
2.5.4. Agronomic evaluation and characters measured .....	93
2.5.5. Association analysis in backcross families .....	95
2.5.6. QTL analysis in introgression lines .....	95
CAPÍTULO 3: ‘MAK-10’: A long shelf-life Charentais breeding line developed by introgression of a genomic region from Makuwa melon. ....	103
3.1. Abstract.....	103
3.2. Origin.....	105
3.3. Description.....	106
3.3.1. ‘MAK-10’ and VED do not differ in flowering time and fruit morphology .....	106
3.3.2. ‘MAK-10’ differ from VED in the ripening process .....	108
3.3.3. ‘MAK-10’ and VED differ in the post-harvest behavior.....	112
3.4. Conclusions .....	114
CAPÍTULO 4. Analysis of aroma-related volatile compounds affected by ‘Ginsen Makuwa’ genomic regions introgressed in ‘Vedrantais’ melon background.....	121
4.1. Abstract.....	121
4.2. Introduction .....	122
4.3. Material and Methods .....	126
4.3.1. Plant material .....	126
4.3.2. ILs Genotyping .....	126
4.3.3. Experimental design.....	126
4.3.4. Sample preparation and analysis conditions .....	127
4.3.5. Reagents for metabolite analysis .....	127
4.3.6. Determination of volatiles.....	127
4.3.7. Data processing and statistical analysis .....	128
4.4. Results and discussion .....	129
4.4.1. GBS analysis of IL genotypes.....	129
4.4.2. VOCs profiles of parents and ILs .....	131
4.4.3. Effect of the assay on VOCs content .....	137
4.4.4. Correlation network among VOCs .....	138
4.4.5. Specific effects of MAK introgressions on VOC accumulation.....	141
4.4.6. Pleiotropic effects of MAK introgressions .....	143
4.5. Conclusions .....	154
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL. ....	195
CONCLUSIONES .....	213
REFERENCIAS .....	223





## **Llista de abreviaturas**

AADC: Aromatic Amino Acid Decarboxylase  
AAT: alcohol acyl transferase  
ACC: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid  
ACS: ACC Synthase  
ACO: ACC Oxidase  
ADH: Alcohol Dehydrogenase  
AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphisms  
AGAL:  $\alpha$ -galactosidase  
AL: Abscission Layer  
AR: External Aroma  
ArAT: Aromatic Amino Acid Aminotransferase  
AT: Aminotransferase  
BAMT: benzoic acid: S-adenosyl-L-methionine carboxyl methyltransferase  
BC: Backcross  
BCAT: Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase  
BPYV: Beet pseudo-yellows virus  
CABYV: Cucurbit aphid-borne yellows virus.  
CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence  
CCD: Carotene cleavage dioxygenase  
CCR Cinnamoyl-CoA reductase  
CCYV: Cucurbit chlorotic yellows virus  
CGMNV: Cucumber green mottle mosaic virus  
CNR: Cell Number Regulator  
CIR: Color of the Inner Rind  
cM: Centimorgan  
CMV: Cucumber mosaic virus  
COMAV: Instituto de Conservación y Mejor de la Agrobiodiversidad Valenciana  
CNL: (E)-cinnamic acid CoA ligase  
CRTISO: Carotenoide Isomerasa  
CSR: Cell Size Regulator

CVYV: Cucurbit vein yellowing virus  
CW: Cavity Width  
CYSDV: Cucurbit yellow stunting disorder virus  
DAP: Days After Pollination  
DHL: Doble Haploides  
DHS: Dynamic Headspace  
DMAT: Days to Maturity  
DUD: Dudaim  
E: Environment  
EcoTILLING: Eco-type Target Induced Local Lesions in Genoms  
ESTs: Expressed Sequence Tags  
eQTL: Expression Quantitative Trait Loci  
FCHL: Flesh Color Hunter Lab  
FCa: Flesh Color Hunter Lab. a  
FCb: Flesh Color Hunter Lab. b  
FD: Fruit Diameter  
FF: Flesh Firmness  
FL: Fruit Length  
FRUC: Fructose  
FS: Fruit shape  
FW: Fruit Weight  
G: Genotype  
GBS: Genotyping by Sequencing  
GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry  
GF: Green Flesh  
GL: Grupo de Ligamiento  
GLM: General Linear Model  
GLUC: Glucose  
HCA: Hierarchical Cluster Analysis  
HPL: hidroperoxide lyase  
HRM: High Resolution Melting

IL: Introgression Line  
ICuGi: International Cucurbit Genomics Initiative  
ISSRs: Internal Simple Sequence Repeats  
LOX: lipoxygenase  
MAK: Makuwa  
MAS: Marker-Assisted Selection  
MetAt: Methionine Aminotransferase  
MLM: Mixed Linear Model  
MNSV: Melon necrotic spot virus  
MGL: L-methionine- $\gamma$ -lyase  
MWMV: Moroccan watermelon mosaic virus  
NGS: Next Generation Sequencing.  
Net: Netting  
NFeF15: Number of Female Flowers 15 days after the opening of the first female flowering on each plant  
NFeF30: Number of Female Flowers 30 days after the opening of the first female flowering on each plant  
NMaF15: Number of Male Flowers 15 days after the opening of the first female flowering on each plant  
NMaF30: Number of Male Flowers 30 days after the opening of the first female flowering on each plant  
PAAS: Phenylacetaldehyde Synthase  
PAL: Phenylalanine Ammonia Lyase  
PCA: Principal Component Analysis  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PDS: Pythoene Desaturase  
PS: Piel de Sapo  
PSY: Phytoene Desaturase  
PSRV: Papaya ring spot virus  
QTL: Quantitative Trait Loci  
RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNAs  
RFLPs: Restriction Fragment Length Polymorphisms  
RILs: Recombinant Inbred Lines

RTh: Rind Thickness  
SC: Songwhan Charmi  
SCARs: Sequence Characterized Amplified Regions  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism  
SPET: Single Primer Enrichment Technology  
SPS: Sucrose Phosphatesynthase  
SS: Sucrose Synthase  
SSC: Soluble Solid Concentration  
SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism  
SSRs: Simple Sequence Repeat  
SUC: Sucrose  
Tilling: Target Induced Local Lesions in Genoms  
Tm: Melting Temperature.  
TRM: TONNEU1 Recruiting Motif  
TPS: Terpeno Synthase  
ToLCNDV: Tomato leaf curl New Delhi virus  
VED: Vedrantaïs  
VOCs: Volatile Organic Compound  
WMV: Watermelon mosaic virus  
WF: White Flesh  
ZDS: Z-carotene desaturase  
ZYMV. Zucchini yellow mosaic virus



## ABSTRACT

Melon (*Cucumis melo* L.) is one of the most economically important crops in the world. The wide intraspecific genetic variability that it presents allows the study of a wide range agronomic and fruit quality traits. In recent years, a large number of molecular markers and genomic tools have been developed in melon, which is a resource that facilitates the development of new breeding populations. Introgression Lines (ILs) are a set of lines that contain a chromosomal fragment of a donor parent, usually wild or exotic, in a common genetic background usually an elite variety. These collections are appropriate for the study of quantitative traits and, above all, for the introduction of exotic alleles in modern cultivars. This doctoral thesis describes the development of a collection of ILs using the Japanese accession 'Ginsen makuwa', as an exotic donor parent, and the French cultivar 'Vedrantais' as a recurrent parent. Successive genotyping in early generations through the Agena Bioscience platform and *High Resolution Melting*, have improved efficiency in the process of obtaining ILs (five generations). This collection includes 27 ILs, which have subsequently been characterized by high-density genotyping (Genotyping by Sequencing). These have an average of 2.7 introgressions / IL with a 94 % 'Vedrantais' genetic background, representing 96.8 % of the donor genome 'Ginsen makuwa'. The analysis of phenotyping data in three environments and genotyping resulted in the detection of 86 QTLs (Quantitative Trait Loci), of which 74 were stable in at least two environments. Of these, 3 QTLs related with flowering aspects, 33 QTLs related with the morphological fruit (fruit shape, netting and rind thickness), 12 QTLs related with ripening behaviour (presence/absence of aroma, abscission layer and flesh firmness), 16 QTLs were related with flesh color, 5 QTLs related with color of the inner rind and 1 related with the soluble solid concentration. Some of the QTLs described in this thesis have been identified in previous works, giving greater confidence to the detected regions, others, however, are novel and, therefore, very interesting, because they constitute a very valuable resource for the search for candidate genes and for the use of these alleles in improvement programs.

Of the entire ILs collection, MAK\_10-1 presented a blockade of the climacteric, which can translate into a longer post-harvest life, trait that is very in the international market. The effects of introgression on chromosome 10 are the absence of external aroma and the greater flesh firmness, in addition the higher soluble solids content in flesh. In addition, several candidate genes involved in transcriptional regulation and ethylene signaling during fruit ripening have been located. On the other hand, other potentially interesting lines and candidate genes, are described to provide diversity of sizes, shapes, flesh color and aromatic profile to the cantaloupe type market. Regarding the profile of volatile compounds (VOCs) analyzed in ILs, it was found that Makuwa introgressions generally decreased the content of aromatic compounds. Despite the remarkable environmental effect, certain genomic regions could be associated with certain VOCs profiles, identifying some candidate genes involved in different aromatic biosynthetic pathways. The difficulty of recover certain aromatic profiles in breeding programs is evidenced by the high number of regions and genes involved, as well as by pleiotropic effects that affect the aroma production and which are described in this thesis as the blocking of the climacteric or the flesh color due to the presence of carotenes.

## RESUMEN

El melón (*Cucumis melo* L.) es actualmente uno de los cultivos con mayor importancia económica en el mundo. La amplia variabilidad genética intraespecífica que presenta permite el estudio para su explotación del control genético de un amplio abanico de caracteres tanto agronómicos como de calidad del fruto. En los últimos años se han desarrollado un gran número de marcadores moleculares y de herramientas genómicas en melón, que facilitan el desarrollo de nuevas poblaciones de mejora. Las líneas de introgresión (ILs) son un conjunto de líneas que contienen un fragmento cromosómico de un parental donante, normalmente exótico, en un fondo genético común normalmente de una variedad de élite. Estas colecciones son apropiadas para el estudio de caracteres cuantitativos y, sobre todo, para la introducción de alelos exóticos favorables en cultivares comerciales. En la presente tesis doctoral se describe el desarrollo de una colección de ILs empleando la entrada japonesa ‘Ginsen makuwa’, como parental donante y el cultivar francés ‘Vedrantais’ como parental recurrente. Los sucesivos genotipados en generaciones tempranas mediante la plataforma Agena Bioscience y *High Resolution Melting*, han mejorado la eficiencia en el proceso de obtención de las ILs (cinco generaciones). Esta colección incluye 27 ILs, que posteriormente se han caracterizado mediante un genotipado de alta densidad (*Genotyping by Sequencing*). Éstas presentan un promedio de 2,7 introgresiones/IL con un 94 % de recuperación del fondo genético ‘Vedrantais’, representando un 96,8 % del genoma donante. El análisis de los datos de fenotipado en tres ambientes y el genotipado dio lugar a la detección de 86 QTLs (*Quantitative Trait Loci*), de los que 74 fueron estables en al menos dos ambientes. De éstos, 3 QTLs están relacionados con aspectos de floración, 4 con la precocidad de maduración del fruto, 33 con aspectos morfológicos (forma del fruto, reticulado y espesor de la corteza), 12 con el proceso de maduración (presencia de aroma, capa de abscisión, firmeza de la pulpa), 16 con el color de la pulpa, 5 con el color interno de la corteza y 1 con el contenido en sólidos solubles. Algunos de los QTLs descritos en esta tesis han sido identificados en trabajos previos, lo que da solidez a las regiones detectadas, otros, en cambio, resultan novedosos y, por tanto, muy interesantes, pues constituyen un recurso muy valioso tanto para la búsqueda de genes candidatos como para el empleo de estos alelos en programas de mejora.

De entre las ILs más prometedoras, destaca MAK\_10-1 por presentar un bloqueo del climaterio, lo cual se traduce en una mayor vida postcosecha, característica muy buscada en el mercado internacional. Los efectos de la introgresión en el cromosoma 10 son la ausencia de aroma externo y la mayor firmeza de la pulpa, además del mayor contenido de sólidos solubles en pulpa. Además, se han localizado varios genes candidatos involucrados en la regulación transcripcional y de señalización de etileno durante la maduración del fruto. Por otro lado, se describen otras líneas potencialmente interesantes, así como genes candidatos, para proporcionar diversidad de tamaños, formas, color de la pulpa y perfil aromático al mercado de tipos cantalupo. Respecto al perfil de compuestos volátiles (VOCs) analizado en las ILs, se encontró que las introgresiones Makuwa en general disminuyeron el contenido en compuestos aromáticos. A pesar del efecto ambiental notable, se pudieron asociar ciertas regiones genómicas a ciertos perfiles de VOCs, identificando a su vez algunos genes candidatos involucrados en diferentes rutas de biosíntesis de aromas. La dificultad de recuperar ciertos perfiles aromáticos en los programas de mejora se pone de manifiesto por el elevado número de regiones y genes implicados, así como por efectos pleiotrópicos que afectan a la producción de aromas y que se describen en esta tesis como el bloqueo del climaterio o la coloración de la pulpa por presencia de carotenos.

## RESUM

El meló (*Cucumis melo* L.) és actualment un dels cultius amb major importància econòmica en el món. La seua gran variabilitat genètica intraespecífica permet l'estudi per a la seua explotació del control genètic d'un gran ventall de caràcters tant agronòmics com de qualitat del fruit. En els últims anys s'han desenvolupat un gran nombre de marcadors moleculars i de ferramentes genòmiques en meló, que faciliten el desenvolupament de noves poblacions de millora. Les línies de introgressió (ILs) són un conjunt de línies que contenen un fragment cromosòmic d'un parental donant, normalment exòtic, en un fons genètic normalment d'una varietat d'èlit. Estes col·leccions són útils per a l'estudi de caràcters quantitativs, a més de per a la introducció d'al·lels exòtics favorables en cultivars comercials. En la present Tesi Doctoral es descriu el desenvolupament d'una col·lecció d'ILs amb l'entrada japonesa 'Ginsen makuwa' com parental donant i el cultivar francès 'Vedrantais' com parental recurrent. Els successius genotipatges en generacions primerenques, mitjançant la plataforma Agena Bioscience i *High Resolution Melting*, han millorat l'eficiència en el procés d'obtenció de les ILs (cinc generacions). Esta col·lecció inclueix 27 ILs que posteriorment s'han caracteritzat mitjançant genotipatge per seqüenciació. Estes presenten un promedi de 2,7 introgressions/IL amb un 94 % de recuperació del fons genètic 'Vedrantais', representant un 96,8 % del genoma donant. L'anàlisi de les dades de fenotipatge en tres ambients i el genotipatge, facilità la detecció de 86 QTLs (*Quantitative Trait Loci*), dels quals 74 foren estables en al menys dos ambients. D'estos, 3 QTLs estan relacionats amb aspectes de floració, 4 amb la precocitat de maduració del fruit, 33 amb aspectes morfològics (forma del fruit, reticulat, espessor pell), 12 amb el procés de maduració (presència d'aroma, capa d'abscisió, fermesa de la polpa), 16 amb el color de la polpa, 5 amb el color intern de la pell i 1 amb el contingut en sòlids solubles. Alguns dels QTLs descrits en la Tesi han sigut identificats en treballs previs, el que dóna solidesa a les regions detectades, altres en canvi, resulten nous i, per tant, molt interessants, ja que constitueixen un recurs valuós tant per a la recerca de gens candidats com per a l'ús d'estos al·lels en programes de millora.

D'entre les ILs prometedores, destaca MAK\_10-1 per presentar un bloqueig del climateri, el qual es tradueix en una major vida postcollita, característica molt buscada en el mercat internacional. Els efectes de la introgressió en el cromosoma 10 són l'absència d'aroma extern i la major fermesa de la polpa, a més del major contingut en sòlids solubles. S'han localitzat diversos gens candidats involucrats en la regulació transcripcional i de senyalització d'etilè durant la maduració del fruit. Per altra banda, es descriuen altres línies potencialment interessants, així com gens candidats, per a proporcionar diversitat de grandària, forma, color de la polpa i perfil aromàtic al mercat de tipus cantalupo. Respecte al perfil de compostos volàtils (VOCs) analitzat en les ILs, es trobà que les introgressions Makuwa en general van disminuir el contingut en compostos aromàtics. Malgrat el efecte ambiental notable, es pogueren associar certes regions genòmiques a certs perfils de VOCs, identificant alguns gens candidats en diferents rutes de biosíntesis d'aromes. La dificultat de recuperar certs perfils aromàtics en els programes de millora es posa de manifest per l'elevat nombre de regions i gens implicats, així com pels efectes pleiotròpics que afecten a la producció d'aromes i que es descriuen en esta Tesi, com el bloqueig del climateri o la coloració de la polpa per presència de carotens.





# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL**



## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Importancia económica del melón

El melón (*Cucumis melo* L.) es una cucurbitácea cuyo fruto es de gran valor comercial. La producción mundial de melón en 2017 fue de 31,9 millones de toneladas, con un total de 1,2 millones de hectáreas cultivadas. Los principales países con mayor producción de melón son China, Turquía, Irán, Egipto, India, Kazajistán, Estados Unidos y España, destacando China con una producción de más de 17 millones de toneladas en el año 2017, frente a los 1,8 millones de Turquía. España es el octavo productor mundial con 655,677 toneladas, siendo uno de los principales países exportadores (FAOSTAT, 2017) (Figura 1).

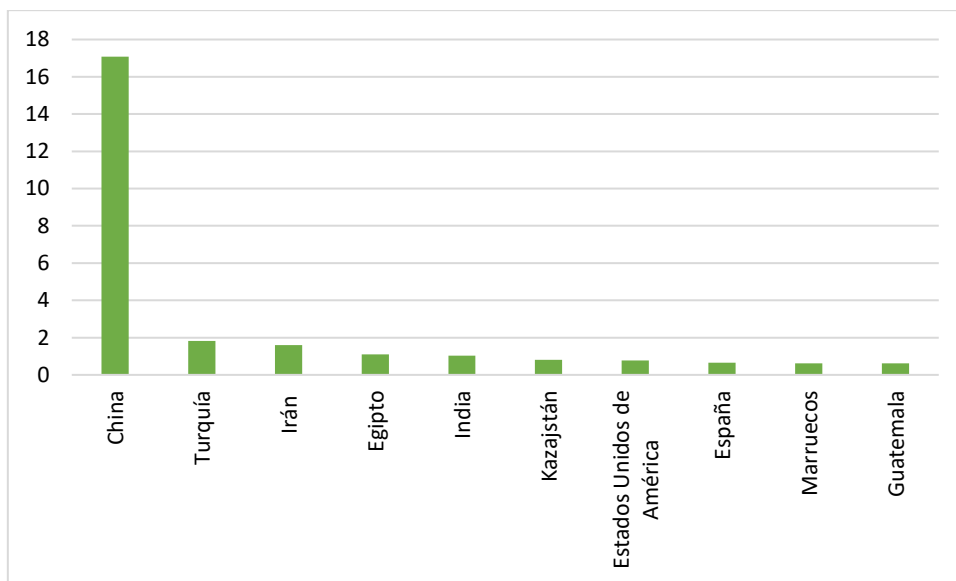


Figura 1. Producción de melón (millones de toneladas) de los diez países con mayor producción de este cultivo en el mundo. Fuente: FAOSTAT (datos del año 2017).

La producción europea de melón en 2017 fue de 1,9 millones de toneladas, con un total de 91,322 hectáreas cultivadas. La superficie cultivada y producción de melón en España suponen, respectivamente, el 24,41 % y 35,19 % de las europeas. España sigue siendo el primer productor europeo (Figura 2) y el segundo que más superficie destina a este cultivo. El melón ocupa el séptimo lugar entre las hortalizas/frutas que se producen en España después del tomate, cebollas, pimientos, lechugas, sandías y el grupo de calabacines y calabazas (FAOSTAT, 2017).

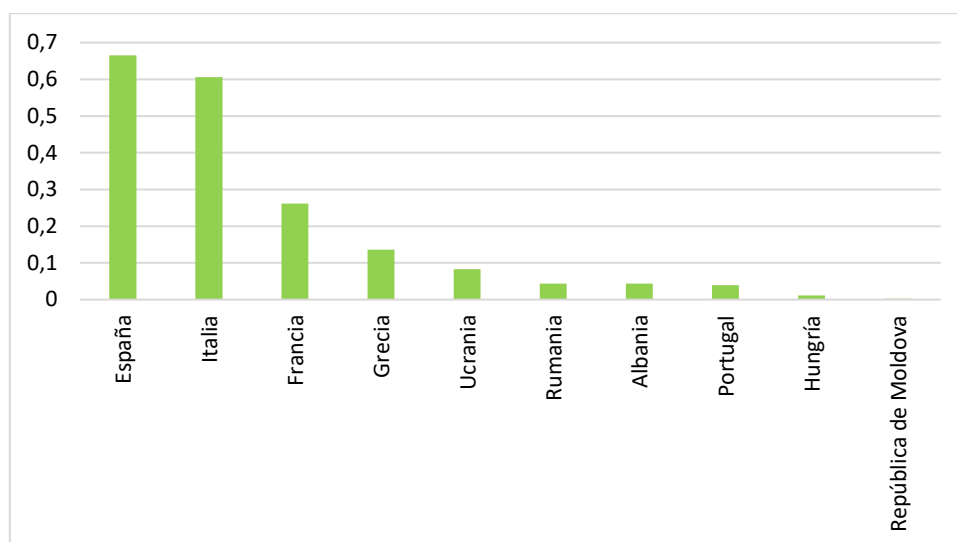


Figura 2. Producción de melón (millones de toneladas) de los diez países con mayor producción de este cultivo en Europa. Fuente: FAOSTAT (datos del año 2017).

En España, la gran mayoría del melón se cultiva en condiciones de regadío. La comunidad autónoma que más melón cosecha es la Región de Murcia con 213,638 toneladas. El 100 % de la producción de melón en la Región de Murcia se realiza en condiciones de regadío, del cual el 99 % corresponde con producciones al aire libre y el 1 % en invernaderos. Le sigue Castilla La Mancha, con una producción de 202,381 toneladas, de las cuales el 91,4 % se corresponde con producciones al aire libre en regadío y el 8,5 % en secano. Dentro de Castilla La Mancha, es Ciudad Real la provincia que más melón produce con 174,000 toneladas, lo que corresponde a un 85,9 % del total de esta comunidad. Toda la producción de melón en Ciudad Real se realiza al aire libre y en regadío. La tercera comunidad más productora de melón es Andalucía, con un total de 169,276 toneladas, de las cuales el 47,6 % se obtiene en producciones al aire libre en regadío, el 46,2 % en invernaderos y el 6,2 % en condiciones de secano. La provincia de Almería es la mayor productora de la comunidad andaluza con un 65,4 %, el 39,3 % procedente de cultivos al aire libre y el 60,7 % de cultivos en invernaderos (Anuario de Estadística, 2018).

## 1.2. Taxonomía, origen y variabilidad genética

El melón pertenece a la familia de las cucurbitáceas, familia que también comprende otros cultivos de importancia económica mundial como la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai), el pepino (*Cucumis sativus* L.) y las calabazas y calabacines (*Cucurbita* spp.). Las cucurbitáceas se han utilizado desde tiempos ancestrales con diversos objetivos: alimentación humana y animal, para fabricación de recipientes, como fuente de principios activos en medicina, como ornamentales o para elaboración de instrumentos musicales (Whitaker y Davis, 1962; Lira-Saade, 1995). Aunque estas hortalizas se aprovechan mayoritariamente por sus frutos, en estado maduro e inmaduro, en algunas especies también se aprovechan sus semillas,

e incluso las hojas jóvenes y las flores. La familia de las cucurbitáceas está formada por 130 géneros y aproximadamente 800 especies (Kocyan et al., 2007). El género *Cucumis* comprende aproximadamente 60 especies (Sebastian et al., 2010) e incluye dos importantes cultivos comerciales, como son el pepino (*C. sativus*) y el melón (*C. melo*), y otros minoritarios, como el ‘Gherkin’ del Oeste de India (*C. anguria* L.) y el ‘Kiwano’ (*C. metuliferus* E. Meyer ex Naudin), que son consumidos de forma local. Otras especies como *C. dipsaceus* Ehrenger ex Spach y *C. myriocarpus* Naudin, son utilizadas como ornamentales (Esteras et al., 2011). Estudios recientes consideran que la especie *C. melo* surgió hace 3 millones de años aproximadamente (Sebastian et al., 2010; Endl et al., 2018), aunque el lugar de domesticación del melón ha estado en constante discusión durante un largo periodo de tiempo (Robinson y Decker-Walters, 1997; Yashiro et al., 2005; Lebeda et al., 2006; Thakur et al., 2019). La problemática de asignar un lugar de domesticación viene dada por la distribución de sus especies silvestres (Gómez-Guillamón et al., 2016). Tradicionalmente, se ha asumido que el origen la especie *C. melo* es africano, con una posterior domesticación en Oriente Medio e India (Robinson y Decker-Walters, 1997). Tiempo después se observó que existen *C. melo* silvestres tanto en África como Asia, por lo que pudieron existir dos domesticaciones coetáneas en ambas regiones (Whitaker y Bemis, 1976; Kirkbride, 1993; Pitrat et al., 2008; Pitrat et al., 2013). Un estudio reciente muestra, que además de los grupos africano y asiático, existió un grupo australiano (Endl et al., 2018), aunque fueron los melones del grupo africano y asiático a partir de los que se desarrollaron los melones cultivados (Bates y Robinson, 1995), reforzando la hipótesis de la existencia de dos domesticaciones independientes en África y Asia. Por un lado, la domesticación de melones en Asia habría llevado a la diversificación de la mayoría de los grupos hortícolas de melón que se extendieron rápidamente hacia la cuenca del Mediterráneo (Sabato et al., 2019; Gonzalo et al., 2019). Por otro lado, la domesticación en África únicamente habría generado el cultivar tibish, un melon consumido en varios países del norte de África (Serres-Giardi y Dogimont, 2012; Gonzalo et al., 2019). En cuanto a los parientes silvestres más cercanos a *C. melo*, Sebastian et al. (2010) y Endl et al. (2018) citan a *Cucumis trigonus* y *Cucumis picrocarpus* F. Muell., procedentes de la India y Australia respectivamente.

Desde su origen, el melón ha sufrido un enorme proceso de diversificación, patente en la gran variabilidad que existe en cuanto a la morfología y la fisiología del fruto principalmente. Los centros primarios y secundarios de diversidad genética se localizan desde el este asiático hasta el Mediterráneo (Robinson y Decker-Walters, 1977; Akashi et al., 2002). El centro de diversificación primario es India, mientras Japón, Afganistán, Irán, Iraq, Turquía, Portugal y España, entre otros, constituyen los centros de diversificación secundarios (Robinson y Decker-Walters, 1997; Akashi et al., 2009; Gonzalo et al., 2019).

## Capítulo 1: Introducción general

Después de extenderse por Asia, se introdujo en Europa en el periodo greco-romano (Szabó et al., 2005; Paris et al., 2012). El comercio intensivo y su dispersión condujeron a una rápida diversificación de la especie (Kerje y Grum, 2000; Pitrat et al., 2008). Pitrat et al. (2000) sugirieron tres introducciones en Europa: por Europa del este, por los Balcanes y por Italia. Diferentes fuentes facilitan la información sobre la llegada del melón a Europa. Por ejemplo, se han encontrado escritos sobre el melón en el periodo greco-romano (Plinio, libro Historia Natural 20, 6:11 siglo I, en Paris et al., 2012), diferenciando entre el melón dulce (*melo*) y no dulce (*cucumeres*). Se cree que los tipos descritos como *melo* se refieren a los melones del grupo Adana procedentes de Turquía (Cizik, 1952; Janick et al., 2007), mientras que *cucumeres* se refiere a los melones del grupo Flexuosus (Mazzini et al., 1984; Grant., 2007). Posteriormente, en la época medieval se encontraron escritos donde aparecían las descripciones ‘de plantas enredaderas, los frutos redondos y delgados, en forma de nuez u ovalados, y amarillentos, aromáticos, huecos por dentro y sabrosos’, indicando que se trataba de *C. melo* (Libro Hortulus, Walafrid Strabo año 840 D.C. aproximadamente, Payne y Blunt, 1966, en Paris et al., 2012). Recientemente Sabato et al. (2019), caracterizaron semillas procedentes de un yacimiento de Cerdeña datado en la edad de Bronce, que posiblemente correspondían a melones alargados y no dulces, representando uno de los registros más antiguos del mediterráneo occidental.

España también es considerada como un centro de diversificación secundario (Esteras et al., 2013; Lázaro et al., 2017). Se piensa que fueron tipos no dulces y más o menos alargados (flexuosus) los que se introdujeron en primer lugar en la Península Ibérica. Este melón no dulce, que puede confundirse fácilmente con *C. sativus* (pepino), fue citado por Columella como *cogombro* (Álvarez de Sotomayor 1824, en Paris et al., 2012). Posteriormente, durante la conquista islámica de la península en la Edad Media, se introdujeron los tipos dulces (Paris et al. 2012).

Esta especie, *C. melo*, tradicionalmente se ha dividido en dos subespecies, basándose en las diferencias en la pilosidad del ovario: subsp. *melo* (con pelos largos en el ovario), y subsp. *agrestis* (con pelos cortos en el ovario) (Jeffrey, 1980). El melón incluye tanto tipos silvestres como cultivados y muestra gran variabilidad en caracteres relacionados con la calidad del fruto, como tamaño, forma, coloración de pulpa y corteza, características organolépticas como dulzor o aroma y el tipo de maduración (climatérica o no). En los melones cultivados existe variación en cuanto a su uso, consumiéndose la mayoría de los tipos en estado maduro como postre, y algunos tipos no dulces se consumen inmaduros, como el pepino, en ensaladas o encurtidos. Otros incluso son cultivados como ornamentales. La clasificación intraespecífica resulta difícil debido a la existencia de muchos tipos intermedios. Recientemente, Pitrat (2017) reclasificó la

variación intraespecífica en 19 grupos: Agrestis, Kachri, Chito, Tibish, Acidulus, Momordica, Conomon, Makuwa, Chinensis, Flexuosus, Chate, Dudaim, Chandalak, Indicus, Ameri, Cassaba, Ibericus, Inodurus y Cantalupensis, siguiendo los descriptores utilizados previamente (Naudin, 1859; Pangalo, 1958; Pitrat et al., 2000) excepto en algún caso que utiliza nuevos grupos y subgrupos (Figura 3).

La variabilidad genética de esta especie no se encuentra en peligro, puesto que son numerosos los bancos de germoplasma activos que la conservan. Las principales colecciones se encuentran en bancos de germoplasma de Rusia, EE.UU., Francia y China (Pitrat, 2008). Así mismo, existen algunas colecciones de interés en manos de grupos de mejora como el grupo de Mejora de cucurbitáceas del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV).

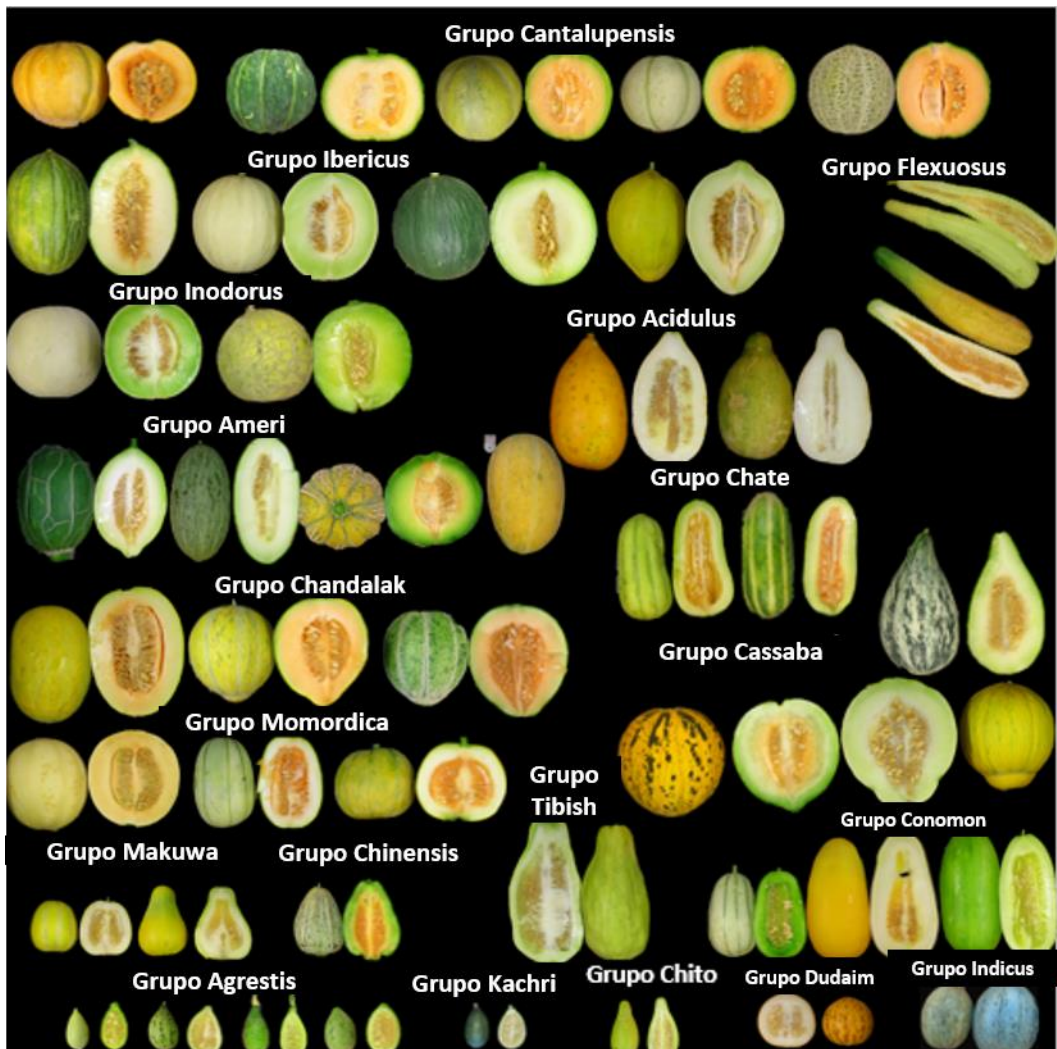


Figura 3. Principales grupos botánicos en los que la especie *Cucumis melo* está dividida, según Pitrat (2017). Todas las imágenes son originales excepto la correspondiente al del grupo Indicus, obtenida de Pitrat (2017).



### 1.3. El grupo Makuwa y el grupo Cantalupensis

El grupo Makuwa se cultiva principalmente en el Lejano Oriente. Se caracteriza por sus plantas andromonoicas con flores de pilosidad corta en el ovario. En cuanto a las características de fruto, predomina el color verde de la pulpa, aunque pueden encontrarse también colores de pulpa naranja y blanco. Los frutos presentan tamaño medio, con una forma redonda u ovalada sin reticulado. El pedúnculo no es dehiscente. Presenta un contenido medio de azúcares. Es un fruto de maduración temprana y corta vida postcosecha (Pitrat, 2017). El grupo Makuwa se divide en 6 subgrupos según la clasificación de Pitrat (2017): ‘Ogon’, ‘Nashi-uri’, ‘Kanro’, ‘Ginmakuwa’, ‘Seikan’ y ‘Yuki’, este último ha sido el parental empleado en la presente tesis. El grupo Makuwa es uno de los principales objetivos de estudio por parte de grupos de investigación asiáticos, con estudios que abarcan casi todos los ámbitos de la mejora vegetal. Desde el punto de vista de resistencia a patógenos se ha evaluado como fuente de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* raza 1.2 y a *Aphis gossypii* (Namiki et al., 1998). Desde el punto de vista de la calidad de fruto, Guo et al. (2017) han estudiado aspectos como la firmeza de la pulpa, el contenido en sólidos solubles, el color de la corteza y la producción etileno. Del mismo modo, también se han realizado múltiples estudios relacionados con la búsqueda de genes relacionados con la síntesis de carotenos (Tuan et al., 2019) y con la identificación de genes relacionados con la síntesis de compuestos aromáticos volátiles, como las lipooxigenasas (Zhang et al., 2015; Cao et al., 2016, Wang et al., 2019) o las alcohol dehidrogenasas (Chen et al., 2016) y también con genes relacionados con la síntesis de etileno (Akashi et al., 2002; Li et al., 2016). Recientemente, se han publicado dos transcriptomas de Makuwa durante el desarrollo del fruto (Kim et al., 2016; Shin et al., 2017) y se ha desarrollado un conjunto de microsatélites para testar la pureza de las semillas de Makuwa (Nam et al., 2019).

El grupo Cantalupensis fue desarrollado en Europa, probablemente a partir de accesiones del este de Turquía (Pitrat, 2017). Las plantas son monoicas o andromonoicas. El color de la corteza es variable y el de la pulpa suele ser naranja. Los frutos tienen un tamaño medio, y su forma puede ser achatada, ovalada o redondeada. La corteza presenta venas marcadas y reticulado variable. El pedúnculo es dehiscente. Presenta un alto contenido en azúcares y aromas y una vida postcosecha media-baja. Este grupo también presenta gran variabilidad subdividiéndose en seis grupos: ‘Prescott’, ‘Saccharinus’, ‘Charentais’, ‘Ogen’, ‘American Estern’ y ‘American Western’ (Pitrat, 2017). En la presente tesis se ha utilizado el cultivar ‘Vedrantais’ perteneciente al subgrupo ‘Charentais’, el cual se caracteriza por tener frutos redondos, reticulados y con un ligero acostillado, con venas verdes, además de los caracteres comunes a todos los subgrupos anteriormente citados. El grupo Cantalupensis ha sido estudiado por múltiples objetivos. Numerosos grupos de investigación han centrado sus investigaciones en este grupo varietal

debido a su importancia económica, ya sea como parental para crear alguna población de mejora (Paris et al., 2008; Galpaz et al., 2018; Pereira et al., 2018), para el estudio de caracteres etileno dependientes y etileno independientes (Pech et al., 2008), para el estudio de genes responsables en caracteres que afecten a la calidad del fruto, como la acidez (Cohen et al., 2012; 2014), el contenido en sólidos solubles (Burger et al., 2003; Freilich et al., 2015), el color de la pulpa (Freilich et al., 2015; Galpaz et al., 2018) o la presencia de compuestos orgánicos volátiles (Aubert y Bourger, 2004, Kourkoutas 2006 et al., Gonda et al., 2010), entre otros.

La elección de ambos parentales para formar la población desarrollada en la presente tesis se debe a que son dos tipos alejados genéticamente y con fenotipos contrastantes para muchos caracteres, como, por ejemplo, la morfología del fruto y el comportamiento del fruto en la maduración. Además, Makuwa presenta un alto contenido de azúcares dentro de la subsp. *agrestis*. Por otro lado, ‘Vedrantais’ es un cultivar comercial de gran importancia económica, que hasta la fecha de inicio de esta tesis todavía no se había utilizado como parental recurrente en el desarrollo de Líneas de Introgresión (*Introgression Lines*, ILs).

#### **1.4. Marcadores genéticos y mapas genéticos y físicos en melón**

Un marcador es cualquier diferencia fenotípica con control genético simple y utilizada en el análisis genético. Tras los marcadores morfológicos, de fácil identificación visual (Nuez et al., 2000), se desarrollaron los primeros marcadores bioquímicos o isoenzimas (Esquinas-Alcázar, 1981; Akashi et al., 2002). Posteriormente, se desarrollaron los marcadores basados en el polimorfismo de las secuencias de ADN. Los primeros marcadores de ADN utilizados en *C. melo* fueron los basados en la restricción e hibridación, RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Con el desarrollo de la PCR al final de los años 80, surgieron nuevos marcadores basados en la amplificación no específica de secuencia como los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs*) y AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (García et al., 1998; Stepansky et al., 1999; Silberstein et al., 1999; García-Mas et al., 2000; Zhuang et al., 2004) y después específicos de secuencia los como los SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), SSRs o microsatélites (*Simple Sequence Repeats*), ISSRs (*Internal Simple Sequence Repeats*), Expressed Sequence Tags (ESTs) y SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Stepansky et al., 1999, Morales et al., 2004; Kong et al., 2007; Fernández-Silva et al., 2008a). La necesidad de información de secuencia para el desarrollo de estos últimos es lo que retrasó su aplicación en especies no modelo como el melón. Desde hace más de 10 años, y gracias a las técnicas de secuenciación (*Next Generation Sequencing* (NGS)), la disponibilidad de secuencias en ésta y otras especies ha posibilitado el incremento en miles de este número de marcadores de alta calidad (SSRs,

## Capítulo 1: Introducción general

SNPs). Los SSRs además de ser altamente reproducibles y de naturaleza codominante y multialélica, se encuentran distribuidos por el genoma, siendo muy útiles para estudios de diversidad y clasificación (Katzir et al., 1996; Danin-Poleg et al., 2001; Mliki et al., 2001; Monforte et al., 2003). Los marcadores de tipo SNP representan el tipo más frecuente de variación de ADN en el genoma (Wang et al., 1998), pues son polimorfismos que afectan a un solo nucleótido causados por una sustitución nucleotídica, o una delección o inserción. Son también codominantes, altamente reproducibles y predominantemente bialélicos. La posibilidad de automatización en la detección de SNPs mediante el uso de plataformas de medio y alto rendimiento ha supuesto una revolución en las técnicas de genotipado, posibilitando la caracterización de amplias colecciones, saturación de mapas genéticos e impulsando la mejora molecular. Entre estas plataformas de genotipado destacan la tecnología Agena Bioscience iPLEX<sup>®</sup> Gold MassARRAY (antiguo Sequenom; Gabriel et al., 2009), la tecnología GoldenGate de Illumina (Fan et al., 2006), y la técnica de genotipado por secuenciación (GBS) (Elshire et al., 2011; López de Heredia, 2016), que se describirán en un apartado posterior.

La disponibilidad actual de una gran batería de marcadores moleculares de secuencia conocida facilita el desarrollo y saturación de los mapas genéticos. Un mapa genético es una representación ordenada de todos los polimorfismos de ADN en el genoma, basándose en el estudio de la cosegregación y recombinación entre ellos. Para conocer su posición en cada cromosoma se estudia el ligamiento entre parejas de *loci* en una población segregante (por ejemplo, F<sub>2</sub>, retrocruces (BC), doble haploides (DHL) o RILs (*Recombinant Inbred Lines*)). Una vez se definen grupos de marcadores ligados (grupos de ligamiento), se determina su orden mediante algoritmos que minimizan el número de recombinaciones necesarias. Una vez determinado el orden, se calcula la distancia entre los marcadores a partir del porcentaje de recombinación, siendo la unidad de distancia genética el centiMorgan (cM). Para construir un mapa genético de alta resolución es importante disponer de un número elevado de marcadores y un número también elevado de individuos obtenidos a partir de generaciones que posibiliten la aparición de muchos recombinantes.

El primer mapa genético en melón fue desarrollado por Baudracco-Arnas y Pitrat (1996), a partir de una población de mapeo F<sub>2</sub> obtenida a partir de los cultivares ‘Vedrançais’ (VED) (grupo Cantalupensis) y PI 161375 ‘Songwhan Charmi’ (SC) (grupo Chinensis) y empleando 110 marcadores RFLPs y RAPDs. Posteriormente, Wang et al. (1997) utilizaron marcadores tipo RAPD en una población BC<sub>1</sub>, generada a partir de los materiales ‘MR-1’ (línea mejorada desarrollada en USDA) y ‘Ananas Yokneam’ (grupo Ameri). Poco después, comenzaron a utilizarse los microsatélites para construir nuevos mapas como el de Brotman et al. (2000), a partir de una F<sub>2</sub> del cruce de la entrada PI 414723 (grupo Momordica) y la variedad ‘Top Mark’

(grupo *Cantalupensis*), o el de Oliver et al. (2001) a partir de una F<sub>2</sub> derivada de la entrada SC y la variedad ‘Piel de Sapo’ (PS) ‘T111’ (grupo *Ibericus*), que posteriormente se mejoró con más marcadores SSR (Gonzalo et al., 2005).

Con la disponibilidad de colecciones de secuencias cada vez más numerosas, se posibilitó el desarrollo de marcadores en melón, fundamentalmente de tipo SNP aunque también SSRs. González-Ibeas et al. (2007) desarrollaron una colección de 30.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (ensamblados en 16,637 unigenes) obtenidos mediante secuenciación por Sanger, identificando 1,052 SSRs y 356 SNPs putativos. Estas primeras colecciones de marcadores se emplearon para saturar los primeros mapas genéticos. Así, Fernández-Silva et al. (2008a) saturaron con más SSRs el mapa previo de Gonzalo et al. (2005) mediante la técnica de *bin-mapping*, y posteriormente Deleu et al. (2009) cartografiaron 200 SNPs adicionales. Muchos de los mapas genéticos existentes hasta 2011 fueron integrados por Díaz et al. (2011), generándose en este estudio el primer mapa consenso del melón. Este mapa contiene 1,592 marcadores moleculares (640 SSRs, 330 SNPs, 252 AFLPs, 239 RFLPs, 89 RAPDs, 15 IMAs 16 indels y 11 caracteres morfológicos), distribuidos en 12 grupos de ligamiento (GL), correspondientes a los 12 cromosomas. En el marco del proyecto MELONOMICS se secuenció el genoma del melón, empleando una línea doble haploide (DHL92) derivada del cruzamiento entre la variedad ‘PS-T111’ y SC, mediante el sistema 454 de Roche (García-Mas et al., 2012). Esta primera versión del genoma, con un tamaño de 375 Mpb, representaba el 83,3 % del genoma de esta especie, previamente estimado en 450 Mpb (Arumuganathan y Earle, 1991). Esta secuencia de referencia permitió la identificación de 2,1 millones de SNPs putativos con una frecuencia de uno cada 176 pb, y se ancló a un mapa genético construido con 602 SNPs (García-Mas et al., 2012). La anotación de este primer ensamblaje del genoma de melón (v3.5) contenía 27,427 genes. Posteriormente, Argyris et al. (2015a) mejoraron el ensamblaje del genoma (v3.5.1) con el 98,2 % del genoma repartido en 141 scaffolds y el 90,5 % de los scaffolds anclados al genoma. Recientemente, Ruggieri et al. (2018) han presentado una versión del genoma más actualizada (v3.6.1). En este nuevo ensamblaje, 375,3 Mb se reparten en 147 scaffolds, representando una mejora evidente respecto a la versión anterior, y con una nueva anotación del genoma (v4.0) asociada, que se encuentra accesible en <http://www.melonomics.net>. Díaz et al. (2015) integraron un total de 836 marcadores SSR y SNP del mapa consenso de ICuGi en el genoma de melón, por lo que se mejoró el mapa consenso previo de Díaz et al. (2011).

Como se ha mencionado anteriormente, en los últimos años ha tenido lugar una revolución en el campo de la tecnología de secuenciación. Las llamadas tecnologías NGS surgidas en los años 2005-2006 (Metzker, 2010) son tecnologías de alto rendimiento que permiten la secuenciación

## Capítulo 1: Introducción general

de millones de muestras simultáneamente, con un mínimo coste de personal y material, algo que el método de Sanger empleado hasta el momento hacía inviable. El desarrollo paralelo de herramientas informáticas para el ensamblaje y análisis de los millones de secuencias generadas, ha permitido mejorar la eficiencia de la secuenciación y la rápida identificación de marcadores moleculares, principalmente marcadores tipo SSR y SNP (Deschamps y Campbell, 2010). La plataforma NGS pionera fue la denominada 454 de Roche, seguida de la tecnología Solexa/Illumina y de Solid de Applied Biosystems, aunque actualmente la tecnología más empleada es la Illumina HiSeq (Pereira et al., 2018), que ha evolucionado muy rápidamente para ofrecer lecturas de mayor calidad a menor coste. Los llamados sistemas de secuenciación de tercera generación, de secuenciación de una molécula, también han evolucionado mucho (PacBio RS, Nanopore) (Liao et al., 2018; Alioto et al., 2019). En los inicios de esta revolución, en *C. melo*, Blanca et al. (2011) utilizaron la tecnología 454/Roche para la secuenciación de 689.054 ESTs, a partir de colecciones de cDNA procedentes de diferentes tejidos de los parentales del mapa de melón PS ‘T111’ y SC y dos cultivares comerciales pertenecientes a la subsp. *melo*, PS ‘Piñonet’ y VED. A partir del ensamblaje de los nuevos EST, combinados con los obtenidos anteriormente con Sanger, se obtuvieron 53,252 unigenes, de los cuales el 63 % se anotaron funcionalmente y el 43 % tuvieron ortólogos de *Arabidopsis thaliana*, y se identificaron más de 14,000 SNPs. También se empleó el sistema NGS SOLID para secuenciar los transcriptomas de un conjunto de 67 genotipos de melón, que previamente habían sido seleccionados a partir de una colección básica, que representaba la variación existente de toda la especie (Blanca et al., 2012). Este estudio, proporcionó los primeros datos de resecuenciación de transcriptomas de melón, produciendo la mayor colección de SNPs (alrededor de 40,000 SNPs) de melón disponible hasta ese momento y que representaba una muestra notable de la diversidad de la especie. Posteriormente, Sanseverino et al. (2015) resecuenciaron tres entradas de la subsp. *melo* PS ‘T111’, VED y ‘C-1012’ (perteneciente al grupo Dudaim), y cuatro entradas de la subsp. *agrestis* (SC y PI 124112 (perteneciente al grupo Momordica), ‘Ames-24297’ previamente clasificada como *C. trigonus* y la entrada ‘C-386’ procedente de Cabo Verde), con el objetivo de estudiar como las inserciones de transposones, la variación estructural y los SNPs contribuyen en la evolución del genoma de melón. Se identificaron más de 4,5 millones de SNPs y más de 700,000 deleciones e inserciones. Recientemente, Zhao et al. (2019), secuenciaron 1,175 entradas de melón, de las cuales 667 corresponden a la subespecie *melo*, 508 a la subespecie *agrestis* y 9 a especies cercanas a la especie *C. melo*. Empleando las plataformas Illumina HiSeq 2500 y HiSeq 3000 consiguieron una cobertura del 80,73 % del genoma ensamblado y detectaron 5,678,165 SNPs y 957,421 inserciones y deleciones.

Además de todas las herramientas genómicas destacadas anteriormente para la generación de mapas genéticos y físicos, hay que mencionar otras técnicas desarrolladas a partir de marcadores moleculares, con el objetivo de ahondar en el estudio de la expresión génica. Una de las herramientas más utilizadas con este fin han sido los *microarrays*, actualmente menos empleados por el abaratamiento de sistemas alternativos como RNA-seq. González-Ibeas et al. (2012) utilizaron esta técnica de *microarrays* para una comparativa de genes implicados en la resistencia-susceptibilidad al virus *Watermelon mosaic virus* (WMV), entre una entrada resistente ('TGR-1551', grupo Momordica) y una entrada susceptible (*C. melo.* grupo Ibericus subgrupo 'Tendral'), a diferentes días de inoculación. Los resultados mostraron la expresión diferencial entre entradas de más de 3,000 unigenes. Otra herramienta muy empleada es la de Tilling (*Target Induced Local Lesions in Genoms*) y EcoTILLING (*Eco-type TILLING*). Estas técnicas permiten estudiar la función de los genes mutados generados por variación natural o artificial (mediante la mutagenización de semillas o polen). Uno de los estudios más importantes empleando esta herramienta fue el descrito por Boaulem et al. (2015), en el que a partir de una colección de plantas con TILLING pudieron estudiar la determinación sexual del melón. Por último, una de las herramientas más novedosas para el estudio de expresión génica es RNA-seq. Galpaz et al. (2018), emplearon esta técnica para el estudio de QTLs y eQTLs en una población RIL generada a partir de los parentales PI 414723 (grupo Momordica) y 'Dulce' (grupo Cantalupensis). Uno de los resultados más destacados de esta investigación fue la detección del gen *CmPPRI*, responsable de la intensidad de carotenos en la pulpa del melón. Durante el desarrollo de programas de mejora, una de las herramientas más utilizadas es la selección asistida por marcadores. Esta selección se puede llevar a cabo mediante plataformas de genotipado a gran y media escala o mediante genotipado a pequeña escala. Estas técnicas se describirán a continuación.

## 1.5. Métodos de genotipado de SNPs

Las colecciones de SNPs, suponen una valiosa herramienta para mejorar la eficiencia de los programas de mejora, por ejemplo, para facilitar el diseño de cruces y acelerar la selección en el desarrollo de nuevas poblaciones. Para este objetivo suele ser necesario genotipar un gran número de marcadores en un elevado número de individuos y para ello es necesario emplear métodos de genotipado adecuados. Existen numerosas técnicas de genotipado de SNPs basadas en digestión con enzimas de restricción (RFLP, CAPS), otros métodos están basados en la detección de mutaciones puntuales generadas a partir de la formación del ADN de cadena simple (SSCP). También se emplean metodologías basadas en la PCR específica de alelo (Allele Specific Primers), dentro de los cuales está el método de genotipado por fluorescencia

KASP (Kbioscience: [http://dna.uga.edu/docs/KASPar\\_snp](http://dna.uga.edu/docs/KASPar_snp)) y el método Taqman (Applied Biosystems: <http://www.appliedbiosystems.com>).

Cuando necesitamos genotipar un número elevado de marcadores en un número elevado de individuos, otras técnicas son más eficientes. Por ejemplo, el desarrollo de nuevas poblaciones como líneas de introgresión requiere el genotipado de varios cientos de marcadores en varios cientos de individuos, para llevar a cabo una selección eficiente en la generación BC2, que permita acortar el proceso de obtención de las poblaciones definitivas. Para ello, suelen emplearse técnicas de genotipado de media/gran escala como el genotipado GoldenGate de Illumina o iPLEX Massarray).

Por otro lado, muchas veces, tras la aplicación a grandes poblaciones, de las metodologías de genotipado a media y gran escala, es necesario genotipar pocos marcadores de interés en un número determinado de individuos. Uno de los métodos más empleados para el genotipado de poblaciones de tamaño medio o pequeño con un número discreto de SNPs es la tecnología HRM o *High-Resolution Melting*. Se trata de una PCR con una etapa adicional de lectura de fluorescencia de las curvas de fusión de los amplicones generados por PCR. Para registrar la lectura de fluorescencia se añade una molécula intercalante que se adhiere al ADN de cadena doble. Además, esta tecnología dispone de un sistema muy sensible de detección de variaciones de fluorescencia. La lectura de fluorescencia alcanza su máxima cuando está completamente intercalada al ADN y comienza a disminuir conforme la doble hélice empieza a desnaturalizarse por efecto del aumento de la temperatura, generándose curvas de fusión específicas de cada una de las muestras genotipadas (Reed et al., 2007; Vossen et al., 2007; Barrantes, 2014). Las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de cada uno de los productos de PCR son específicas para cada amplicón, de forma que las pequeñas variaciones en las secuencias, como los SNPs, provocan cambios en la cinética de fusión de las cadenas de ADN. Si entre los parentales que conforman una población se encuentran polimorfismos, como SNPs, podrán distinguirse empleando este método porque las curvas de fusión de cada uno de los parentales para cada primer polimórfico entre ellos será distinta. Por esta razón, para utilizar este método es necesario comparar las muestras de estudio con los controles parentales y su híbrido. Esta tecnología resulta adecuada para no demasiadas muestras y marcadores, pues el genotipado de poblaciones grandes para diversos marcadores tiene un coste alto, además de no permitir automatización y por tanto tener la limitación del tiempo.

Recientemente, se han desarrollado nuevos métodos de genotipado a partir secuenciación masiva. Estas técnicas son las más actuales y en las que se obtiene un genotipado de un alto número de marcadores mediante la secuenciación de fragmentos del genoma. Una de las principales tecnologías es el genotipado con baja cobertura de secuenciación (GBS) (Davey et

al., 2011). Durante el desarrollo de la presente tesis, después de crear la colección de líneas de introgresión empleando el genotipado Agena Bioscience iPLEX® Gold MassARRAY y HRM, se decidió llevar a cabo un genotipado con baja cobertura de secuenciación (GBS), para así poder finalizar de una forma más completa el desarrollo de las líneas de introgresión. La ventaja principal de estos métodos de genotipado basados en secuenciación son el bajo coste económico por SNP y que son aplicables tanto a especies de las que se dispone de datos de secuenciación del genoma de referencia como a especies cuyo genoma no está secuenciado. Otra de las técnicas más novedosas es el *Target genotyping*. Esta técnica es una alternativa para las técnicas de genotipado por secuenciación de todo el genoma, enfocándose únicamente en aquellas regiones diana de interés, a partir de *arrays* y de secuenciación. Utilizando la tecnología *Single Primer Enrichment Technology* (SPET), proporciona datos de secuencia, a partir de SNPs específicos para cada región de interés (Scaglione et al., 2019). Esta tecnología aporta las ventajas de ahorrar tiempo y costes al centrarse en regiones específicas y generar un conjunto de datos más reducido y manejable.

## 1.6. Desarrollo de líneas de introgresión para el mapeo de QTLs

Muchos de los caracteres de interés agronómico (rendimiento, caracteres de calidad del fruto, resistencia a estreses bióticos y abióticos, etc.) muestran una variación continua (cuantitativa), con una herencia poligénica y dependen de la acción acumulativa de muchos genes y de su interacción con el medio ambiente (Torres et al., 2012). Las regiones del genoma que incluyen genes asociados a un carácter cuantitativo se denominan QTLs (*Quantitative Trait Loci*). La complejidad de este tipo de caracteres radica en que plantas con el mismo fenotipo pueden tener alelos diferentes en uno o muchos de los genes o QTLs. Asimismo, plantas que muestran diferentes fenotipos pueden ser portadoras de los mismos alelos para estos QTLs, cuando son cultivadas en distintos ambientes. Además, las interacciones epistáticas de otros QTLs en la misma planta pueden variar el efecto de un QTL (Torres et al., 2012). Para llevar a cabo un análisis de QTLs es necesario disponer de un fenotipado exhaustivo de los caracteres de interés, así como un genotipado, lo más saturado posible, de una población segregante adecuada (F<sub>2</sub>, BC, DH, RIL, IL).

Entre las poblaciones de mayor interés para la identificación, caracterización y confirmación de la presencia de QTLs destacan las líneas de introgresión (ILs). Las ILs son un conjunto de líneas en las que se ha introgresado, en cada una de ellas, un fragmento cromosómico del parental donante de interés en un fondo genético común (parental recurrente). Las introgresiones se solapan, cubriendo el conjunto de líneas (con fondo genético del parental recurrente) todo el genoma donante. Dada la isogenicidad entre cada línea y la línea recurrente,



## Capítulo 1: Introducción general

toda la variación que exista entre ellas se atribuye a los genes de la línea donante que se encuentran en el fragmento introgresado. Además, el hecho de que las líneas sean homocigotas permite la perpetuación indefinida de cada una de las líneas y la obtención de réplicas para obtener un mejor fenotipado para el análisis de caracteres cuantitativos, teniendo en cuenta el efecto ambiental. Para obtener las ILs, se debe retrocruzar el híbrido F1, entre los dos parentales seleccionados, donante y recurrente, sobre el parental recurrente durante 5-6 generaciones, hasta obtener líneas idénticas al parental recurrente excepto en el fragmento cromosómico introgresado. Por último, los individuos se autofecundan hasta conseguir la homocigosis completa de las introgresiones.

La primera colección de ILs se obtuvo en tomate (Eshed y Zamir, 1994). Posteriormente, Tanksley y Nelson (1996) utilizaron poblaciones de retrocruce avanzado para el estudio y transferencia de QTLs también en tomate. Tras el éxito de este tipo de poblaciones para el análisis de QTLs, se adoptó este tipo de población en otros cultivos: *Brassica oleraceae* (Ramsay et al., 1996), arroz (Tian et al., 2006), cebada (Matus et al., 2003; Korff et al., 2004), lechuga (Jeuken y Lindhout, 2004), trigo (Liu et al., 2006), fresa (Urrutia et al., 2015), melocotón (Serra et al., 2016), berenjena (Gramazio et al., 2017). En melón, la primera colección de ILs fue desarrollada por Eduardo et al. (2005), utilizando como parental donante la entrada SC y como parental recurrente PS. Este parental fue seleccionado fundamentalmente porque presenta resistencia a plagas y enfermedades de etiología fúngica y viral (Garzo et al., 2002; Boissot et al., 2008). La población completa de ILs consistió en 57 líneas que cubrían el 85 % del genoma SC con un tamaño promedio de 41 cM/introgresión. La disponibilidad actual de marcadores permite acelerar enormemente este proceso, seleccionando con un set de SNPs a partir de la generación BC2 y empezando a fijar en la generación BC3. De esta forma realizando dos ciclos de cultivo al año es posible tener la colección de IL fijadas en un plazo de 3-4 años. Aunque el objetivo de su desarrollo fue derivar líneas con resistencia a las distintas plagas y enfermedades, esta primera colección de ILs se ha empleado con numerosos objetivos de mejora. Por ejemplo, Fita et al. (2008), la emplearon con el fin de estudiar caracteres relacionados con la estructura de la raíz, como por ejemplo la biomasa de la raíz y la longitud y arquitectura de la misma. Así mismo, Fernández-Trujillo et al. (2007), la utilizaron con el fin de detectar y mapear QTLs que participan en algunos caracteres relacionados con la vida postcosecha, como el pardeamiento del fruto, los daños por frío, la sobremaduración y la pérdida de sabor durante el almacenamiento entre otros. También se emplearon para el estudio de regiones genómicas implicadas en la calidad y maduración del fruto (Eduardo et al., 2007; Obando et al., 2008a; Fernández-Trujillo et al., 2011; Argyris et al., 2017; Ríos et al., 2017). Muchos de los QTLs detectados en melón se recogen en el mapa consenso de Díaz et al. (2011;

2015). Este mapa incluye QTLs asociados a caracteres de interés agronómico, y además aporta la ventaja a la comunidad científica de poder comparar la posición de determinados QTLs en diferentes poblaciones con distinto fondo genético.

En el comienzo de la presente tesis doctoral, solo existía una población de líneas de introgresión desarrollada en el fondo genético PS (Eduardo et al., 2005). Debido a que otro de los grupos varietales de mayor importancia a nivel mundial es el grupo Cantalupensis, se decidió que el fondo genético para desarrollar una nueva colección de ILs fuera VED. Este cultivar aporta un fondo genético climatérico, a diferencia de la primera colección ya mencionada. Como parental donante se seleccionó PI 420176 (*C. melo*, grupo Makuwa subgrupo ‘Yuki’) (MAK). Ambos parentales difieren en caracteres de floración y de calidad de fruto, lo que ayuda a estudiar la variabilidad genética de MAK, para el estudio de regiones genómicas relacionadas con aspectos de calidad de fruto fundamentalmente.

Recientemente, Pereira (2018) han desarrollado dos poblaciones recíprocas de ILs utilizando estos dos tipos comerciales (VED y PS) base de las anteriores ILs, con el objetivo de estudiar con profundidad las regiones implicadas en los procesos relacionados con etileno y maduración fundamentalmente (VED como climatérico y PS como no climatérico). Por último, Castro et al. (2019) han desarrollado un conjunto de ILs derivado del parental recurrente PS y el parental donante dudaim (DUD) (grupo Dudaim), con el objetivo de poder introgresar ciertas características de DUD como su particular aroma en frutos PS.

Además de las ILs, las poblaciones RILs y DHLs (doble haploides) han sido bastante empleadas para el estudio de caracteres cuantitativos en melón (Périn et al., 2002a; Perchepped et al., 2005, Cuevas et al., 2008; Fukino et al., 2008; Harel-Beja et al., 2010; Galpaz et al., 2018; Pereira et al., 2018). A diferencia de las ILs, el genoma de cada línea de la población es un mosaico de los dos parentales de partida. Son muy válidas para generar mapas genéticos y mapear caracteres de herencia simple. También son adecuadas para el análisis de QTLs, aunque su transferencia a mejora es más complicada que con las ILs.

## **1.7. Mejora de la calidad del fruto en melón**

La calidad del fruto en melón es un parámetro complejo, el cual engloba caracteres tales como el tamaño, forma, color, textura, aroma, dulzor, contenido nutricional y vida postcosecha (Burger et al., 2002; 2006; Monforte et al., 2004; Eduardo et al., 2007; Fernández-Trujillo 2007; 2011; Obando et al., 2008; Obando-Ulloa et al., 2010; Paris et al., 2008;), los cuales están controlados por múltiples genes y condicionados por factores ambientales (Fernández-Trujillo et al., 2011). La calidad del fruto de melón puede verse mermada por la susceptibilidad a plagas y enfermedades, ya que se trata de una especie altamente susceptible. Para desarrollar

## Capítulo 1: Introducción general

programas de mejora de la calidad del melón es necesario que las plantas se encuentren libres de patógenos. Por este motivo, y hasta hace relativamente poco tiempo, la mejora del melón se había orientado fundamentalmente al estudio de la resistencia a enfermedades y plagas, con el fin no sólo de mejorar o no afectar a la calidad como se ha comentado, sino también de aumentar la producción y estabilizarla. Las principales plagas y enfermedades que afectan al melón son de etiología viral y fúngica. Recientemente, Thakur et al. (2019) ha recopilado todos los genes de resistencia a enfermedades fúngicas y virales, así como a determinados insectos, indicando el cultivar que aporta dicha resistencia, haciendo una actualización del listado de genes de melón de Dogimont (2011) en relación a esta temática. Las enfermedades virales más comunes en melón son *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV), *Papaya ring spot virus* (PSRV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y *Moroccan watermelon mosaic virus* transmitidos por áfidos, *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Cucurbit vein yellowing virus* (CVYV), *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) y *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), que se transmiten por mosca blanca, *Melon necrotic spot virus* (MNSV) que se transmite por *Ospidium bornovanus* y *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMNV) que se transmite por semilla, suelos y sustratos reutilizados, agua de riego y restos vegetales, . Por otro lado, las enfermedades fúngicas más comunes son las causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*), *Monosporascus cannonballus* (Pollack & Uecker, 1974) y *Monosporascus eutypoides* (Petra) von Arx (Ben Salem et al., 2013), *Rhizoctonia solani* (Troutman and Matejka, 1970), *Rhizopycnis vagum* (Farr et al., 1998), *Acremonium cucurbitaceum* (Bruton et al., 2000), *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum* y *Pythium myriotylum* (Amann, 1989; Gubler y Grogan, 1982), y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich. La disponibilidad de una grandísima variabilidad genética dentro de la especie permite realizar cribados enfocados a la búsqueda de germoplasma tolerante o resistente a determinadas enfermedades. Este germoplasma seleccionado es un recurso esencial para el mejorador, pues permite la introgresión de dicha resistencia en genotipos de élite, manteniendo un alto porcentaje del fondo genético recurrente, sin alterar la calidad del fenotipo comercial. Los principales genes detectados relacionados con las enfermedades virales y fúngicas son: gen *cmv1* (gen de resistencia a CMV), gen *Zym* (gen de resistencia a ZYM), el gen *Cm-eIF4E* (responsable de la resistencia a MSNV) y los genes *fom-1*, *fom-2*, *fom-3*, *fom-4* (genes involucrados en la tolerancia a *Fusarium oxysporum*). De todos ellos el gen *cmv1* y *Cm-eIF4E* han sido clonados (Nieto et al., 2006; Essafi et al., 2009; Guiu-Aragónés et al., 2014; Giner et al., 2017).

Hay que tener en cuenta que, además de la susceptibilidad a plagas y enfermedades, estudios recientes han mostrado que la interacción entre portainjerto-injerto puede alterar la calidad del fruto como por ejemplo, un incremento del tamaño del fruto y de la cavidad seminal del mismo (Verzera et al., 2014; Cáceres et al., 2017), modificaciones en el color de la pulpa del fruto (Colla et al., 2006; Cáceres et al., 2017), un aumento de la vitrescencia (Rouphael et al., 2010; Jang et al., 2014), variaciones en la firmeza de la pulpa (Colla et al., 2006; Jang et al., 2014; Zhao et al., 2011), en el contenido de sólidos solubles (Cáceres et al., 2017; Verzera et al., 2014; Liu et al., 2015), en el aroma (Verzera et al., 2014) y un descenso de la firmeza de la pulpa postcosecha (Zhao et al., 2011).

Sin embargo, actualmente el mercado demanda una elevada calidad de los productos hortícolas y, por tanto, los programas de mejora incluyen muchos objetivos relacionados con la calidad. A pesar del problema de incompatibilidades en los cruces con otras *Cucumis* spp., la ventaja que tiene el melón es la gran variabilidad genética intraespecífica. Esta variabilidad está a disposición del mejorador para poder explotarla y crear nuevas variedades que, además de ser resistentes o tolerantes a determinadas enfermedades, cumplan una serie de requisitos de calidad nutricional y organoléptica que satisfagan al consumidor. La calidad del melón depende en gran medida del grupo varietal y de las demandas del mercado (Obando et al., 2008). Por ejemplo, los melones del grupo Cantalupensis deben ser aromáticos, con un elevado contenido en azúcar, mientras que los melones del grupo Ibericus, como por ejemplo el tipo PS, no son aromáticos, pero tienen mayor contenido en azúcares que los tipos Cantalupensis y mayor vida postcosecha (Fernández-Trujillo et al., 2011).

El empleo de líneas de introgresión, como se ha mencionado anteriormente, es ideal para poder introducir las características de interés en material comercial. En este sentido, el grupo de mejora genética de cucurbitáceas del COMAV está desarrollando una población de líneas de introgresión entre el parental recurrente PS y el parental donante DUD, el cual tiene la característica de presentar un aroma intenso en la maduración (Castro et al., 2019). Introducir aroma en frutos PS que carecen de aroma, por tratarse de frutos no climatéricos, resulta interesante para el consumidor y un reto para el mejorador, el cual dispone de la variabilidad genética y de las herramientas para poder crear variedades que satisfagan a la sociedad actual. Como ejemplo de mejora del melón español, por antonomasia (PS), cabe mencionar una nueva variedad que se ha lanzado al mercado recientemente: el melón ‘Sorolla’, un tipo PS con pulpa naranja y por tanto con el beneficio que aportan los  $\beta$ -carotenos ([www.intersemillas.es](http://www.intersemillas.es)).

### **1.7.1. Morfología del fruto**

La morfología del melón es un carácter complejo que abarca tanto el peso como la forma del fruto, donde los consumidores esperan morfologías específicas dependiendo del tipo de cultivar

## Capítulo 1: Introducción general

(Stepansky et al., 1999; Monforte et al., 2004). La variabilidad de formas en melón es muy alta (achatadas, redondeadas, ovaladas, elípticas y alargadas), por lo que *a priori* se pueden emplear poblaciones segregantes entre variedades con distintas formas para conseguir una morfología determinada. El tamaño del fruto, es un carácter regulado por muchos genes y con una fuerte influencia ambiental. Se han descrito muchos QTLs implicados en la forma y peso del fruto en distintos trabajos (Monforte et al., 2004; Eduardo et al., 2007; Zalapa et al., 2007; Harel-Beja., 2010; Tomason et al., 2013; Ramamurthy y Walters, 2015; Pereira, 2018). Recientemente Pan et al. (2019) establecieron 78 QTLs consenso relacionados con la morfología del fruto a partir de investigaciones previas. Además, identificaron 87 genes homologos de 8 familias génicas relacionados con la morfología del fruto, estas familias génicas son: *CNR* (*cell number regulator*), *CSR* (*cell size regulator*), *CYP78A* (*cytochrome P450*), *SUN*, *OVATE*, *TRM* (*TONNEU1 Recruiting Motif*), *YABBY* y *WOX*.

En cuanto al peso del fruto, existen numerosos trabajos que han detectado QTLs en casi todos los cromosomas con distintos fondos genéticos (Monforte et al., 2004; Eduardo et al., 2007; Zalapa et al., 2007; Harel-Beja et al., 2010). Muchos de estos QTLs están reunidos en el mapa consenso de Díaz et al., 2015. Además, Díaz et al. (2017) detectaron QTLs adicionales en los cromosomas 2, 4, 6 y 8 en una población F<sub>2</sub> obtenida a partir del cruzamiento entre PS y 'Trigonus' (*C. melo* grupo *Agrestis*, entrada Ames 24294). Recientemente, Pereira et al. (2018), también utilizando una población de RILs entre dos variedades comerciales VED y PS, detectaron dos QTLs relacionados con el peso del fruto en los cromosomas 5 y 8.

Los caracteres que afectan a la forma del fruto son la longitud y la anchura. El cociente entre estos dos caracteres se utiliza como una estimación de la forma del fruto. Eduardo et al. (2007), detectaron que las introgresiones del parental silvestre SC en el cromosoma 8 aumentaban la longitud del fruto entre un 16 y un 29 %. Por el contrario, las introgresiones en los cromosomas 4 y 8 disminuían la longitud del fruto respecto al parental recurrente PS. Del mismo modo, Harel-Beja et al. (2010) detectaron QTLs que afectaban a la longitud y por lo tanto a la forma del fruto en los cromosomas 2 y 8. Más recientemente, Díaz et al. (2014) detectaron cinco QTLs para la longitud del fruto en una población F<sub>2</sub> a partir del cruce entre PS x PI 124112 (grupo *Momordica*), dos de ellos se localizaban en la misma posición que los descritos por Harel-Beja et al. (2010), pero en distinto fondo genético, aportando una mayor solidez. Además, también se detectaron tres QTLs en los cromosomas 3, 6 y 8, los cuales se localizaban en las mismas posiciones que los descritos por Eduardo et al. (2007) en el mismo fondo genético. Recientemente, Pereira et al. (2018) detectaron distintos QTLs que afectaban al diámetro en los cromosomas 2 y 5, y a la longitud del fruto en los cromosomas 5, 6 y 11.

En cuanto al diámetro del fruto, se han detectado diversos QTLs distribuidos en la mayoría de los cromosomas (Zalapa et al., 2007; Paris et al., 2008; Harel-Beja et al., 2010; Díaz et al., 2014).

Monforte et al. (2014) y Gonzalo y Monforte (2017), recapitularon todos los QTLs más consistentes hallados hasta la fecha y llegaron a la conclusión de que muchos de los QTLs detectados para el peso y la forma del fruto se repiten en distintos fondos genéticos, definiendo 4 Meta-QTLs en los cromosomas 2, 3, 8 y 11 para el carácter peso del fruto y 5 Meta-QTLs en los cromosomas 1, 2, 8, 11 y 12 para el carácter forma del fruto. Puesto que este último carácter está altamente correlacionado con la longitud y el diámetro de los frutos, muchos de estos QTLs están colocalizados. Asimismo, los QTLs localizados en el cromosoma 2 para ambos caracteres podrían representar efectos pleiotrópicos del *gen a* (andromonoecia), ya que la expresión/no expresión de este gen determina la presencia/ausencia de estambres en las flores femeninas. Por ende, el desarrollo de estambres inhibe el crecimiento longitudinal del ovario, mostrando frutos más redondeados y achatados que aquellos que provienen de flores sin estambres. Se han identificado algunos genes candidatos que podrían explicar la variación asociada a estos QTLs. Por ejemplo, los ortólogos de los genes de tomate *SIKLUH/FW3.2* podrían ser candidatos para explicar la variación en el peso del fruto, mientras que los genes de la familia *OVATE* son los candidatos asociados a la forma del fruto (Monforte et al., 2014; Pan et al., 2019). Concretamente el gen *CmOFP13* (MELO3C025206, *ovate family proteins*) de la familia *OVATE*, localizado en el cromosoma 8, se ha demostrado que explica la variación observada en algunos cruces de melon (Wu et al., 2018; Pan et al., 2019).

### 1.7.2. Apariencia externa del fruto

La apariencia externa viene determinada por la combinación del color de la corteza, la presencia o ausencia de suturas longitudinales o costillas y el reticulado o escriturado de la corteza. Se han cartografiado genes mayores implicados en la apariencia externa, como, por ejemplo, *Stripped epicarp* (gen *st*) en el cromosoma 3 (Danin-Poleg et al., 2002), ‘*Manchas en la corteza*’ (gen *mt-2*) en el cromosoma 2 y suturas (gen *s-2*) en el cromosoma 11 (Périn et al., 2002b). Otro de los caracteres que interviene en la apariencia externa es el reticulado, para este carácter se han detectado QTLs en los cromosomas 2, 11 y 12 (Harel-Beja et al., 2010). Cohen et al. (2019) publicaron una lista de 50 genes que presentaban una expresión significativamente alterada entre melones de corteza lisa (‘Sakata Sweet’, ‘White Crenshaw’ y ‘Honeydew’) y melones con reticulado (‘Sharlyn’, ‘Hearts of Gold’ y ‘Delicious 51’).

Otro de los caracteres importantes que influencia a los consumidores es el color externo del melón, el cual presenta una amplia gama dentro de la especie, pudiendo encontrarse colores de corteza verdes, blancos, amarillos y anaranjados. Los pigmentos que confieren el color de la

corteza en melón son los carotenoides ( $\beta$ -carotenos) y clorofilas (Burger et al., 2010), en los melones verdes o naranjas. Los flavonoides son los responsables del color amarillo de la corteza (Tadmor et al., 2010). En concreto, el flavonoide naringenin chalcona es el principal flavonoide en los melones tanto de corteza amarilla como el ‘Amarillo canario’ como en otros como ‘Noy Yizre’ del grupo *Cantalupensis* o como ‘Rochet’ y ‘Tam Dew’ de los grupos *Ibericus* e *Inodorus*. Recientemente, estudios RNA-seq de una población segregante creada a partir de un set de 18 cultivares de melón representantes de cinco grupos taxonómicos y de toda la variabilidad de color de la corteza en melón reveló que la proteína F-Box que contiene el dominio Kelch, codificada por el gen *CmKFB* (MELO3C011980, *Kelch domain-containing F-Box protein*) regula negativamente la acumulación de la naringenina chalcona alterando el flujo metabólico de los flavonoides (Tadmor et al., 2010; Feder et al., 2015). Recientemente, el gen *CmKFB* ha sido clonado (Feder et al., 2015). Pereira (2018) detectaron 3 QTLs relacionados con el amarilleamiento de la corteza en los cromosomas 5, 10 (*CmKFB*) y 12. Estos autores proponen que los QTLs localizados en los cromosomas 5 y 10 podrían actuar epistáticamente regulando la biosíntesis o acumulación de flavonoides.

### **1.7.3. Apariencia interna del fruto melón**

En cuanto a la apariencia interna del melón, hay que tener en cuenta que se buscan cavidades pequeñas, sin espacios vacíos entre los carpelos, de forma que tenga un alto contenido en pulpa. Este carácter parece estar regulado por un gen mayor (*Empty cavity, Ec*), localizado en el cromosoma 2 (Périn et al., 2002a). También se han descubierto QTLs que regulan el diámetro de la cavidad seminal. Paris et al., (2008) detectaron QTLs en los cromosomas 1, 2, 5 y 11 que afectaban al tamaño de la cavidad. Correlacionado con el carácter anteriormente citado, la proporción de pulpa respecto al diámetro del fruto también es otro carácter a tener en cuenta desde el punto de vista de la mejora de la calidad y de la apariencia interna del fruto. Se han localizado QTLs en todos los cromosomas relacionados con este carácter (Díaz et al., 2015). Otros caracteres que intervienen en la apariencia interna del melón son el grosor de la corteza, la firmeza de la piel y de la pulpa, los cuales están correlacionados positivamente con la vida postcosecha y el almacenamiento. Obando et al. (2008) detectaron un QTL en el cromosoma 12 relacionado con este carácter. En cuanto a la firmeza de la pulpa, se trata de un carácter etileno dependiente que puede determinar la calidad del fruto de melón (Pech et al., 2008). Se ha observado un rápido descenso de la dureza de la pulpa en frutos climatéricos del grupo *Cantalupensis* (Rose et al., 1998). Se han descrito regiones involucradas en este carácter en los cromosomas 2, 3, 6, 7, 8, 10 y 12. (Moreno et al., 2008; Paris et al., 2008). Este carácter se explicará con más detalle en el apartado de comportamiento del fruto en la maduración.

Otro carácter de gran importancia dentro de la apariencia interna del melón es el color de la pulpa. Este carácter es independiente de la producción de etileno (Flores et al., 2001a) y está controlado por dos genes mayores: *green flesh* (*gf*) (Hughes, 1948) y *white flesh* (*wf*) (Iman et al., 1972), los cuales interactúan epistáticamente (Clayberg, 1992). Ambos genes han sido cartografiados (Monforte et al., 2004; Eduardo et al., 2007; Périn et al., 2002a; Fukino et al., 2008; Tzuri et al., 2015, Galpaz et al., 2018). La variabilidad en la intensidad del color de la pulpa también se encuentra en el germoplasma de melón, de salmón a naranja oscuro o de verde oscuro a verde claro. Recientemente, se ha clonado el gen *gf* (homólogo del gen *BoOr* en coliflor), localizado en el cromosoma 9 (MELO3C005449), responsable de la inducción de acumulación de  $\beta$ -carotenos (Burger et al., 2010; Tzuri et al., 2015). Anteriormente ya se habían detectado QTLs en la misma posición de *gf* (*CmOr*, MELO3C005449, *protein orange-orange chloroplastic*) y otros adicionales que estaban relacionados con la intensidad del color de la pulpa (Monforte et al., 2004; Eduardo et al., 2007; Cuevas et al., 2008; Harel-Beja et al., 2010; Leida et al., 2015). Por otro lado, el gen *wf* fue localizado con anterioridad en el cromosoma 8 (Monforte et al., 2004; Cuevas et al., 2008; Harel-Beja et al., 2010; Díaz et al., 2015). Recientemente, Galpaz et al. (2018) asocian el *locus wf* con *CmPPR1* (MELO3C003069, *pentatricopeptide repeat-containing family protein*) como principal gen responsable de la coloración blanca o verde. El gen *CmPPR1* codifica una familia de proteínas *PPR*. La familia de proteínas *PPR* está asociada con la edición y procesamiento post-transcripcional de genes codificados en cloroplastos y mitocondrias (Barkan y Small, 2014; Cheng et al., 2016). Zhao et al. (2019) asocian el *locus wf* con otro gen candidato MELO3C003097 (*Protein SLOW GREEN 1, chloroplastic*), situado muy cerca de *CmPPR1*.

#### 1.7.4. Comportamiento en la maduración

El melón muestra una gran diversidad de comportamientos durante la maduración, de forma que entre los melones climatéricos y no climatéricos encontramos una amplia gradación de tipos intermedios (Ezura y Owino, 2008; Saladié et al., 2015; Pereira, 2018). La cruzabilidad entre diferentes variedades o grupos de la especie, permite el desarrollo de poblaciones segregantes para poder estudiar a fondo el comportamiento en la maduración del fruto. Muchos de los caracteres relacionados con la calidad del fruto en melón están altamente relacionados con la producción de etileno y la maduración temprana, la cual podría estar controlada por multitud de genes (Pitrat, 2017). Los melones de tipo climatérico, como los del grupo *Cantalupensis*, muestran un aumento de la tasa de respiración acompañado por una síntesis autocatalítica de etileno en el inicio de la maduración (Pech et al., 2008). Se trata de un carácter que afecta directamente a la calidad del fruto y a la conservación postcosecha del mismo (Rose et al., 1998; Saladié et al., 2015). Existen muchas publicaciones enfocadas al estudio genético



## Capítulo 1: Introducción general

del proceso de maduración del melón. El primer estudio sobre el control genético de la maduración del fruto en melón se realizó empleando una población de RILs a partir del cruzamiento entre la variedad climatérica VED y la variedad no climatérica SC (Périn et al., 2002b). Se detectó que la formación de la capa de abscisión y la producción autocatalítica de etileno estaba controlado por dos *loci* independientes localizados en los cromosomas 8 y 9 (*Al-3* y *Al-4*, respectivamente). También se han localizado QTLs adicionales en los cromosomas 1, 2, 3, 6 y 11 (Moreno et al., 2008; Vegas et al., 2013). Recientemente, Ríos et al. (2017) detectaron dos QTLs en los cromosomas 3 y 6 (*eth3.5* y *eth6.3*) a partir de una colección de líneas de introgresión (Eduardo et al., 2005), entre dos parentales no climatéricos (PS x SC), donde las líneas portadoras de estas regiones, una de ellas o ambas, mostraban un comportamiento climatérico. Estudios recientes proponen que los frutos no climatéricos podrían ser mutantes en genes involucrados en la biosíntesis y señalización del etileno o en factores de transcripción similares a los definidos en tomate *CNR*, *NOR*, *RIN* (Giovannoni, 2004; Saladié et al., 2015). De hecho, mediante clonaje posicional caracterizaron el QTL *ETHQV6.3* que induce el climaterio en líneas no climatéricas, revelando que el gen *CmNOR* (MELO3C016540, *non ripening*, el ortólogo del gen *NOR* de tomate) subyace a dicho QTL.

En cuanto a los genes implicados en la ruta de la formación de etileno, hay que destacar dos familias génicas *ACS* (1-aminoácido propano-1-ácido carboxílico sintasa) y *ACO* (1-aminoácido propano-1-ácido carboxílico oxidasa). Se han detectado ocho genes de la familia *ACS* en melón (*CmACSI-8*), de las cuales el más estudiado y al que se le atribuye la responsable síntesis climatérica de etileno es el gen *CmACSI* (MELO3C021182), localizado en el cromosoma 11 (Miki et al., 1995; Yamamoto et al., 1995; García-Mas et al., 2012; Saladié et al., 2015). Respecto a la familia de genes *ACO*, se han detectado cinco variantes (*CmACO1-5*), de las cuales a *CmACO1* (MELO3C014437), localizado en el cromosoma 5, se le atribuye una mayor expresión diferencial durante el proceso de maduración (Saladié et al., 2015).

Otro de los caracteres que se ven afectados por el climaterio es la firmeza de la pulpa (Rose et al., 1998; Saladié et al., 2015), un carácter dependiente de etileno, aunque una pequeña fracción sea etileno independiente (Pech et al., 2008). Las enzimas involucradas en la degradación de la pared celular son las  $\beta$ -galactosidasas, xiloglucano hidrolasas, expansinas,  $\beta$ -xilosidasas y las poligalaturonasas (Rose et al., 1998; Saladié et al., 2006 y 2015). Las  $\beta$ -galactosidasas son las enzimas responsables de la degradación de los  $\beta$ -galactanos. Se han identificado tres genes de este tipo en melón, *CmGal1*, *CmGal2*, *CmGal3* ( $\beta$ -Galactosidase) (Nishiyama et al., 2007). Del mismo modo, Nishiyama et al. (2007) detectaron dos genes xiloglucano endotransglusilasas hidrolasas (*CmXTH1*, *CmXTH3*), que afectaban a la firmeza de la pulpa, pero cuya expresión no eran etileno dependiente y un gen expansina (*CmEXPI*) que afectaba a la firmeza de la pulpa.

Posteriormente, Leida et al. (2015) observaron que el gen *CmXTH5* (MELO3C012004) estaba localizado en la misma región que un QTL para firmeza de la pulpa en el cromosoma 10 descrito por Moreno et al. (2008).

Saladié et al. (2015) detectaron diferencias de expresión de genes *CmXIL* ( $\beta$ -*D*-xylosidasas) en el estudio transcriptómico comparativo entre los dos parentales empleados, VED y PS. En cuanto a las poligalacturonasas, se han detectado tres genes que se expresan durante la maduración del fruto, *CmPG1*, *CmPG2* y *CmPG3* (*polygalacturonases*) (Hadfield et al., 1998). De estos tres genes, la expresión de *CmPG1* es etileno dependiente y es la principal enzima modificadora de la pectina en frutos ‘Vedrantais’ (Nishiyama et al., 2007; Saladié et al., 2015), *CmPG2* es etileno independiente y *CmPG3* presenta una regulación dependiente o independiente del etileno (Saladié et al., 2015).

Otro carácter apreciado por el consumidor y relacionado con el tipo de maduración del fruto es el aroma. Se trata de un carácter etileno dependiente cuyo perfil puede verse modificado dependiendo del tipo de maduración del fruto y del tipo de cultivar. Los melones de tipo climatérico, como por ejemplo los pertenecientes al grupo *Cantalupensis*, se caracterizan por tener un fuerte aroma en la maduración, el cual está asociado a una mayor cantidad de ésteres y alcoholes que los melones no climatéricos (Shalit et al., 2001; Pech et al., 2008; Esteras et al., 2018). Este carácter, se desarrollará en profundidad en el siguiente punto debido a que uno de los objetivos de la presente tesis es la caracterización de compuestos orgánicos volátiles en una población de ILs.

### 1.7.5. Aroma

El aroma es uno de los principales caracteres que determina la calidad del melón (Beaulieu y Lea, 2006; Fallik et al., 2001; Kourkoutas et al., 2006), además de estar altamente relacionado con el sabor (Obando-Ulloa et al., 2010; Lignou et al., 2014; Tang et al., 2015). Tanto el aroma como el sabor se deben a menudo a mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). El aroma es muy diferente entre frutos climatéricos y no climatéricos, habiéndose detectado en melón alrededor de 300 compuestos volátiles (Gonda et al., 2013). Esta gran variabilidad en los compuestos volátiles puede ser debido a la gran variabilidad genética que hay dentro de la especie (Burger et al., 2006; Burger et al., 2010; Esteras et al., 2018). Obando-Ulloa et al. (2008) sugieren que la diferencia en los perfiles aromáticos está relacionada con efectos pleiotrópicos de las regiones responsables del climaterio. Freilich et al. (2015), estudiaron mediante análisis metabólicos y transcriptómicos, la relación entre el contenido en azúcares, color y aromas durante la maduración del fruto a partir de una población RILs entre la variedad ‘Dulce’ y la entrada PI 414723, concluyendo que los caracteres relacionados con la cantidad de azúcares y el color son etileno independientes, mientras que la producción de

## Capítulo 1: Introducción general

compuestos volátiles es etileno dependiente. Los principales compuestos volátiles en frutos climatéricos son los ésteres y alcoholes, mientras que para frutos no climatéricos los responsables del aroma son un bajo contenido de estos compuestos y la presencia de aldehídos, ácidos orgánicos y terpenos (Shalit et al., 2001).

La mayoría de los compuestos volátiles derivan de ácidos grasos, aminoácidos y terpenoides (Gonda et al., 2016) (Figura 4). Los principales compuestos que derivan de los ácidos grasos son los aldehídos. Las dos principales enzimas que intervienen en la formación de aldehídos a partir de ácidos grasos son las lipooxigenasas (*LOX*) y las hidroperoxido liasas (*HPL*) (Gonda et al., 2016). Actualmente, se han identificado 17 lipooxigenasas en melón (*CmLOXI-17*, *lipooxygenase*) (Zhang et al., 2014). Por el contrario, no se conoce ninguna *HPL* en esta especie (Gonda et al., 2016). Además de la contribución al aroma de los aldehídos, también son un importante precursor para la formación de alcoholes y ésteres (Schwab et al., 2008). A partir de los aldehídos, debido a la acción de las enzimas alcohol dehidrogenasas (*ADH*) se pueden convertir los aldehídos en alcoholes. Se han identificado dos genes relacionados con la formación de alcoholes en melón (*CmADH1*, MELO3C023685: *alcohol dehydrogenase medium chain zinc-binding type* y *CmADH2*, MELO3C014897: *alcohol dehydrogenase short chain type*), ambos etileno dependientes y regulados por la maduración del fruto (Manríquez et al., 2006). Del mismo modo que los aldehídos, los alcoholes contribuyen al aroma de melón (volátiles principales de los melones no climatéricos) y son el subtrato para la formación de ésteres (Gonda et al., 2016). Las enzimas que intervienen en la formación de ésteres son las alcohol acil transferasas (*AAT*), las cuales catalizan la transferencia de un grupo acilo desde un acil-CoA a un alcohol. En la actualidad se han clonado cuatro genes acil transferasas (*CmAATI-4*, *alcohol acyl transferase*), todos son etileno dependientes y regulados durante la maduración del fruto (Yahyoui et al., 2002; El-Sharkawy et al., 2005). Dependiendo del tipo de acil-CoA sintetasa se pueden producir diferentes compuestos, por ejemplo, los ésteres de acetato, se forman con acetil-CoA, mientras que los ésteres butirato y hexanoato se forman a partir de butiril-CoA y hexanoil-CoA, respectivamente.

Además de la formación de volátiles a partir de ácidos grasos, estos también se pueden generar a partir de aminoácidos. Las aminotransferasas (*AT*) son enzimas que intervienen en la formación de aldehídos a partir de aminoácidos, concretamente a partir de L-fenilalanina y aminoácidos de cadena ramificada (*BCAAS*, *branched chain amino acids*) como L-valina, L-leucina y L-isoleucina (Gonda et al., 2010; Gonda et al., 2016). A partir de la L-fenilalanina se pueden formar volátiles fenetil, como el fenilacetaldehído, mediante las enzimas *AADC* (*aromatic amino acid decarboxylase*), *PAAS* (*phenylacetaldehyde synthase*) y *ArAT* (*aromatic amino acid aminotransferase*), de esta última enzima ha sido detectado el gen *CmArAT1*

(MELO3C025613), el cual tiene una mayor expresión en frutos no climatéricos durante la maduración (Gonda et al., 2010; Gonda et al., 2018). Además de esta ruta, las enzimas *PAL* (*phenylalanine ammonia lyase*), transforman el aminoácido L-fenilalanina en ácido (E)-cinámico. A partir de este ácido se pueden obtener tres productos (fenilpropanoides, fenilpropenos y volátiles benzenoides) dependiendo de las enzimas que intervengan. Para la formación de fenilpropanoides, como el eugenol, intervienen las enzimas *4CH* (*(E)-cinnamic acid 4-hydroxylase*), *4CL* (*p-coumaric acid coenzyme A (CoA) ligase*) y *CCR* (*cinnamoyl-CoA reductase*). Por otro lado, para la formación de volátiles fenilpropenos intervienen las enzimas *CNL* (*(E)-cinnamic acid CoA ligase*) y *CCR*. Recientemente se ha detectado en melón el gen *CmCNL* (MELO3C025110, *CoA ligase*) responsable de la formación de ácido (E)-cinámico en (E)-cinnamoyl CoA (Gonda et al., 2018). A partir de este sustrato además de derivar en fenilpropenos también pueden generarse fenilpropanos y volátiles benzenoides. Para la síntesis de este último están implicadas las enzimas *BAMT* (*benzoic acid: S-adenosyl-L-methionine carboxyl methyltransferase enzyme*). Gonda et al. (2018) describieron el gen *CmBAMT* (MELO3C003803, *jasmonate O-methyltransferase*) el cual codifica una proteína que genera benzoato de metilo. Por otro lado, a partir de los aminoácidos de cadena ramificada también pueden formarse aldehídos mediante las enzimas *BCAT* (*branched-chain amino acid aminotransferase*). Gonda et al. (2010) detectaron el gen *CmBCAT1* (MELO3C010776) relacionado con la síntesis de aldehídos derivados de aminoácidos, el cual tiene una mayor expresión en frutos no climatéricos durante la maduración. Por último, el aminoácido L-metionina puede servir de sustrato para la formación de C2 tioéter ester, sulfuros, tioésteres, 2-metil butanoato ester y propanoato ester a partir de la enzima *MGL* (*L-methionine-γ-lyase*) y C3-tioéter ester a partir de *MetAt* (*methionine aminotransferase*).

Los apocarotenos son compuestos volátiles derivados de carbohidratos, los cuales son sintetizados a partir de varios terpenoides (farnesil pirofosfato y geranylgeranyl pirofosfato). Mediante la actividad enzimática de las terpeno sintasas (*TPS*) se obtienen los monoterpenos y sesquiterpenos. Portnoy et al. (2008), a partir de un estudio de biosíntesis de terpenoides en variedades climatéricas, identificaron los genes *CmTpsDul* (MELO3C016595; *sesquiterpene synthase*) y *CmTpsNY* (MELO3C016588; *sesquiterpene synthase*). Ambos genes son sesquiterpeno sintasas que se sobreexpresan en el exocarpo del fruto maduro en las variedades ‘Dulce’ y ‘Noy Yizre’el’. Por otro lado, la enzima fitoeno sintasa (*PSY*) convierte el geranylgeranyl en fitoeno. Actualmente, se han estudiado tres genes fitoeno sintasa *CmPSY1-3* (Saladié et al., 2015). A partir del fitoeno, mediante las enzimas Z-caroteno desaturasa (*ZDS*), fitoeno desaturasa (*PDS*) (*CmPDS*) y carotenoide isomerasa (*CRTISO*) (*CmCRTISO1*) producen licopeno (Saladié et al., 2015). Del licopeno se obtiene los  $\alpha$  y  $\beta$ - carotenos mediante

*Capítulo 1: Introducción general*

las enzimas  $\epsilon$  y  $\beta$  ciclasas. La ruptura oxidativa de los carotenoides fitoeno, licopeno y  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno mediante la enzima dioxigenasa de ruptura de carotenoides (*CCD*) producirá apocarotenoides. Ibdah et al. (2006) identificaron el primer gen responsable de la formación de apocarotenos (*CmCCD1*, MELO3C023555; *carotene cleavage dioxygenase*), mostrando que la expresión de este gen se incrementaba durante la maduración del fruto.

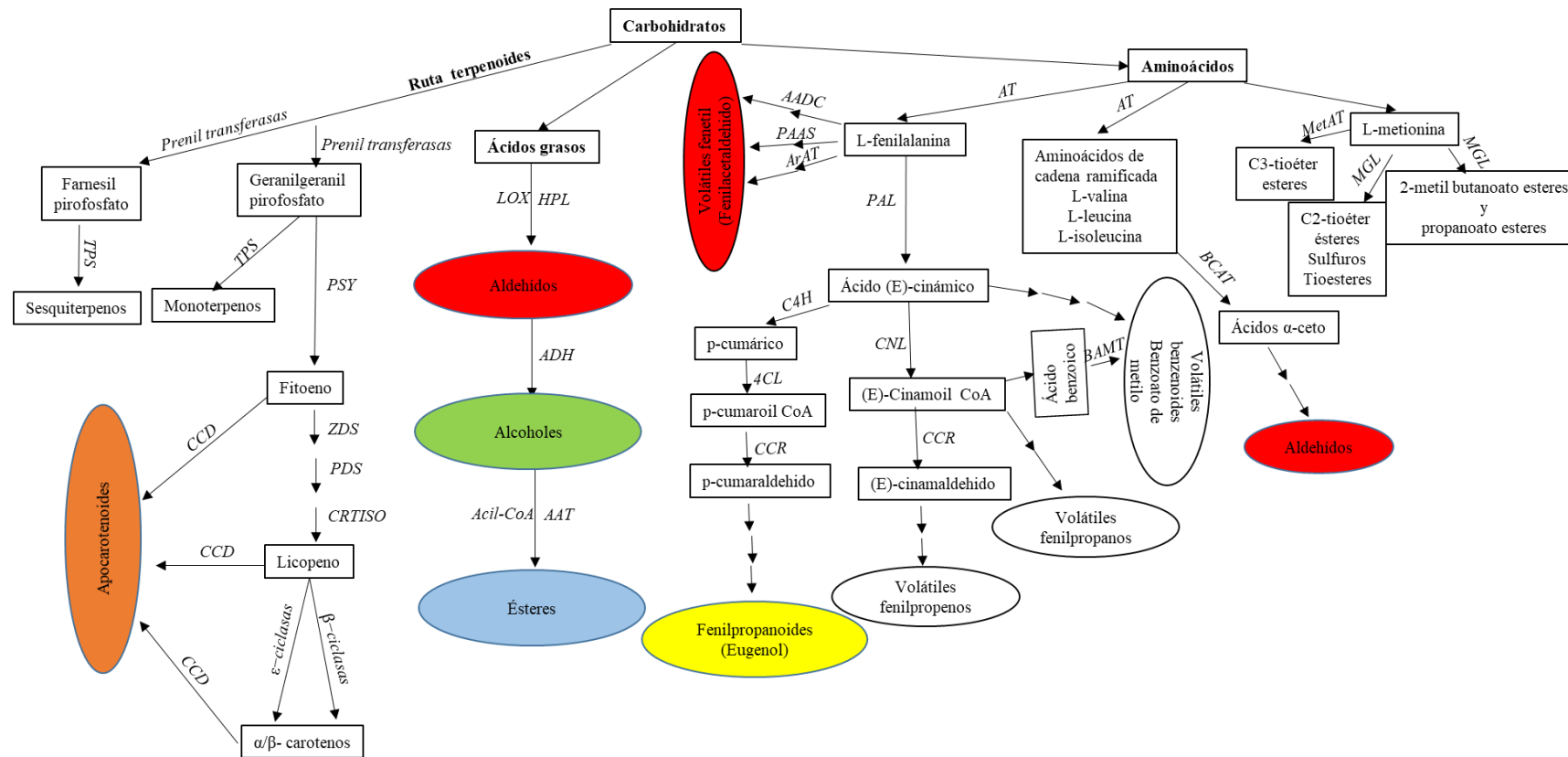


Figura 4. Esquema de las principales rutas de síntesis de apocarotenoides, aldehídos, alcoholes y ésteres, a partir de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los nombres de las enzimas en cursiva: *TPS*, terpeno sintasa; *PSY*, fitoeno sintasa; *ZDS*, Z-caroteno desaturasa; *PDS*, fitoeno desaturasa; *CRTISO*, caroteno isomerasa, *CCD*, dioxigenasa de ruptura de carotenoides; *LOX*, lipooxigenasa; *HPL*, hidroperóxido liasa; *ADH*, alcohol deshidrogenasa; *AAT*, alcohol acil transferasa; *AT*, aminotransferasas; *AADC*, aminoácido aromático descarboxilasa; *PAAS*, fenilacetaldehído sintasas; *ArAT*, aminoácido aromático aminotranferasa *PAL*, fenilalanina amoniaco liasa; *C4H*, cinamato 4-hidroxilasa; *4CL*, ácido p-courámico coenzima A (CoA) ligasa; *CCR*, cinamoil-CoA reductasa; *CNL*, ácido (E)-cinámico CoA ligasa; *BAMT*, ácido benzoico S-adenosil-L-metionina carboxyl metiltransferasa; *BCAT*, aminotransferasa de aminoácido de cadena ramificada; *MGL*, L-metionina  $\gamma$ - liasa; *MetAT*, metionina aminotransferasa. Adaptado de Schwab et al., 2008; Gonda et al., 2013; Ríos, 2015; Gonda et al., 2016.

### 1.7.6. Contenido en sólidos solubles y ácidos orgánicos

La variabilidad existente en contenido de azúcares en melón es muy amplia, con rangos de grados Brix de 3 a 5 en melones no dulces y de 10 a 18 en melones dulces (Stepansky et al. 1999; Burger y Schaffer 2007; Burger et al., 2010). La mayoría de melones con alto contenido en azúcares pertenecen a la subespecie *melo*, aunque también hay melones con alto contenido en azúcares de la subespecie *agrestis* (Burger et al., 2006). La creación de las líneas de introgresión que se expone en la presente tesis, se enmarca en el proyecto *SAFQIM: PIM2010PKB-00691 (Sugars and Fruit Quality in Melon)*, financiado por el Ministerio de Economía y Empresa, MINECO, con fondos FEDER), en el que se propuso la generación de nuevo material vegetal para explotar la variación natural de la especie en el contenido en azúcares. Por este motivo, el parental donante escogido fue ‘Ginsen makuwa’ perteneciente al grupo Makuwa, el cual presenta dentro del subgrupo *agrestis* uno de los contenidos en sólidos solubles más elevados.

La acumulación de azúcares se trata de un carácter independiente de la producción de etileno (Flores et al., 2001b; Obando-Ulloa et al., 2009, Pech et al., 2008). Los tres principales azúcares en la pulpa del melón son la glucosa, fructosa y sacarosa, siendo esta última la que mayor peso aporta al dulzor del melón (Stepansky et al., 1999). El incremento de azúcares totales durante la maduración del fruto se debe principalmente a la acumulación de azúcares durante la etapa final del desarrollo del fruto (Gur et al., 2017). Saladié et al. (2015), observaron que, tanto para variedades climatéricas como no climatéricas, la evolución de estos azúcares es similar. Los niveles de fructosa y glucosa no presentaban una amplia variación durante el desarrollo y la maduración del fruto, mientras que los niveles de sacarosa se incrementaban cuando el fruto comenzaba a madurar hasta alcanzar sus niveles máximos cuando el fruto estaba maduro.

Por otro lado, aunque la evolución durante la etapa de maduración sea similar entre variedades climatéricas y no climatéricas, existen diferencias en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de azúcares dependiendo del tipo de maduración del fruto. La acumulación de sacarosa está controlada por un gen mayor recesivo *sucrose* (*gen suc*) presente en las variedades de melón dulce, aunque su control genético parece ser complejo, habiendo otros *loci* involucrados, y este carácter es difícil de evaluar porque presenta una fuerte influencia ambiental (Burger et al., 2002).

Las principales enzimas relacionadas con el metabolismo de la sacarosa son la sacarosa sintasa (*SS, sucrose synthase*), sacarosa fosfato sintasa (*SPS, sucrose phosphatesynthase*), las invertasas (*INV, invertases*) y las  $\alpha$ -galactosidasas (*AGAL*) (Burger y Schaffer, 2007; Dai et al., 2011). Conocer el balance entre las actividades de descomposición de la sacarosa (*INV* y *SS*) y la síntesis de sacarosa (*SPS*), determina la acumulación neta de sacarosa (Burger y Schaffer,

2007). Un estudio de comparación entre una variedad climatérica (VED) y una no climatérica (PS) muestra una expresión diferencial del gen  $\alpha$ -galactosidasa durante el desarrollo del fruto entre ambos frutos, mientras que el gen sacarosa fosfato sintasa no mostró esta expresión diferencial durante el desarrollo del fruto (Saladié et al., 2015). El mismo estudio también detectó que la expresión del gen *CmINV* (*soluble acid invertase*, MELO3C005363) fue casi 10 veces mayor en VED que en PS, de forma que podría limitar la acumulación de sacarosa durante la maduración y contribuir a un rápido descenso durante la postcosecha. Del mismo modo, el catabolismo de la invertasa podría disminuir el dulzor del fruto y ser utilizado para la producción de ácidos orgánicos, como el malato, que provoca un sabor desagradable en los frutos (Saladié et al., 2015).

Existen numerosos estudios en los que se identifican regiones genómicas relacionadas con el contenido en azúcares en melón. Monforte et al. (2004), localizaron QTLs en los cromosomas 1, 2, 4 y 8. Posteriormente, Eduardo et al. (2007) observaron 19 NILs que mostraban diferencias significativas respecto el parental recurrente, de las cuales dos mostraron una alteración del contenido en sólidos solubles. Las introgresiones de estas líneas estaban situadas en los cromosomas 1 y 3. Del mismo modo, Obando-Ulloa et al. (2009) detectó una serie de QTLs en los cromosomas 3, 5, 6, 7 y 11 que afectaban al contenido en sólidos solubles. En otros fondos genéticos, Paris et al. (2008), detectaron QTLs en los cromosomas 1, 2, 6, 7, 8, 9 y 10 que afectaban al contenido de sólidos solubles. Por otro lado, Park et al. (2009), a partir de una población F<sub>2</sub>, empleando los parentales ‘Deltex’ (grupo Ameri) x ‘TGR 1551’ (grupo Momordica), observaron QTLs en los cromosomas 2, 3, 4, 6 y 11 relacionados con el contenido en sólidos solubles, sacarosa, fructosa y glucosa. Gracias a la enorme variabilidad genética para el contenido en azúcares, Leida et al. (2015) describieron la estructura genética de 175 entradas de melón, representando la variabilidad fenotípica de la especie, y realizaron un análisis de asociación entre la los polimorfismos y el contenido en azúcar. Recientemente, Argyris et al. (2017) utilizaron varias poblaciones generadas a partir de PS y ‘Ames 24294’ (*C. melo* grupo Agrestis) para realizar un análisis de QTLs relacionados con el contenido en azúcares y ácidos orgánicos, observando QTLs en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12, relacionados con el contenido en azúcares, en los cromosomas 2, 3, 4, 5 y 8 relacionados con el contenido en sacarosa, en los cromosomas 5, 6, 7, 8 y 11 relacionados con el contenido en fructosa y en los cromosomas 4, 5, 6, 7, 8 y 11 relacionados con el contenido en glucosa. Por último, Pereira (2018) detectaron QTLs que afectaban al contenido de sólidos solubles en los cromosomas 8, 9 y 10. Existe una amplia complejidad genética del control de acumulación de azúcares, estudios transcriptómicos muestran la interacción de una amplia red de 50 genes involucrados en la acumulación de sacarosa (Dai et al., 2011; Zhang et al., 2016). Aun así, hay algunas



regiones que se detectan de forma consistente, como el QTL localizado en el cromosoma 5 bastante estable entre estudios, años y fondos genéticos (Monforte et al., 2004; Eduardo et al., 2007; Paris et al., 2008 y Obando-Ulloa et al., 2009). Dentro de esta región se localiza el gen MELO3C014519 (*BEL1-like homeodomain protein*) candidato de interés que parece estar involucrado en el control de la acumulación de azúcares.

La acidez, junto al dulzor, es un carácter que determina la calidad del melón. Los grupos Flexuosus y Acidulus son los más ácidos en comparación con los melones dulces (Gonzalo y Monforte, 2017). La acidez está controlada por el *gen* dominante *So* (*Sour*), localizado en el cromosoma 8, de expresión etileno independiente (Kubicki, 1962; Burger et al., 2002; Harel-Beja et al., 2010; Sherman et al., 2013), y recientemente clonado (*CmPH*, MELO3C025264, *auxin efflux carrier family protein*) como responsable del *So* (Cohen et al., 2014). La acidez del melón es atribuida en gran medida a los ácidos málico y cítrico. Un estudio reciente detectó QTLs en los cromosomas 2, 8 y 11 que afectaban al contenido de ácido málico y en los cromosomas 8 y 10 que afectaban al ácido cítrico (Argyris et al., 2017).

## **1.8. Estructura de la presente tesis doctoral**

La presente tesis doctoral es una recopilación de dos artículos publicados y un artículo en vías de publicación. Estos trabajos han sido realizados por el grupo de Mejora Genética de Cucurbitáceas del COMAV de la Universitat Politècnica de València (UPV), liderado por las doctoras Belén Picó y Cristina Esteras. Además, durante el transcurso de la presente tesis se ha requerido de la colaboración de otros grupos, entre ellos, el grupo de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP-CSIC de la UPV, liderado por el doctor Antonio J. Monforte, el grupo de Biologie du Fruit et Pathologie and Plateforme Métabolome, INRA-Bordeaux (Francia), liderado por el doctor Yves Gibon, los grupos del COMAV-UPV y de la UJI-UPV (Unidad Mixta de Investigación en Mejora de la Calidad Agroalimentaria), liderados por los doctores Jaime Cebolla y Salvador Roselló, respectivamente, y el grupo del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA), de Universitat Jaume I, liderado por el doctor Joaquín Beltran.

La tesis está estructurada entre capítulos, además de la introducción y la discusión general. En todos ellos, se pretende estudiar la variabilidad intraespecífica del melón, concretamente de la entrada PI 420176 (perteneciente al grupo Makuwa), siempre desde el punto de vista de la mejora de la calidad del fruto. El primer capítulo constituye un artículo publicado en la revista *BMC Plant Biology*. Por un lado, aborda la descripción de la formación de una colección de 27 líneas de introgresión, a partir del cruce entre un melón cultivado tipo ‘Charentais’, cultivar ‘Vedrantais’ (VED) (subsp. *melo*, grupo Cantalupensis) y la entrada japonesa ‘Ginsen Makuwa’ PI 420176 (subsp. *agrestis*, grupo Makuwa, sub-grupo ‘Yuki’). Por otro lado, aborda el análisis

de QTLs asociados a caracteres de floración y calidad del fruto en tres ambientes. Para realizar el análisis de QTLs, se han empleado los datos de fenotipado asociados a caracteres de calidad del fruto, y estrategias de genotipado de densidad media y alta. Los resultados obtenidos muestran las regiones genómicas implicadas en la variación de cada uno de los caracteres de interés agronómico estudiados, y en algún caso se proponen genes responsables de la variación observada en estos caracteres. Así mismo, como resultado de este trabajo se presentan algunas ILs con características de interés como material premejora para la diversificación del mercado de los melones tipo ‘Vedrantais’.

El segundo capítulo consiste en un artículo publicado en la revista *HortScience*, el cual describe una línea de mejora derivada de esta población (MAK\_10-1), con maduración tardía, ausencia de capa de abscisión y aroma externo, incremento de la firmeza de la pulpa y del contenido de sólidos solubles. Para realizar este estudio se cosecharon los frutos VED y MAK\_10-1 secuencialmente a diferentes días después de la polinización. Los frutos se fenotiparon del mismo modo descrito en el primer capítulo y fueron analizados sus azúcares (sacarosa, glucosa fructosa) y ácidos (cítrico, málico y glutámico). Los resultados obtenidos muestran el efecto de la introgresión de MAK\_10-1 sobre los caracteres anteriormente citados y se discute su posible uso en el desarrollo de nuevos cultivares.

Por último, el tercer capítulo consiste en el análisis preliminar de compuestos orgánicos volátiles en dos ambientes, de 25 de las líneas de introgresión citadas en el primer capítulo. Los resultados muestran los efectos de las introgresiones del parental donante del grupo Makuwa sobre la síntesis de 57 compuestos detectados. Este capítulo se encuentra en fase de preparación y se pretende publicar en la revista *Food Chemistry*.



## **OBJETIVOS**



## **OBJETIVO GENERAL**

Utilizar la diversidad genética del grupo Makuwa, Subgrupo ‘Yuki’ de *Cucumis melo* subsp. *agrestis* (uno de los grupos de melones orientales de mayor interés por sus parámetros de calidad del fruto y su distancia genética a los melones occidentales), para incrementar el conocimiento genético de la especie y para la mejora de melones del grupo *Cantalupensis* (*C. melo* subsp. *melo*).

### **Objetivos específicos**

- 1) Caracterización de una nueva colección de líneas de introgresión, utilizando la entrada PI 420176 ‘Ginsen makuwa’ como parental donante y el cultivar francés ‘Vedrantais’ de tipo ‘Charentais’ como parental recurrente.
- 2) Utilización de la colección de ILs para identificar regiones genómicas del grupo Makuwa involucradas en la calidad del fruto.
- 3) Identificación y caracterización de ILs de interés agronómico, como la IL MAK\_10-1, con maduración retrasada y larga vida post cosecha.
- 4) Utilización de la colección de ILs para el estudio del aroma del melón.



**CAPÍTULO 2: A NEW GENOMIC LIBRARY OF  
MELON INTROGRESSION LINES IN A  
CANTALOUPE GENETIC BACKGROUND FOR  
DISSECTING DESIRABLE AGRONOMICAL  
TRAITS**





## **CAPÍTULO 2: A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits.**

Este capítulo consiste en la descripción de una colección de 27 líneas de introgresión que representa la mayoría del genoma de la entrada PI 420176 de *C. melo* subsp *agrestis* grupo Makuwa (MAK), introgresada en homocigosis en el fondo genético recurrente del cv Vedrantaís un tipo Cantalupo ‘Charentais’. Las líneas se evaluaron en tres ensayos para diferentes parámetros de calidad del fruto, con el objetivo de estudiar la estabilidad y respuesta fenotípica de las regiones genómicas introgresadas de MAK. Este capítulo se publicó en la revista *BMC Plant Biology*.

Este trabajo se llevó a cabo en el marco del Programa de Valorización y Recursos Conjuntos de I+D+i de VLC/CAMPUS financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte como parte del Programa Campus de Excelencia Internacional. La generación de ILs, así como el genotipado y fenotipado de las líneas, fue financiada por el proyecto Plant KBBE project (SAFQIM: SUGARS AND FRUIT QUALITY IN MELON PIM2010PKB-00691, del Ministerio de Ciencia e Innovación), y por los proyectos AGL2012-40130-C02-02 y AGL2014-53398-C2-2-R del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), todos cofinanciados con fondos FEDER.

En el marco de estos proyectos el trabajo se llevo a cabo por el grupo de Mejora genética de Cucurbitaceas del COMAV en colaboración con el grupo de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP-CSIC de la UPV, liderado por Antonio J. Monforte y el grupo de Biologie du Fruit et Pathologie and Plateforme Métabolome, INRA-Bordeaux (Francia), liderado por Yves Gibon.



## **CAPÍTULO 2: A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits.**

Gorka Perpiñá<sup>1</sup>, Cristina Esteras<sup>1</sup>, Yves Gibon<sup>2</sup>, Antonio J Monforte<sup>3</sup>, Belén Picó<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad, Universitat Politècnica de València (COMAV-UPV). Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

<sup>2</sup> UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie and Plateforme Métabolome, INRA-Bordeaux and Bordeaux University, 71 av. Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon, France.

<sup>3</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) UPV-CSIC, Ciudad Politécnica de la Innovación Edificio 8E, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain.

Referencia: Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A. J., & Picó, B. (2016). A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits. *BMC plant biology*, 16(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0842-0>

### **2.1. Abstract**

**Background:** Genomic libraries of introgression lines (ILs) consist of collections of homozygous lines with a single chromosomal introgression from a donor genotype in a common, usually elite, genetic background, representing the whole donor genome in the full collection. Currently, the only available melon IL collection was generated using ‘Piel de Sapo’ (var. *inodorus*) as the recurrent background. ILs are not available in genetic backgrounds representing other important market class cultivars, such as *cantalupensis*. The recent availability of genomic tools in melon, such as SNP collections and genetic maps, facilitates the development of such mapping populations.

**Results:** We have developed a new genomic library of introgression lines from the Japanese cv. Ginsen Makuwa (var. *makuwa*) into the French ‘Charentais’-type cv. Vedrantaís (var. *cantalupensis*) genetic background. In order to speed up the breeding program, we applied medium-throughput SNP genotyping with Sequenom MassARRAY technology in early backcross generations and High Resolution Melting in the final steps. The phenotyping of the backcross generations and of the final set of 27 ILs (averaging 1.3 introgressions/plant and covering nearly 100 % of the donor genome), in three environments, allowed the detection of stable QTLs for flowering and fruit quality traits, including some that affect fruit size in

## *Capítulo 2. Introgression Lines*

chromosomes 6 and 11, others that change fruit shape in chromosomes 7 and 11, others that change flesh color in chromosomes 2, 8 and 9, and still others that increase sucrose content and delay climacteric behavior in chromosomes 5 and 10.

Conclusions: A new melon IL collection in the ‘Charentais’ genetic background has been developed. Genomic regions that consistently affect flowering and fruit quality traits have been identified, which demonstrates the suitability of this collection for dissecting complex traits in melon. Additionally, pre-breeding lines with new, commercially interesting phenotypes have been observed, including delayed climacteric ripening associated to higher sucrose levels, which is of great interest for ‘Charentais’ cultivar breeding.

Keywords: Melon, Introgression Line, Charentais, Fruit quality, Soluble solids concentration, QTLs.

### **2.2. Background**

Melon (*Cucumis melo* L.,  $2n = 2x = 24$ ) is one of the most economically important fruit crops worldwide, with a current total world production of over 29 million tons (FAOSTAT, 2015). For that reason, the development of new cultivars, not only with higher yields, but also with higher fruit quality standards and with attractive traits for consumers, is essential. Over the last few decades, biotechnological strategies have become indispensable tools for modern and efficient breeding in this crop.

Several transcriptome sequencing projects have been carried out in melon using Next Generation Sequencing (NGS) technologies in a set of genotypes representing the diversity of the species (Blanca et al., 2011; 2012). The data generated have enabled the identification of large SNP (Single Nucleotide Polymorphism) and SSR (Single Sequence Repeats) collections (available at the ([www.melogene.upv.es](http://www.melogene.upv.es))), which have facilitated the construction of consensus saturated maps (Díaz et al., 2011; 2015). Some of these collections have been implemented in high-throughput genotyping platforms and have been used for genetic diversity and association studies (Esteras et al., 2013; Leida et al., 2015). Some of these markers have also been used to anchor genetic and physical maps on the melon genome sequence (García-Mas et al., 2012; Argyris et al., 2015a). Other genomic tools available for melon research and breeding include microarrays (Mascarell-Creus et al., 2009; Roig et al., 2013) as well as TILLING and EcoTILLING platforms (Nieto et al., 2007; Esteras et al., 2009; González et al., 2011). These tools have allowed the genetic dissection of both simple and complex traits (Périn et al., 2002a; Monforte et al., 2004; Eduardo et al., 2007; Cuevas et al., 2008; Fita et al., 2008; Harel-Beja et al., 2010; Vegas et al., 2013; Díaz et al., 2014; Boualem et al., 2015).

In this context, introgression line (IL) generation is an excellent breeding strategy for incorporating exotic natural variation into modern breeding programs. ILs are generated by backcrossing, starting from an F1 cross between one selected donor genotype, usually exotic or wild germplasm, and a common genetic background, usually an elite cultivar. Marker-assisted selection (MAS) of lines with target-donor introgressions and recurrent genetic background is performed in each generation (Zamir; 2001). The existing genomic tools and the use of genotyping platforms highly increases the efficiency of MAS, significantly reducing the number of backcross generations necessary to generate a collection of ILs that have single introgressions and which represent the entire donor genome (Barrantes et al., 2014). Apart from the introduction of new variability into crops for breeding purposes, ILs also facilitate the detection of new QTLs. ILs have been developed in many crops, such as tomato (Eshed and Zamir, 1994; Chetelat and Meglic, 2000; Monforte and Tanksley, 2000; Barrantes et al., 2014), barley (Von Korf et al., 2004), lettuce (Jeuken and Lindhout, 2004) and rice (Tian et al, 2006), among others.

Melon is the most polymorphic cucurbit species (Kikbride, 1993; Esteras et al., 2011), showing impressive diversity in important commercial traits, such as fruit morphology, ripening behavior and organoleptic and nutritional fruit quality. *C. melo* is subdivided into two subspecies: subsp. *melo* and subsp. *agrestis*, which can be further divided into 16 botanical groups (Pitrat, 2008): *inodorus*, *cantalupensis*, *reticulatus*, *ameri*, *chandalack*, *adana*, *flexuosus*, *chate*, *dudaim* (within subsp. *melo*); and *acidulus*, *conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *momordica*, *chito* and *tibish* (the latter two of which have been reclassified according to molecular studies to be within the subsp. *Agrestis* (Esteras et al., 2013; Leida et al., 2015)).

The most important commercial cultivars belong to the *inodorus*, *reticulatus* and *cantalupensis* groups, while cultivars belonging to the subsp. *agrestis* are considered “exotic” for applied breeding. The only IL collection reported in melon to date was derived from the cross of the Spanish cultivar Piel de Sapo (subsp. *melo* var. *inodorus*) and the Korean donor accession PI 161375 (Songwan Charmi; subsp. *agrestis* var. *chinensis*), which carries several pest- and disease-resistant genes (Eduardo et al., 2005). This first IL population has been used for different breeding purposes: root structure-related traits (Fita et al., 2008), fruit quality, including fruit weight, shape and flesh color (Eduardo et al., 2007; Fernández-Silva et al., 2008a), sugar and organic acid content (Obando-Ulloa et al., 2009), aroma profile (Obando-Ulloa et al., 2011), climacteric behavior (Obando et al., 2008a; Vegas et al., 2013) and resistance to pathogens, such as Cucumber Mosaic Virus (CMV) (Essafi et al., 2009; Guiu-Aragonés et al., 2014).

## Capítulo 2. Introgression Lines

However, until now there have been no melon ILs generated in a *cantalupensis* genetic background. In the current article, we report the development of a new IL population derived from the cross between the French cultivar Vedrantaís (VED), a Charentais type, as recurrent parent (subsp. *melo* var. *cantalupensis*) and the Japanese Ginsen makuwa (MAK) cultivar (subsp. *agrestis* var. *makuwa*). This donor genotype was selected from the melon core collection built in the framework of a previous project (MELRIP 2007-2010) (Esteras et al., 2009; Esteras et al., 2013) due to its interesting quality traits, especially its higher sugar content compared to most *agrestis* types (Leida et al., 2015). The IL population has been used to identify QTLs related to fruit morphology, ripening behavior and organoleptic and nutritive quality. It also provides pre-breeding lines with new phenotypes in a Charentais genetic background that could be useful for the development of new cultivars.

### 2.3. Results and Discussion

#### 2.3.1. Development of the IL population

The two parents used to generate the IL population were the cultivar Vedrantaís (VED) (*C. melo* subsp. *melo* var. *cantalupensis*, Charentais type) as recurrent parent and Ginsen makuwa (MAK) (*C. melo* subsp. *agrestis* var. *makuwa*) as donor parent (Additional file 1). Fifteen BC1 plants derived from the cross VED x MAK were backcrossed to the recurrent parent, thus producing fifteen BC2 families, each one with twenty eight plants. The 420 BC2 seedlings were genotyped with the Sequenom array with 154 SNPs (Blanca et al., 2012; Garcia-Mas et al., 2012; Leida et al., 2015), from nine to twenty per chromosome (Additional File 2). Seventy-five BC2 seedlings with the highest proportion of the recurrent (VED) genome and with MAK introgressions covering the entire donor genome were selected. These BC2 were transplanted to the greenhouse for phenotyping and twenty-two of them were backcrossed to VED in order to generate the BC3 population. This BC2 set averaged 6.5 introgressions/plant and 88.2 % of the VED background genome (ranging from 76.2-96.3 %), representing twice the entire MAK genome.

A total of 363 seedlings of the BC3 population were genotyped with the same Sequenom array. One hundred BC3 seedlings were selected according to their genotype (following the same criteria as in the BC2) and were transplanted to the greenhouse for phenotyping. Thirty-three were selected and used to generate the IL population. These selected BC3 plants presented an average of 3.4 introgressions/plant and 93.2 % of the VED background genome (range 84.1 – 98.2 %). The early selection in a large number of plants greatly facilitated the recovery of the recurrent genetic background (an average increase of 5 %), and the reduction of the number of introgressions per plant (to about 3) in one backcross generation.

Twenty-four of the selected BC3 plants had three or fewer MAK introgressions/plant. These were selfed to produce the BC3S1 generation. After BC3S1 seedling screening with appropriate SNP markers, it was possible to obtain single homozygous MAK introgression genotypes in most cases. Ninety-six BC3S1 plants were selected according to their genotype and transplanted to the greenhouse for phenotyping. A second round of selfing (generation BC3S2) was necessary in some cases to fix certain heterozygous markers and generate enough seeds for further assays.

The remaining nine selected BC3 plants had four or more introgressions, so they were used to produce an additional backcross generation (BC4). Thirty four BC4 plants with single or double introgressions were then selected and selfed once or twice to produce BC4S1 and BC4S2 plants with single or double MAK homozygous introgressions. The selection of plants with homozygous target introgressions in all these generations (BC3S1, BC3S2, BC4, BC4S1 and BC4S2) was carried out with the SNPs of the corresponding introgressions by High Resolution Melting.

A first core collection of 27 ILs, mostly with a single introgression and a few with double introgressions, all homozygous, representing most of the MAK genome (Additional File 3), were subjected to further phenotyping in three trials, along with the VED and MAK parents and their F1. This set represents the MAK genome quite well, and has an appropriate size for performing accurate phenotyping with climacteric fruits. This IL collection has an average of 1.3 introgression/IL, representing 95.4 % of the VED background genome (range 89.8 – 99.1 %). A total of 37 bins were defined with an average of 2.8 bins/chromosome. The average size of the introgressions was 30 cM. Some regions of the MAK genome in chromosomes 1, 4, 5, 7 and 8 were not represented (10 %) (Additional file 3).

### **2.3.2. Parent phenotypes**

The two parents showed clear differences in a number of traits related to flowering time, fruit morphology, fruit ripening behavior and traits related to organoleptic and nutritive value, such as flesh color and sugars content. Additional File 4 depicts the mean values and standard deviations, along with ANOVA results for means comparison of both parents, VED and MAK, and their F1 for each studied trait in the three trials in which they were phenotyped along with the ILs. MAK showed earlier and more female flowering than VED plants (with an average across environments of 3.6 versus 1.6 female flowers per plant 30 days after the opening of the 1<sup>st</sup> flower, NFeF30), but no differences were observed for the male flowering pattern (8.5 versus 7.5 male flowers per plant, NMaF30). VED fruits were significantly heavier (average Fruit weight (FW) 755.9 g) than MAK fruits (243.9 g), which yielded more elongated fruits with higher percentages of seminal cavity (Fruit shape (FS) 1.1 versus 0.92, and seminal cavity/fruit



## Capítulo 2. Introgression Lines

diameter ratio (CW) 0.61 versus 0.45, respectively for MAK and VED). The formation of an abscission layer at the time of ripening (AL) and the occurrence of external aroma in mature fruits (AR) were present in VED and absent in MAK, these being indicators of the climacteric behavior of the Charentais type. Differences in other traits, such as rind thickness (RTh, 4.2 mm versus 1.7 mm in VED and MAK, respectively) and rind netting (Net, present in VED and absent in MAK) were also observed (Additional File 4). Regarding the traits related to flesh quality, VED is orange-fleshed, whereas MAK is white-fleshed (Additional File 1), with different values for the colorimeter parameters, such as higher luminosity Hl, negative  $a^*$  values and lower  $b^*$  values in the MAK parental (FCHI 64.7, FCa -2.2, FCb 10.6 versus FCHI 53.6, FCa 11.1 and FCb 23.8, in MAK and VED, respectively) (Additional File 4). Both parents are sweet melons, with similarly high soluble solids content (SSC) in the fruits (11.2° versus 11.7° brix degrees for VED and MAK, respectively) and similar amounts of sucrose and fructose, but with significantly lower levels of glucose in the MAK fruits (Suc 248.2, Gluc 85.9 and Fruc 87.5 versus Suc 232.7, Gluc 46.0 and Fruc 50.9 in  $\mu\text{mol/gFW eq. Hexose}$ ) (Additional File 4).

### 2.3.3. Association analysis in backcross families

Table 1 shows significant associations (at  $p < 0.005$ ) identified by TASSEL, by both GLM and MLM analysis, and those identified only by GLM, but which were also identified in the IL analysis described below.

GLM identified several markers in chromosome 11 associated to FS. The SNP CMPSNP30 (66 cM) was significant in two populations, BC2 and BC3 ( $R^2=9.3$  and  $12.3$  %); it was also significant in the BC3 according to MLM ( $R^2=8.4$ ). In all cases, MAK alleles increased FS values, resulting in more elongated fruits. CMPSNP65 on chromosome 10 (14.4 cM) was found to be associated with FF in both the BC2 and BC3 populations using both GLM ( $R^2=32.7-7.9$  %) and MLM ( $R^2=11.4$  and  $7.3$  %) analysis, with the MAK alleles resulting in firmer flesh (Table 1). This characteristic is associated with the ripening behavior and may be related to postharvest conservation. The same effect of MAK alleles was identified by GLM in both populations on chromosome 7 (SNPs CMPSNP249 and CMPSNP262 at 11.3 cM and 30.5 cM). However, this association could not be confirmed by MLM.

Flesh color was associated with several genomic regions (Table 1). The most important effects were observed on chromosome 9, significant in populations BC3 and BC3S1, with a main effect in the interval between markers CMPSNP1035-CMPSNP1133 (33.6-59.2 cM), with the GLM/MLM models explaining up to 51.1/13.4 % and 40.4/20.1 % of the variation found for the  $a^*$  and  $b^*$  parameters (FCa and FCb). Also found in chromosome 9 was a significant association of CMPSNP1077 with Hl, in both GLM and MLM models. VED alleles increased

the  $a^*$  and  $b^*$  parameters and reduced HI, which resulted in orange-fleshed fruits. Additionally, SNP AI\_14-H05 (located on chromosome 2 at 40.6 cM) was found to be associated to FCa by both GLM and MLM analysis in the BC3 population ( $R^2=10.4$  and 11.9 %, respectively), but interestingly, this time the MAK alleles increased FCa.

Four regions that affected variation of the sugars content were detected on chromosomes 1, 5, 9 and 10 (Table 1). The region on chromosome 1 (CMPSNP731, 80.4 cM) was only detected with GLM, with the MAK alleles decreasing flesh soluble solids content (SSC) in all backcross generations (BC2, BC3 and BC3S1) and sucrose content (SUC) in BC3S1. Even though this association could not be verified by MLM, it was validated later on in the IL analysis (see below). On chromosome 9, MAK alleles of CMPSNP1133 and CMPSNP890 (positions 59.2 and 64.0 cM, respectively) were associated with a reduction in fructose content by both GLM and MLM analysis. More interestingly, MAK alleles of CMPSNP65 (on chromosome 10, position 14.4 cM) and of 60k41243 and AI\_13-H12 (on chromosome 5, positions 73.4 and 89.4cM) were associated to an increase of SSC and glucose content in BC2 and BC3S1, respectively, using both GLM ( $R^2=27.1$  and 11.4 %) and MLM ( $R^2=11.5$  and 12.7 %) analysis.

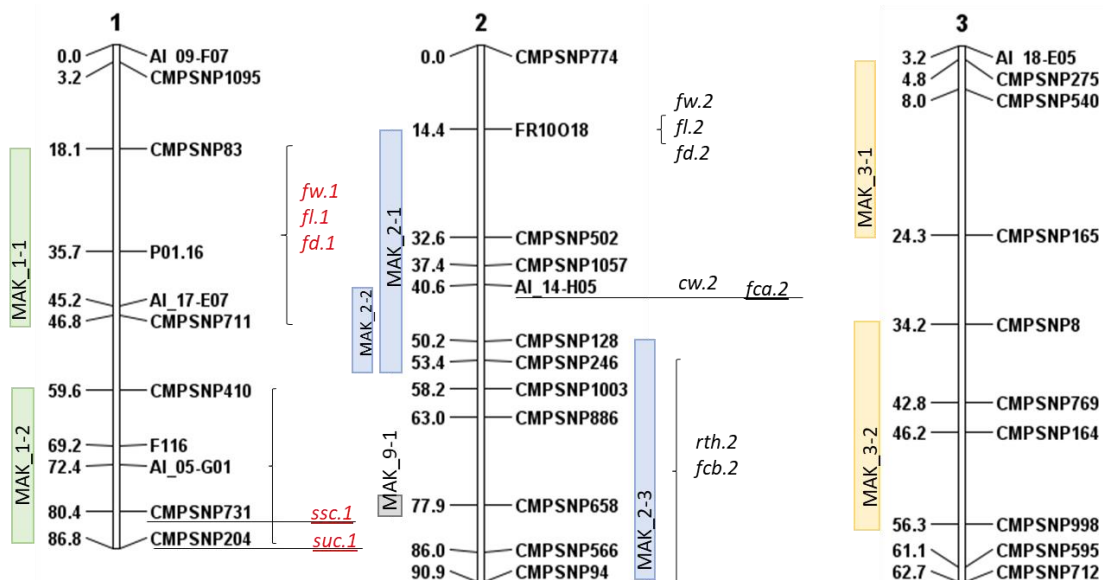
**Table 1.** Association analysis performed with TASSEL v.5, using GLM and MLM models in the BC2, BC3 and BC3S1 populations. Only associations at  $p<0.005$  observed in both GLM and MLM analysis or in GLM and IL analysis (Additional file 5, Figures 2 to 6) are shown. For each trait (FS= fruit shape index, FF= flesh firmness, FCHI, FCa and FCb= L,  $a^*$  and  $b^*$  Hunter coordinates of flesh color, SSC= soluble solid concentration in flesh, SUC, GLUC and FRUC: sucrose, glucose and fructose content in flesh) with significant association, the backcross population where it was identified, the significant marker with its chromosome and genetic position in cM, the statistical significance of the association (p), the percentage of phenotypic variance explained by the marker ( $R^2$ ), the allelic effect (negative when MAK alleles increase the trait value), and the IL that showed a significant effect in the trait and carried the marker introgressed from MAK (identified with the Dunnet's test in the IL analysis), are also indicated.

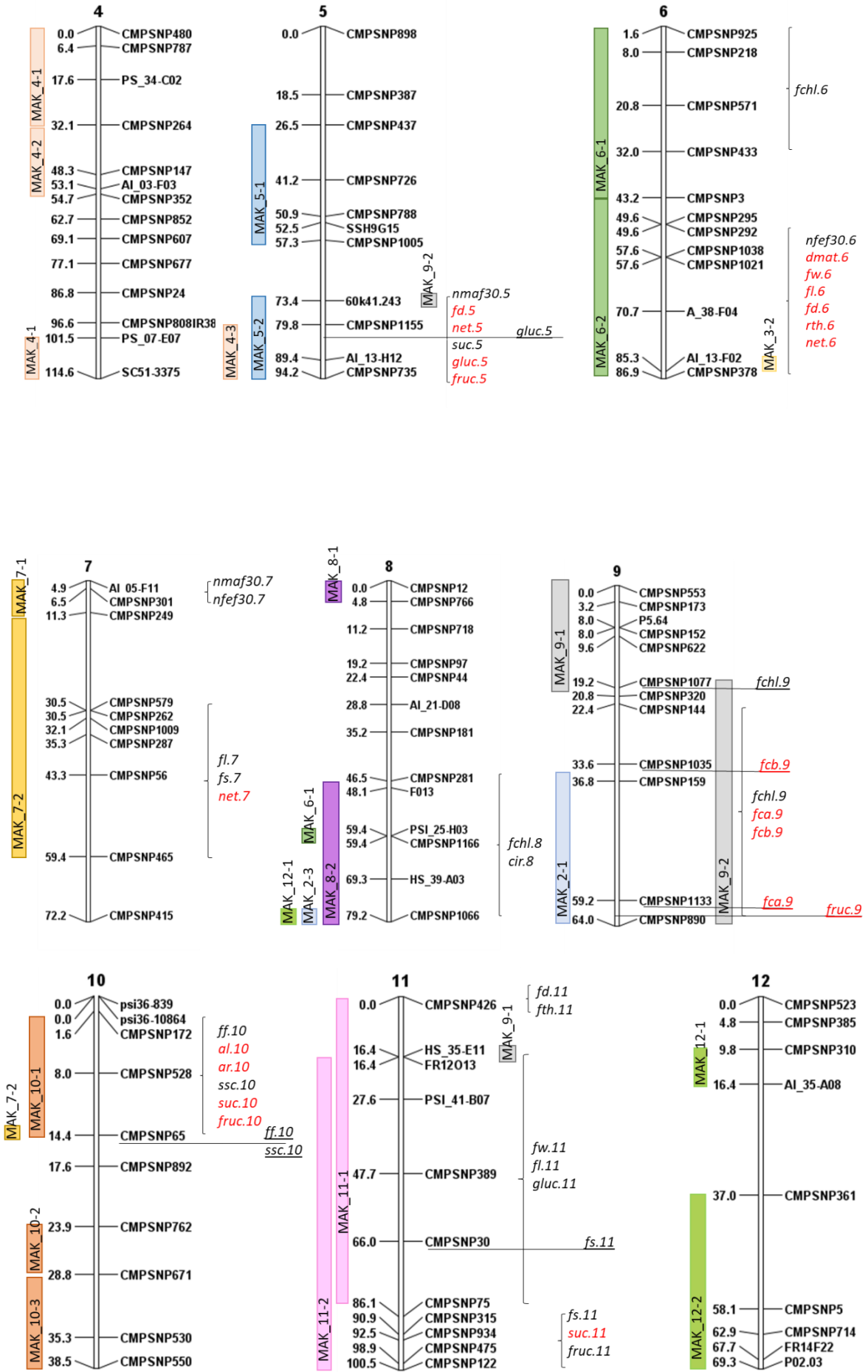
## Capítulo 2. Introgression Lines

Trait	population	Marker	Chromosome	Position (cM)	GLM			MLM			Parental that increase the trait value	IL
					p	marker_Rsq	allelic effect	p	marker_Rsq	allelic effect		
FS	BC3	PSL_41-B07	11	27.6	0,003409612	0,08	-0,07				MAK	MAK_11-2
	BC2	CMPSNP30			0,004866798	0,09	-0,06				MAK	MAK_11-2
	BC3	CMPSNP30	11	66.0	3,45E-04	0,12	-0,09	0,00	0,08	-0,11	MAK	MAK_11-2
FF	BC2	CMPSNP249			9,65975E-05	0,19	-2,47				MAK	MAK_7-2
	BC3	CMPSNP249	7	11.3	0,001718059	0,10	-1,87				MAK	MAK_7-2
	BC2	CMPSNP262			0,001993046	0,12	-2,47				MAK	MAK_7-2
	BC3	CMPSNP262	7	30.5	1,27E-05	0,18	-2,54				MAK	MAK_7-2
	BC3	CMPSNP1009	7	32.1	1,27E-05	0,18	-2,54				MAK	MAK_7-2
	BC3	CMPSNP287	7	35.3	2,77E-04	0,13	-2,15				MAK	MAK_7-2
	BC3	CMPSNP56	7	43.3	0,00119487	0,10	-1,69				MAK	MAK_7-2
	BC2	CMPSNP65			8,56312E-08	0,33	-3,09	0,004796	0,11	-2,22	MAK	MAK_10-1
	BC3	CMPSNP65	10	14.4	0,004653477	0,08	-1,41	0,004401	0,07	-1,28	MAK	MAK_10-1
FCHI	BC3S1	CMPSNP1077	9	19.2	0,002510183	0,09	-19,50	0,003482	0,10	-19,00	MAK	MAK_9-2
FCa	BC3	AI_14-H05	2	40.6	0,001120465	0,10	-2,73	0,000950	0,12	-3,59	MAK	MAK_2-1
	BC3S1	CMPSNP320	9	20.8	1,86E-10	0,38	15,02				VED	MAK_9-2
	BC3	CMPSNP144			9,75E-04	0,11	2,25				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP144	9	22.4	2,10E-10	0,39	17,86				VED	MAK_9-2
	BC3	CMPSNP1035			9,53E-05	0,15	2,31				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP1035	9	33.6	2,68E-16	0,51	17,98				VED	MAK_9-2
	BC3	CMPSNP159			2,20E-04	0,13	2,20				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP159	9	36.8	1,35E-13	0,48	18,11				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP1133	9	59.2	3,51E-12	0,44	17,64	0,003116	0,13	6,11	VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP890	9	64.0	9,90E-10	0,36	17,64				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP320	9	20.8	2,58E-06	0,24	6,09				VED	MAK_9-2
FCb	BC3S1	CMPSNP144	9	22.4	5,49E-06	0,23	8,06				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP1035	9	33.6	3,57E-12	0,40	8,11	0,000031	0,20	9,20	VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP159	9	36.8	2,21E-06	0,25	6,78				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP1133	9	59.2	1,77E-06	0,25	7,86				VED	MAK_9-2
	BC3S1	CMPSNP890	9	64.0	4,56E-06	0,23	7,86				VED	MAK_9-2
	SSC	BC2	CMPSNP731	1	80.4	0,000782493	0,14	1,62				VED
BC3		CMPSNP731	1	80.4	0,000468736	0,12	2,07				VED	
BC3S1		CMPSNP731	1	80.4	0,002121734	0,10	4,11				VED	
BC3		CMPSNP204	1	86.8	0,001202906	0,10	2,32				VED	
BC2		CMPSNP65	10	14.4	1,65953E-06	0,27	-3,26	0,004937	0,11	-2,22	MAK	MAK_10-1
SUC	BC3S1	CMPSNP731	1	80.4	0,004606327	0,11	117,72				VED	MAK_1-2
	BC3S1	CMPSNP204	1	86.8	0,00454631	0,11	117,19				VED	MAK_1-2
GLUC	BC3S1	60k41.243	5	73.4	0,004036775	0,12	-81,06	0,004423	0,13	-84,40	MAK	MAK_5-2
	BC3S1	AI_13-H12	5	89.4	0,004036775	0,12	-81,06	0,004423	0,13	-84,40	MAK	MAK_5-2
FRUC	BC3S1	CMPSNP1133	9	59.2	0,000596137	0,20	37,26	0,004122	0,17	20,61	VED	
	BC3S1	CMPSNP890	9	64.0	0,000596137	0,20	37,26	0,004122	0,17	20,61	VED	

### 2.3.4. QTL analysis in the IL population

The Dunnett's test of the IL population phenotyped in the three environments allowed the detection of a number of QTLs (Additional file 5, Fig. 1) as described in the next section.





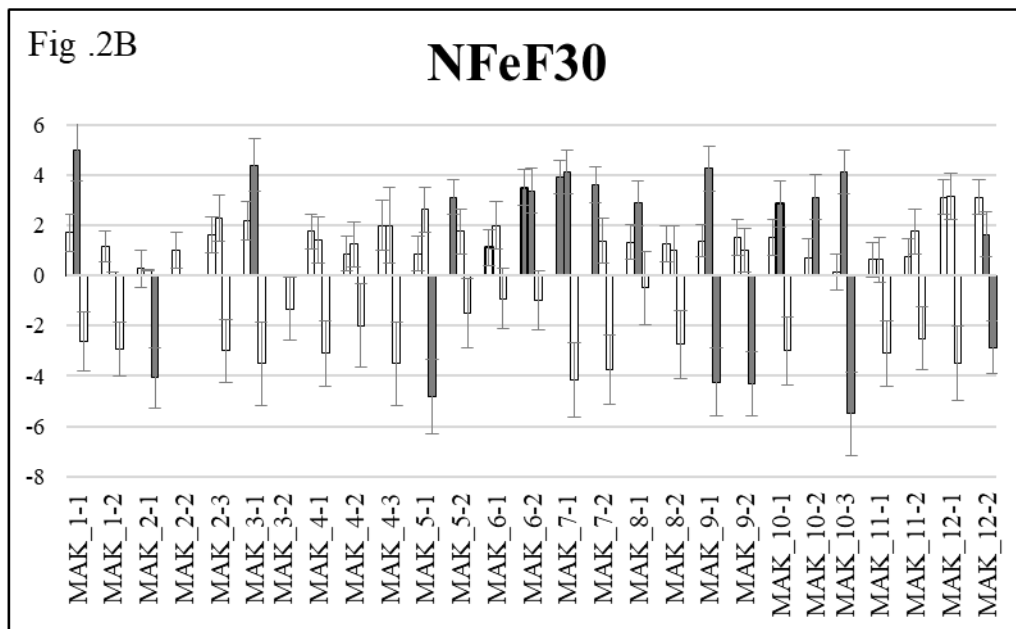
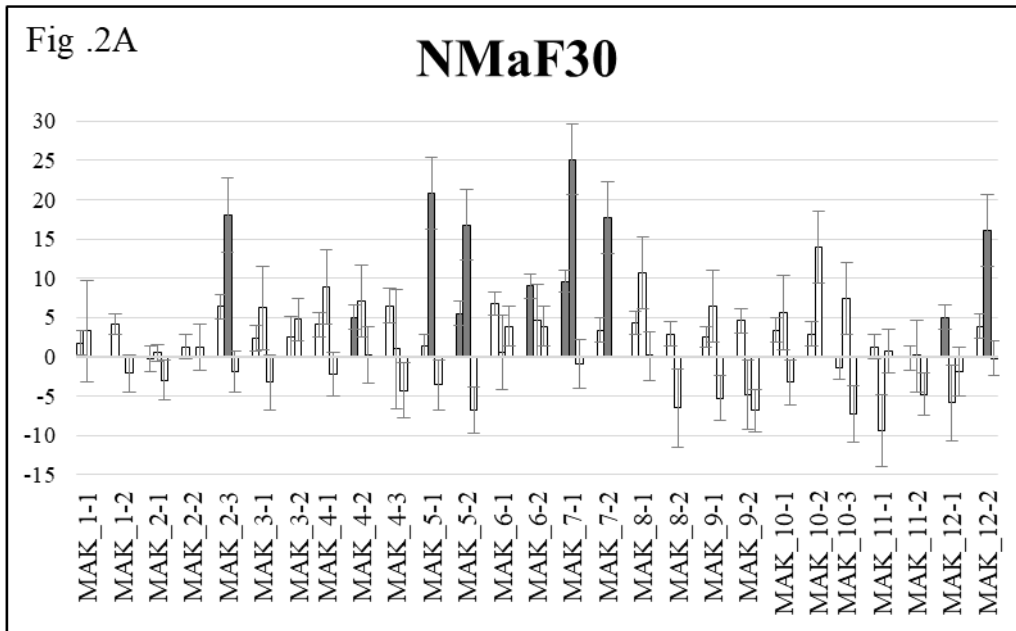
## Capítulo 2. Introgression Lines

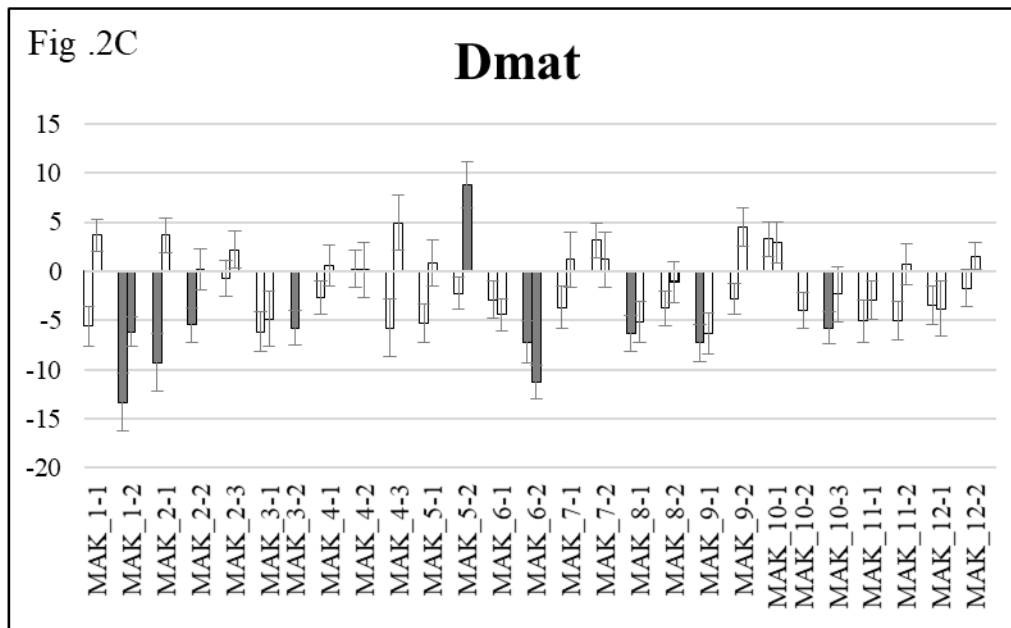
**Figure 1.** QTL locations in the map of (Garcia-Mas et al., 2012). Markers found to be associated in the backcross populations (underlined) are indicated (for each associated region all the markers significant with both GLM and MLM analysis and those markers significant with MLM and having the highest R<sup>2</sup> values are shown). QTLs found in the ILs assay with the Dunnett's test in at least two trials are shown in brackets. In red QTLs in which MAK alleles decrease the value of the trait and in black those in which MAK alleles increase the value of the trait. Color bar at the left of the chromosomes show the MAK introgressions of each IL.

### 2.3.4.1. Flowering and maturity time

The IL population showed high variability for flowering traits (NMaF30 ranging from 1.1 to 36.1 and NFeF30 from 0 to 5.5) (Additional File 4). We found low to moderate heritabilities for both traits ( $h^2 = 0.26$  to  $0.40$  and  $0.15$  to  $0.26$ , for male and female flowering, respectively) and significant G x E interaction (19.6 and 18.3 %, respectively). This interaction was probably a consequence of the high temperatures reached in the Pap14 trial, which accelerated plant development, making more frequent pruning necessary, which in turn likely affected flowering scoring. Also, the time from pollination to maturity was highly variable among the ILs (DMat from 27 to 52.1 days). This trait was measured only in the two assays where hand pollination was used (UPV15 and Paip14). Heritabilities for this trait were slightly higher ( $h^2 = 0.26$  to  $0.48$ ), and G x E interaction represented 10.1 % of total variance.

Despite the high interaction effect, several ILs showed consistent significant differences with the VED recurrent parent in at least two localities (Figure 2), thereby defining 6 QTLs (*nmaf30.5*, *nmaf30.7*, *nfef30.6*, *nfef30.7*, *dmat.1* and *dmat.6*) (Additional file 5, Figure 1). MAK\_5-2 produced more male flowers, whereas MAK\_6-2 developed a higher number of female flowers. Interestingly, MAK\_7-1 produced more of both male and female flowers (Figure 2). Apart from the effect on the number of female flowers, MAK\_6-2 showed a ripening cycle that was shorter than that of VED. These two traits found together in MAK\_6-2 are interesting, as they could be useful for developing cultivars with abundant and early yield. The effect of a shorter cycle was also observed in MAK\_1-2 (Figure 2).





**Figure 2.** Comparison of the means of the set of ILs with the mean of the recurrent parent (VED) using the Dunnett's test. The means and standard errors are shown for each trial (Paiporta 2015, UPV 2015 and Paiporta 2014). Gray bars show significantly different ( $p < 0.05$ ) IL and VED means. Traits evaluated are: NMaF30 and NFef30 =Number of male/female flowers 30 days after the appearance of the first flower (Figure 2A and 2B) and Dmat=days to maturity (Figure 2C). For Dmat, only two trials are shown (UPV 2015 and Paiporta 2014).

#### 2.3.4.2. Fruit morphology

Traits related to fruit size and shape (fruit weight, length, diameter and shape (FW, FL, FD and FS)), presented moderate heritability ( $h^2 = 0.38$  to  $0.55$ ), and all had a low or non-significant G x E interaction (6.2-8.1 %) (Additional file 4). FS was the trait with the lowest environmental effects, which was consistent with the information reported in previous studies (Eduardo et al., 2007). Another trait related to fruit morphology is percentage of fruit cavity (CW). CW had lower heritability ( $h^2 = 0.08$  to  $0.29$ ) and higher G x E effects (11.8%) (Additional file 4).

FW was positively correlated to fruit length and diameter (FL and FD) in all localities ( $r = 0.77$  to  $0.93$ ) (Additional file 6). In fact, most of the ILs that showed significant effects on FW also showed effects in both FL and FD (Figure 3a). MAK\_1-1 and MAK\_6-2 significantly decreased FW in at least two environments (from 32.5 to 46.7 %), whereas MAK\_2-1 and MAK\_11-1 increased FW (from 33.3 to 58.1 %), even though MAK showed smaller fruits than VED, which demonstrates the power of the current population to uncover hidden genetic variability. These four ILs also presented significant effects on FL and FD, with MAK alleles having the same direction of effect. Therefore, these changes in FW were due to variation in two dimensions at the same time and had no effect on fruit shape. These lines defined four FW QTLs that co-localize with those of FL and FD (*fw.1-fl.1-fd.1*, *fw.2-fl.2-fd.2*, *fw.6-fl.6-fd.6*. and *fw.11-fl.11-*

*fd.11*) (Figure 1 and Additional file 5). Representative fruits of the two lines with the largest effects on FW, MAK\_6-2 and MAK\_11-1, are shown in Figure 4.

FW was not correlated to Fruit shape (FS) ( $r=0.18$  or non-significant). However, FS was positively correlated to FL ( $r=0.53$  to  $0.59$ ) (Additional File 6), as previously observed (Eduardo et al., 2007; Fernández-Silva et al., 2010). MAK\_7-2 and MAK\_11-2 yielded fruits with an increase in the FS ratio, which were more elongated than VED (between 12.5 and 25 % longer), but had no significant variation in diameter (Figure 3 and Figure 5), which defined QTLs for FL and FS in these regions (*fl.7-fs.7* and *fl.11-fs.11*) (Figure 1 and Additional File 5).

One QTL involved in variation of CW was identified in chromosome 2, *cw.2*. Fruits of MAK\_2-2 had higher CW values (from 16.7 to 20.2 %) than the VED parental line (Figure 3). The effect of this QTL is shown in Figure 6. The introgression of MAK\_2-2 totally overlapped with that of MAK\_2-1 and partially with that of MAK\_2-3 (Additional file 3). MAK\_2-1 also had CW values that were higher than those of VED in one environment, whereas MAK\_2-3 did not differ from the recurrent parent in this trait (Figure 3), thus suggesting that this QTL is in the region that is common to both MAK\_2-1 and MAK\_2-2.

In summary, with the current IL population we have identified several QTLs involved in FW, FS and CW. Nearly 60 and 30 QTLs have been described to date for FW and FS (Monforte et al., 2014; Diaz et al., 2015), respectively. In the current report, QTLs *fw.2* and *fw.11* may correspond to the metaQTLs *FWQM2* and *FWQM11* described by (Monforte et al., 2014). This study (Monforte et al., 2014) suggested that members of the CNR/FW2.2 and SIKLUH/FW3.2 gene families are strong gene candidates for melon FW QTLs. Among the QTLs detected with the current IL collection, the *fw.6* and *fw.11* chromosomal regions include the CNR melon member *CmCNR-6* and the SIKLUH melon member *CmCYP78A-4*, respectively. However, further studies using subILs with smaller introgressions are necessary to analyze the contribution of these genes.

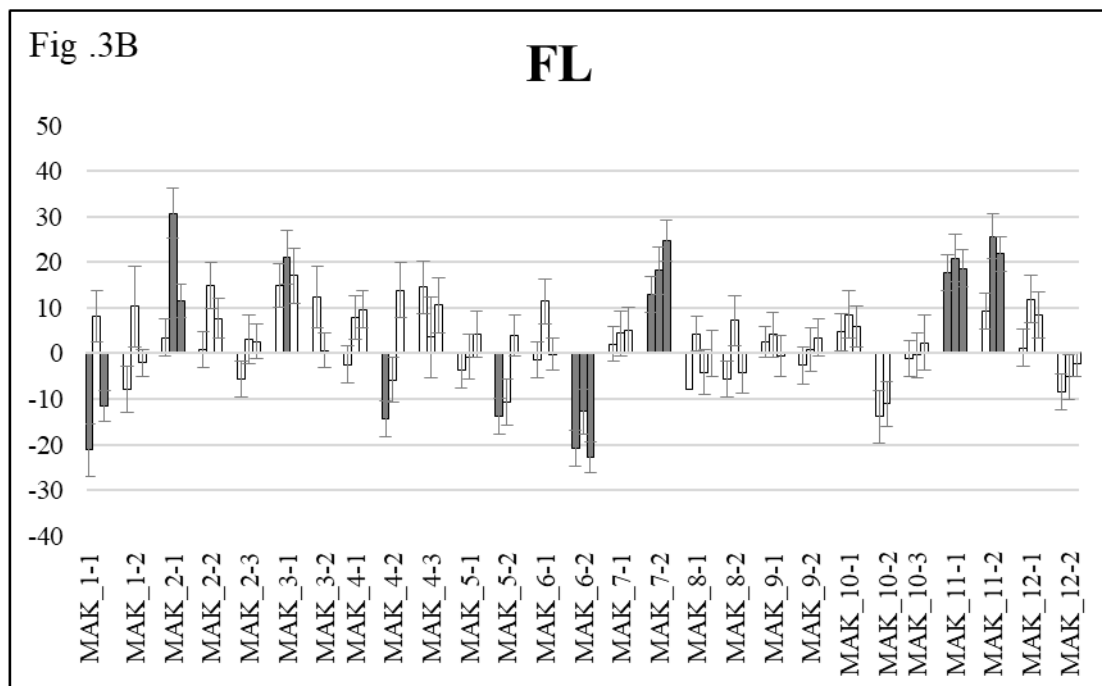
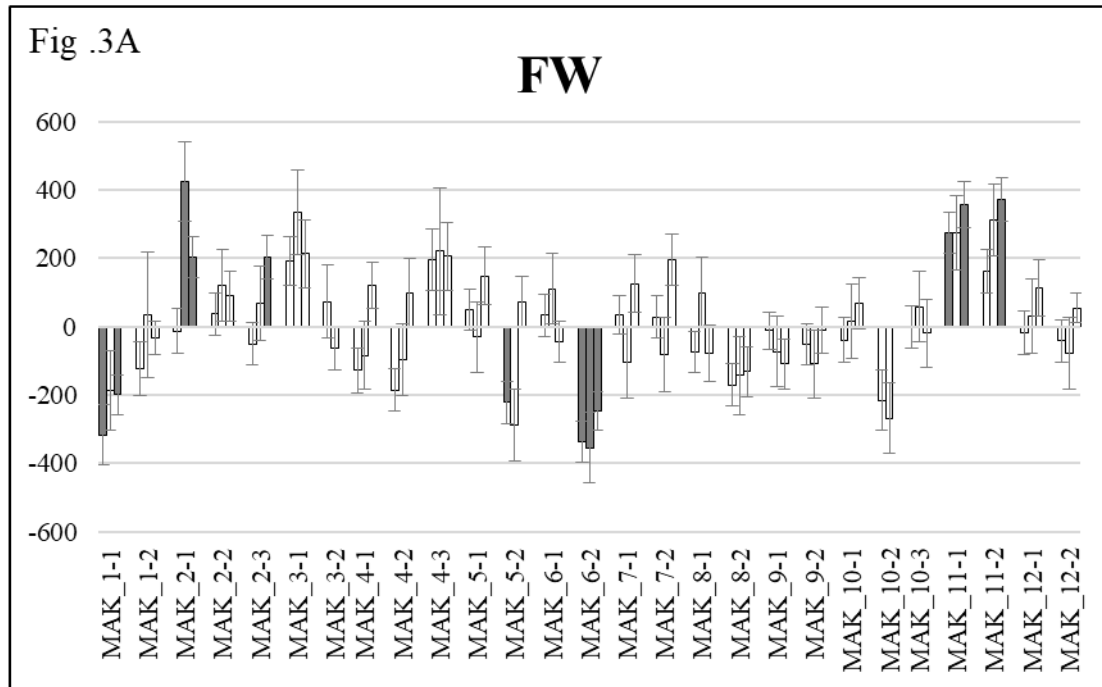
FS QTLs have previously been mapped in all chromosomes, except in chromosome 5, and metaQTLs had been defined on chromosomes 1, 2, 8, 11 and 12. In the current report, *fs.11* may correspond to the metaQTL *FSQM11*. Regarding the QTL defined on chromosome 7, several FS QTLs had been detected previously in that genomic region, mainly in PI 161375 (a Korean accession closely related to *makuwa* cultivars, (Esteras et al., 2013)) x “Piel de Sapo” (*inodorus* type) populations, suggesting that this QTL may be specific to Far-Eastern melon

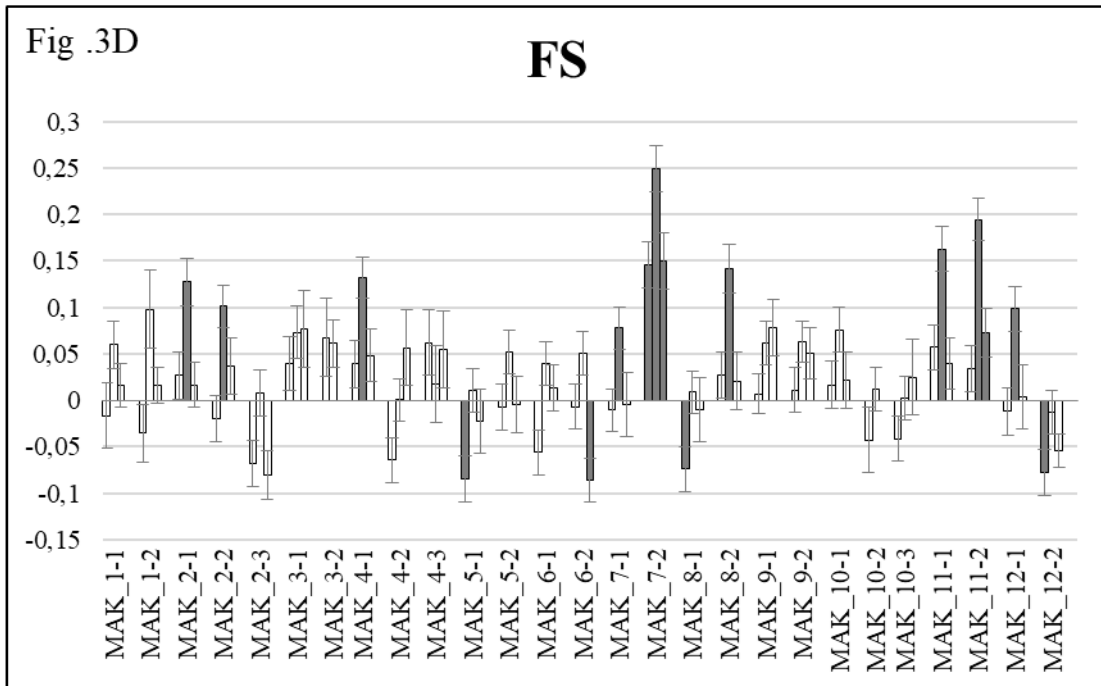
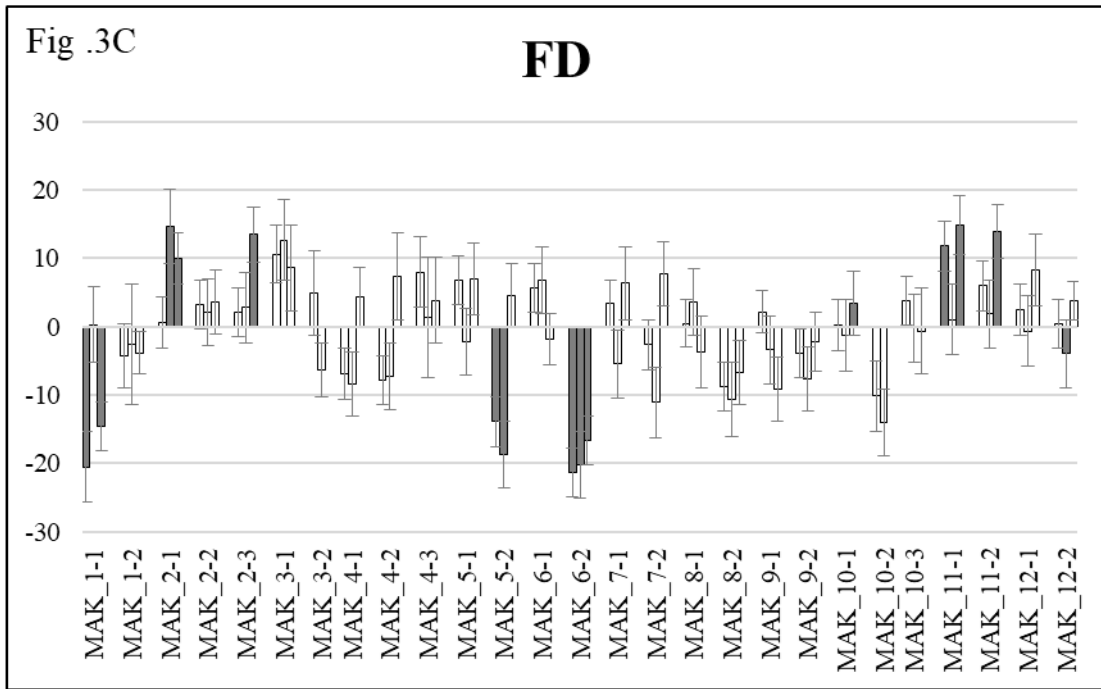


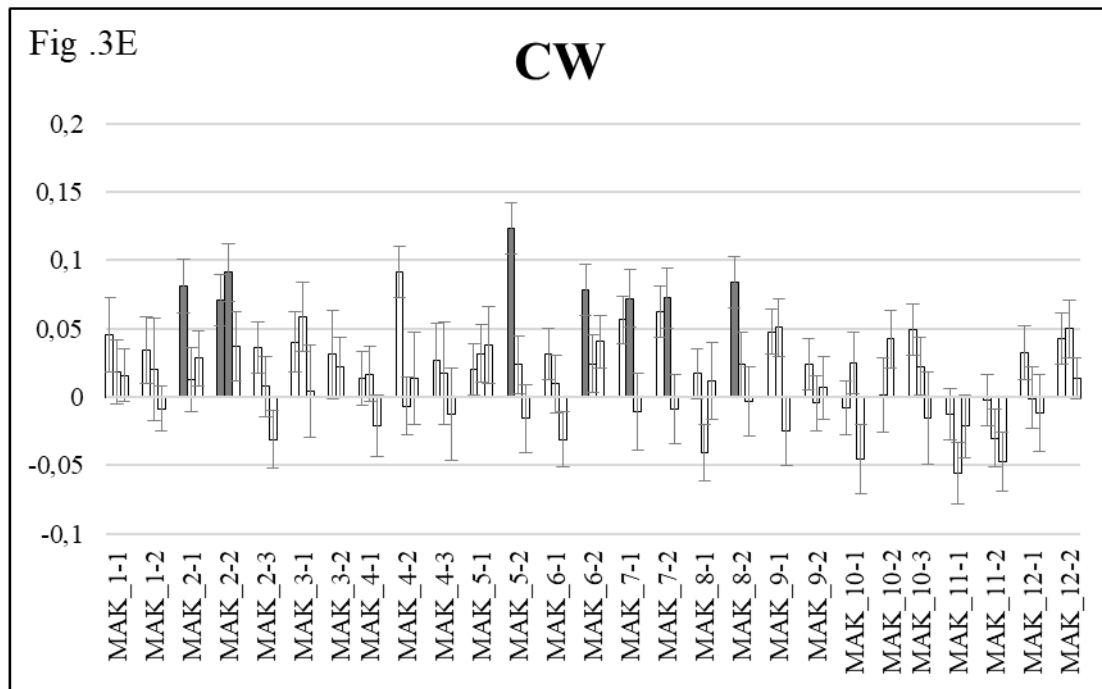
## Capítulo 2. Introgression Lines

cultivars. The candidate genes *CmOFP-8* (member of the Ovate Family Proteins) and *CmSUN-16* (member of the *SUN* family) are located in the region of the QTL.

QTLs involved in fruit flesh content or cavity have been studied in a very small number of works. Nevertheless, (Paris et al., 2008) found QTLs for these traits on LG II, which could be allelic to the QTL observed in MAK\_2-2.







**Figure 3.** Comparison of the means of the set of ILs with the mean of the recurrent parent (VED) using the Dunnett’s test. The means and standard errors are shown for each trial (Paiporta 2015, UPV 2015 and Paiporta 2014). Gray bars show significantly different ( $p < 0.05$ ) IL and VED means. Traits evaluated are: FW=fruit weight in grams (Figure 3A), FL=fruit length in mm (Figure 3B), FD=fruit diameter in mm (Figure 3C), FS=fruit shape as the ratio between fruit length and fruit diameter (Figure 3D) and CW=cavity width (as the ratio between the width of the seminal cavity and the fruit diameter) (Figure 3E).



**Figure 4.** Effect of MAK introgressions in chromosomes 11 and 6 affecting fruit size. Top: VED parental (FW=614-933 g; FL=98.6-112.7 mm; FD=107.6-126.3 mm). Middle: melons of MAK\_11-1 (FW= 971.2-1208.1 g; FL= 117.30-133.3 mm; FD=122.5-127.4 mm). Bottom: melons of MAK\_6-2 (FW= 366.9-579.2 g; FL= 75.8-99.7 mm; FD=89.8-106.1 mm). Both lines show significant differences in FW, FL and FD with VED in two or three trials.



**Figure 5.** Effect of MAK introgressions in chromosomes 7 and 11 affecting fruit shape. Top VED parental (FS= 0.89-0.94). Bottom: melons of the line MAK\_7-2 (FS= 1.08-1.14) and melons of the line MAK\_11-2 (FS: 0.97-1.08).



**Figure 6.** Wider cavities found in fruits of MAK\_2-2 (Bottom: CW= 0.50-0.54) compared to the recurrent VED parental (Top: CW=0.42-0.49).

#### 2.3.4.3. Ripening behavior

Ripening behavior is one of the most important factors involved in fruit quality in melon. We analyzed three ripening-related traits: the presence of abscission layer, flesh firmness and external aroma (AL, FF and AR). All three traits presented moderate heritability ( $h^2=0.30$  to  $0.5$ ) with a strong genotype effect (which accounted for 29.2 to 35.9 % of the total variation), a low or non-significant environmental effect and moderate G x E interaction (9.1-11.5 %) (Additional file 4).

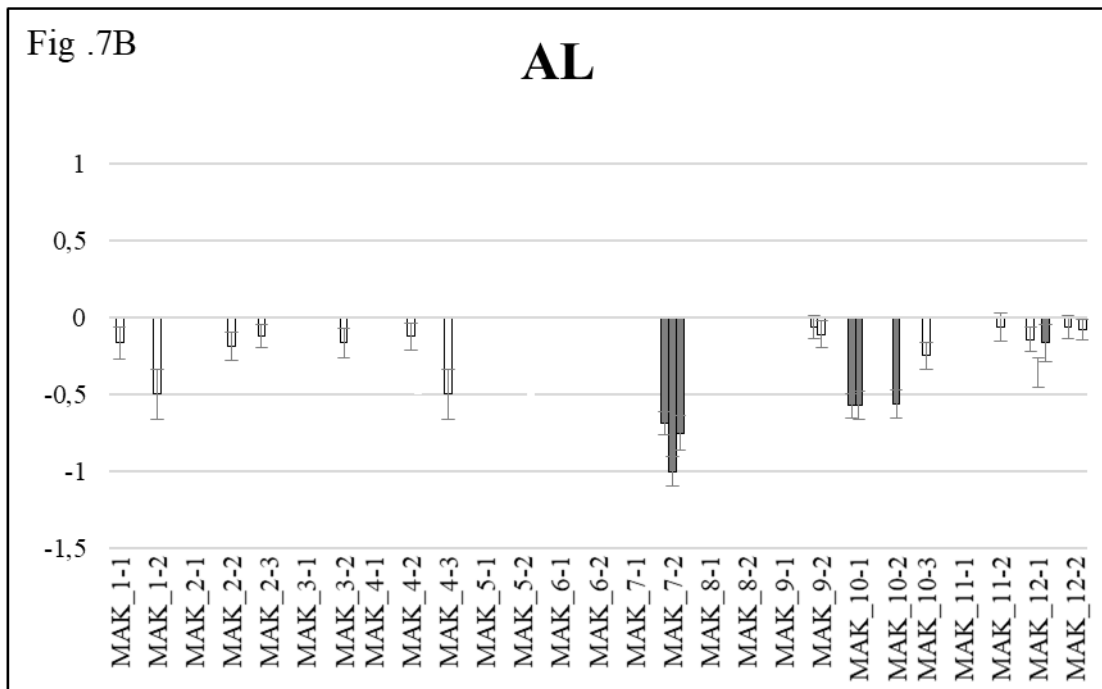
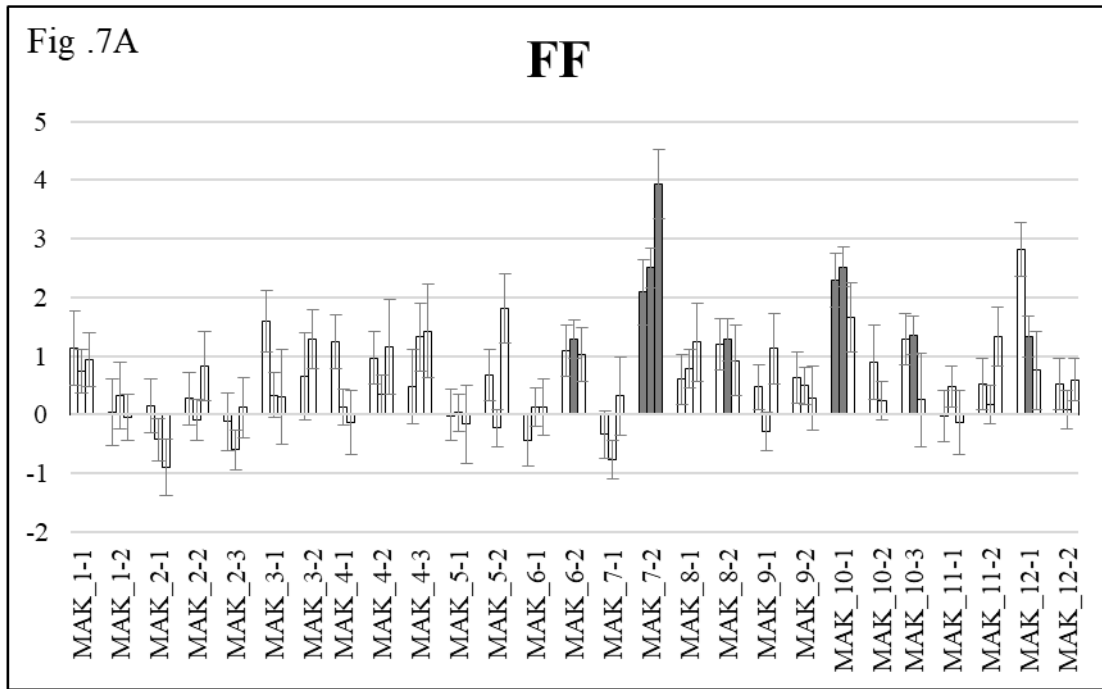
Most ILs developed fully climacteric fruits, like VED, forming an abscission layer at the time of maturity; two exceptions were MAK\_7-2 and MAK\_10-1, in which most of the fruits did

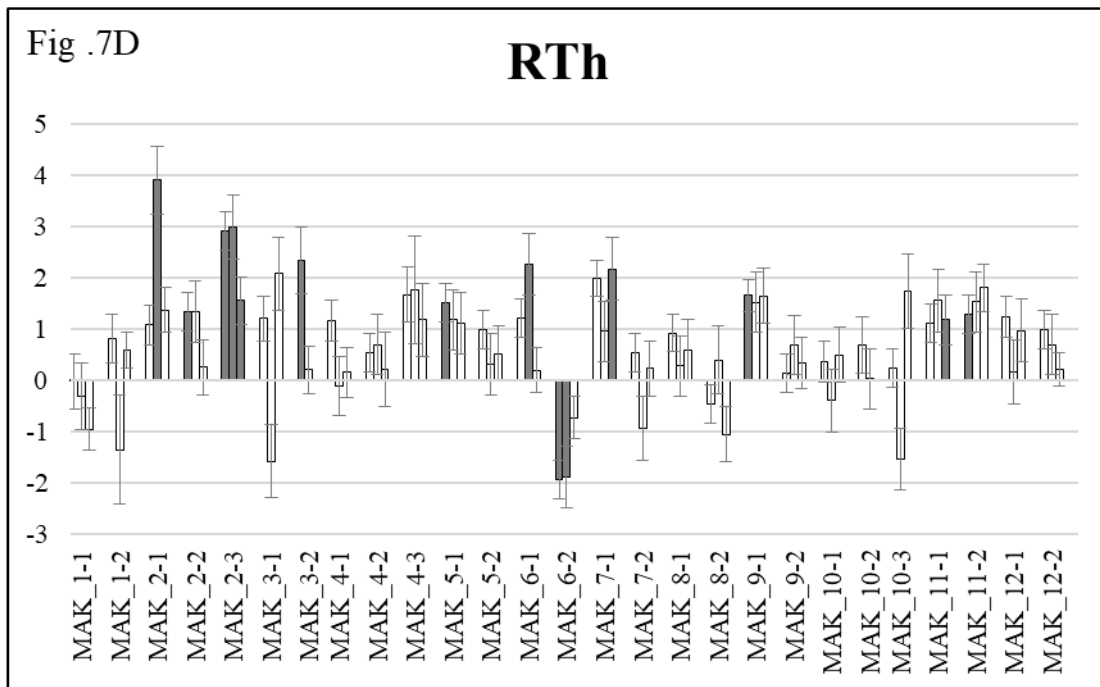
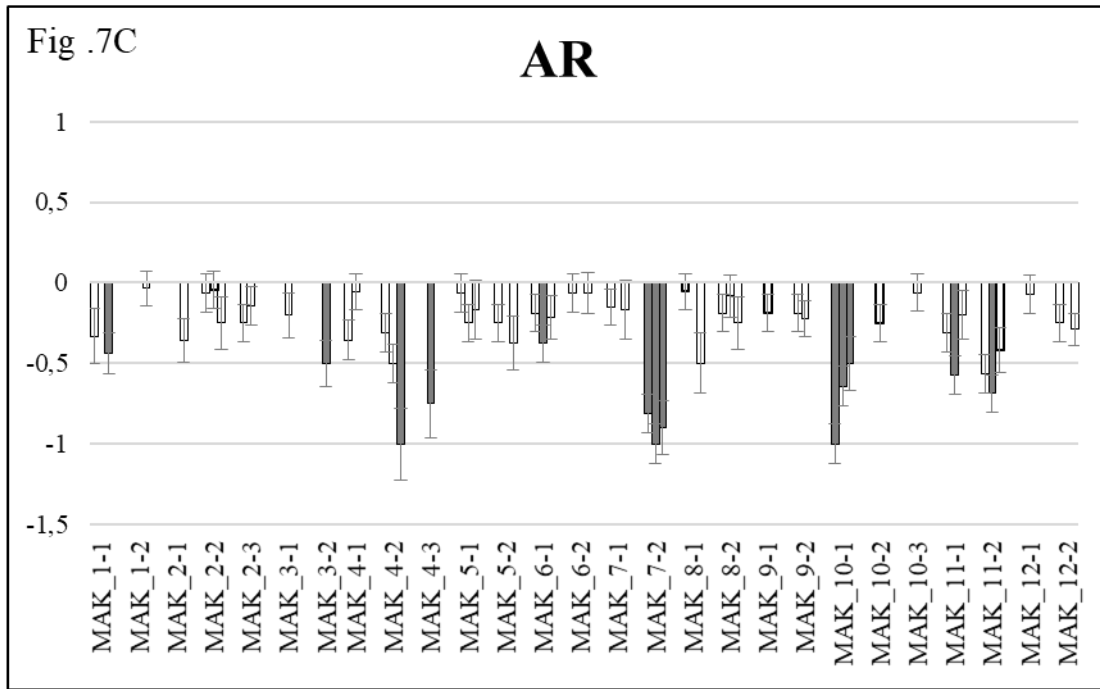
## Capítulo 2. Introgression Lines

not form an abscission layer at full maturity (Figures 7 and 8). MAK\_10-1 has a single introgression, defining the QTL *al.10* (Figure 1 and Additional file 5), whereas MAK\_7-2 has a major introgression on chromosome 7, and also an additional one in the region of *al.10* (Additional file 3), which could be causing the effects on the abscission layer. Therefore, the possible presence of an *al* QTL on chromosome 7 needs to be confirmed by separating these two introgressions into independent lines.

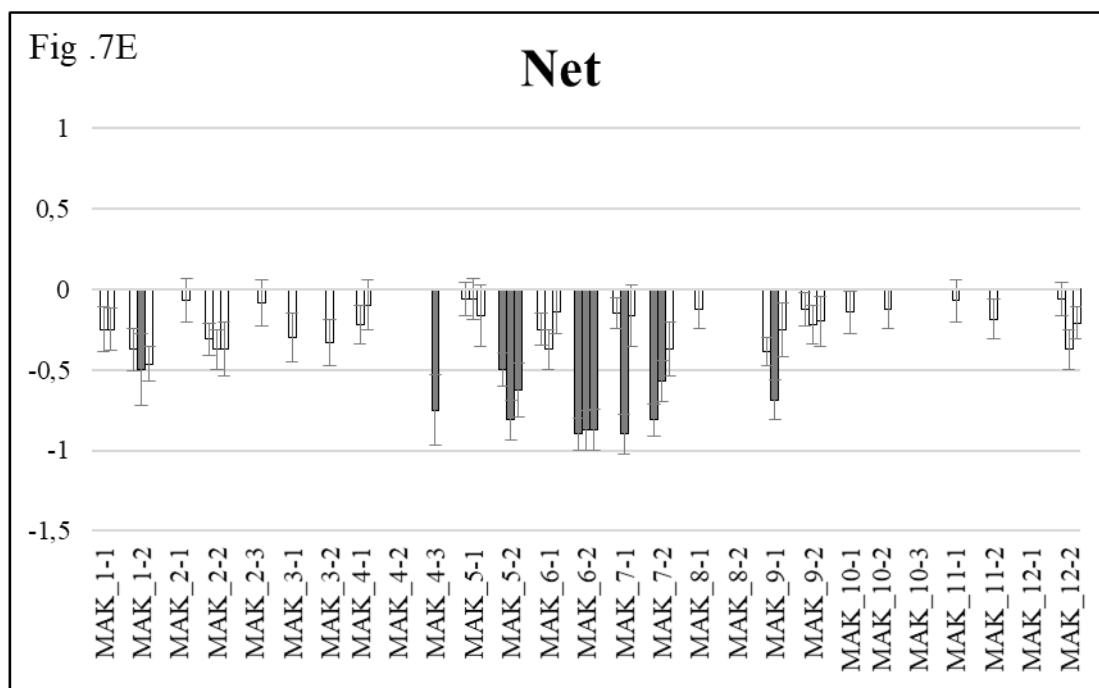
Along with the lack of fruit abscission, MAK\_7-2 and MAK\_10-1 showed firmer flesh (FF increased about twofold compared to VED, 4.2 and 4.9 versus 2.0 kg/cm<sup>2</sup>) and less external aroma at maturity (*ff.10* and *ar.10*, Figure 7), probably as a result of the different ripening behaviors, as these two traits have been reported to be influenced by climacteric/non-climacteric ripening (Ayub et al., 1996; Obando et al., 2008). The same possible confounding effects between chromosome 7 and chromosome 10 introgressions on MAK\_7-2 may be causing the increase in FF as well as the aroma decrease observed in this IL.

None of the QTLs found in this study correspond to previous QTLs associated to ripening. For example, the major genes *Al-3* and *Al-4* that control fruit abscission and autocatalytic ethylene production map in different chromosomes (8 and 9, respectively (Périn et al., 2002b). Additional QTLs involved in ethylene production and or in fruit flesh firmness (Perin et al., 2002b; Moreno et al., 2008; Vegas et al., 2013; Leida et al., 2015) map in different regions of chromosomes 1, 2, 3, 6, 11 and 12. Moreno et al. (2008) reported an increased FF in ILs with introgressions of chromosome 10, derived from the cross of PI161375 (whose climacteric behavior is similar to that of MAK) x “Piel de Sapo” (inodorus, non-climacteric), which is most likely allelic to the QTL detected in MAK\_10-1 (*ff.10*). The fruit flesh of the Piel de Sapo cultivar actually has a high FF value, so much so that increasing FF in this genetic background would probably not be necessary or even desirable, whereas an increase of FF in *cantalupensis* cultivars could be very interesting. Thus, delayed ripening and increased flesh firmness could extend fruit shelf life, which is a major objective for cantaloupe breeding.









**Figure 7.** Comparison of the means of the set of ILs with the mean of the recurrent parent (VED) using the Dunnett’s test. The means and standard errors are shown for each trial (Paiporta 2015, UPV 2015 and Paiporta 2014). Gray bars show significantly different ( $p < 0.05$ ) IL and VED means. Traits evaluated are: FF=flesh firmness in  $\text{kg}/\text{cm}^2$  (Figure 7A), AL = presence or absence of abscission layer (Figure 7B), AR=presence or absence of external aroma (Figure 7C), RTh=rind thickness in mm (Figure 7D) and Net=presence or absence of rind netting (Figure 7E).



**Figure 8.** Fully mature fruits of VED with abscission layer (top) and of line MAK 10.1 (bottom) without abscission layer.

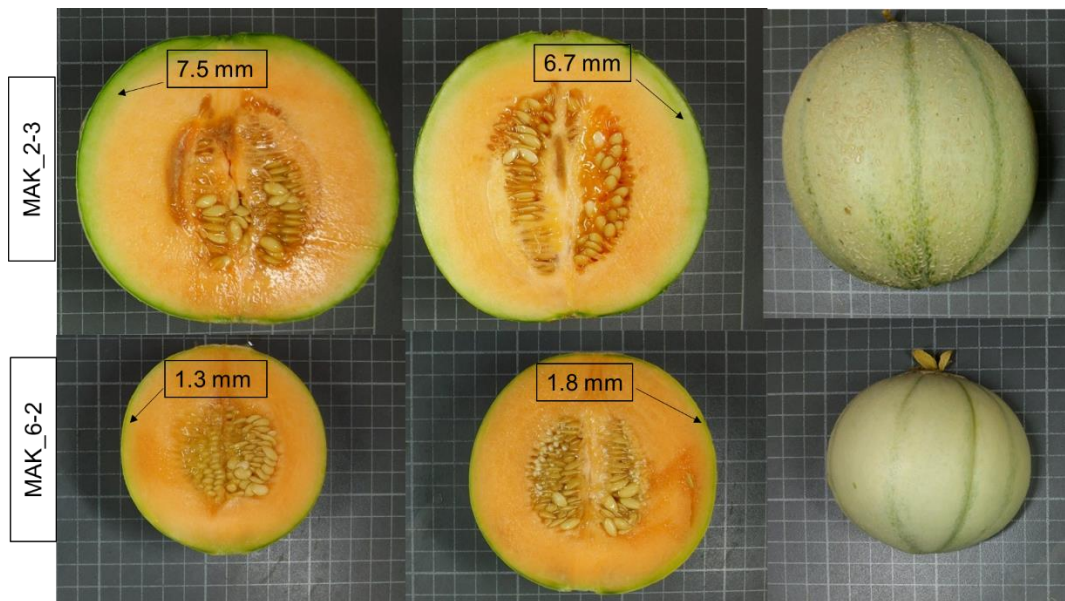


## Capítulo 2. Introgression Lines

### 2.3.4.4. Rind characteristics

Rind characteristics, such as rind thickness and netting (Rth and Net) can be associated with shelf life and resistance to storage and shipping. Despite this potential, the study of their genetics has been scarce (Obando et al., 2008a; Harel-Beja et al., 2010). These traits have moderate heritability ( $h^2= 0.33-0.49$ ) with important genotype contributions for both traits (29-35.8 %), and moderate and low E and G x E effects, in Rth and Net, respectively (Additional file 4).

MAK\_2-3 and MAK\_6-2 produced fruits with thicker and thinner rinds, respectively, than VED (average of 6.6 mm and 2.6 mm versus 4.2 mm in VED, Figures 7 and 9) in at least 2 environments. These lines defined the *rth.2* and *rth.6* QTLs (Figure 1 and Additional file 5). *Rth.6* co-localized with *net.6* (Figure 1, Additional file 5), which accounted for fruits of the IL MAK\_6-2 being less netted than those of VED (Figure 7 and 11). This phenotype can be seen as either a benefit, fruits with more edible flesh, or a liability, more problems in harvesting and storage. Two other QTLs were associated to netting reduction (*net.5* and *net.7*) (Additional file 5), as observed in MAK\_5-2 and MAK\_7-2 fruits with reduced netting intensity (Figure 7).



**Figure 9.** Variation in rind thickness observed in the IL Population. Top: Thicker rinds of line MAK\_2-3 (Rth=5.8-7.7 mm) and Bottom: thinner rinds of line MAK\_6-2 (Rth=1.3-3.5mm). Right: detail of netted and non-netted rind.

### 2.3.4.5. Flesh color

Flesh color is important as a consumer preference trait, and can also be associated to carotenoid content, which is related to the nutritional quality of the fruit. Our IL population showed important variability for flesh color, as was expected due to the contrasting phenotypes of the founder parents for this trait (Additional File 1 and 4). All the measured traits related to flesh

color displayed a very strong genotype effect (29.1-75.7 %), with heritabilities from moderate in FCHI ( $h^2= 0.32$  to  $0.36$ ) to high in the FCa and FCb ( $h^2=0.60$  to  $0.83$  and  $h^2 =0.43$  to  $0.47$ , respectively). The E effects (1.5-7.9 %) and G x E interactions (3.6-9.5 %) were low and even non-significant for the  $b^*$  parameter (Additional file 4).

The main effect in flesh color was observed in MAK\_2-1 and MAK\_9-2, which yielded fruits with green flesh (Figure 10), with significantly lower and higher values for the  $a^*$  and HI parameters, respectively, in the three environments (Figure 11). Fruits of MAK\_9-2 also had  $b^*$  values that were significantly lower than VED. These lines define a major QTL affecting flesh color in chromosome 9 (*fchl.9-fca.9-fcb.9*) (Additional file 5). The MAK\_2-1 has a major introgression on chromosome 2, and an additional one in the region of *fchl.9-fca.9-fcb.9* (36.8-64 cM/CMPSNP159-CMPSNP890, Additional file 3), which could be causing the effects on flesh color. Therefore, the occurrence of a flesh color QTL on chromosome 2 requires confirmation by the characterization of lines with single introgression.

The other ILs were all orange-fleshed, but some variation in the orange tone was observed. Fruits of MAK\_6-1 and MAK\_8-2 have a paler orange color, with higher HI values (Figures 12 and 5) (*fchl.6* and *fchl.8*) (Figure 1, Additional file 5). The fruits of MAK\_8-2 presented a yellow color in the internal rind, which was different from the green that is usually found in most ILs and in VED fruits (Figure 10). This trait appeared in some fruits of other lines. It was scored as present or absent (CIR, color of the inner rind) and analyzed. Mainly MAK\_8-2, but also MAK\_6-1 and MAK\_12-1, yielded fruits with yellow internal rind. The MAK\_8-2 line has a single introgression (46.5-79.2 cM/CMPSNP281-CMPSNP1006), but both MAK\_6-1 and MAK\_12-1 have a second introgression, in addition to their main one, in common with MAK\_8-2 in chromosome 8 (Additional file 3), suggesting that the CIR effect is due to the MAK introgression in chromosome 8 (*cir.8*).

Only one line presented a significant increase in the  $b^*$  parameter in at least two environments (Figure 11). MAK\_2-3 have orange-fleshed fruits with increased  $b^*$  values, with more yellowish flesh (Figure 12), defining the *fc2.2* QTL (Figure 1 and Additional file 5).

Carotenoid content has been studied in several previous works and has been reported to be independent of ripening behavior (Ayub et al., 1996). In these previous studies, QTLs for carotene content co-locate with the major flesh color genes *gf* (green flesh) and *wf* (white flesh), located in chromosomes 8 and 9, respectively<sup>1</sup>. Classic studies indicate that these genes interact

---

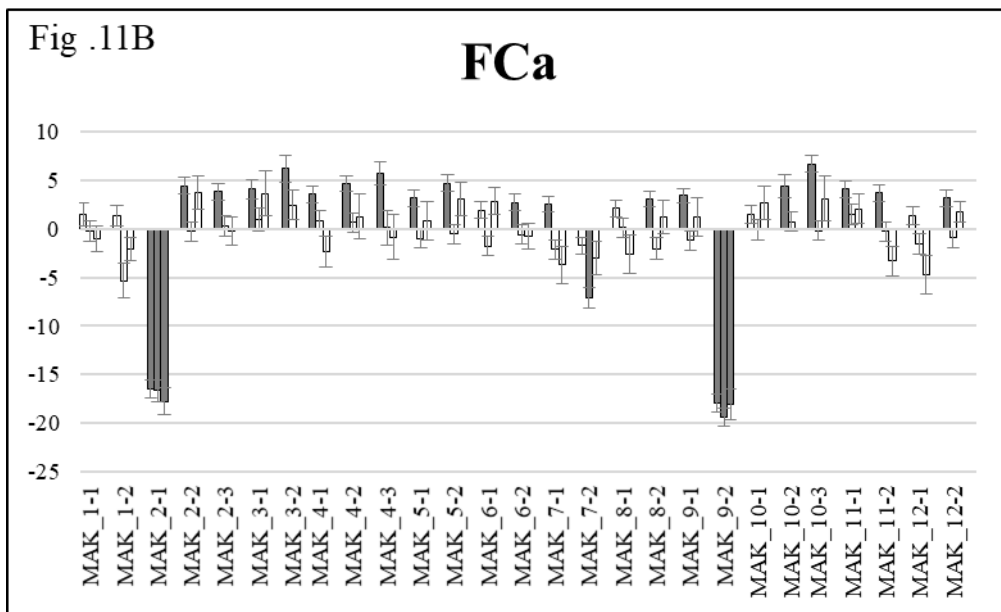
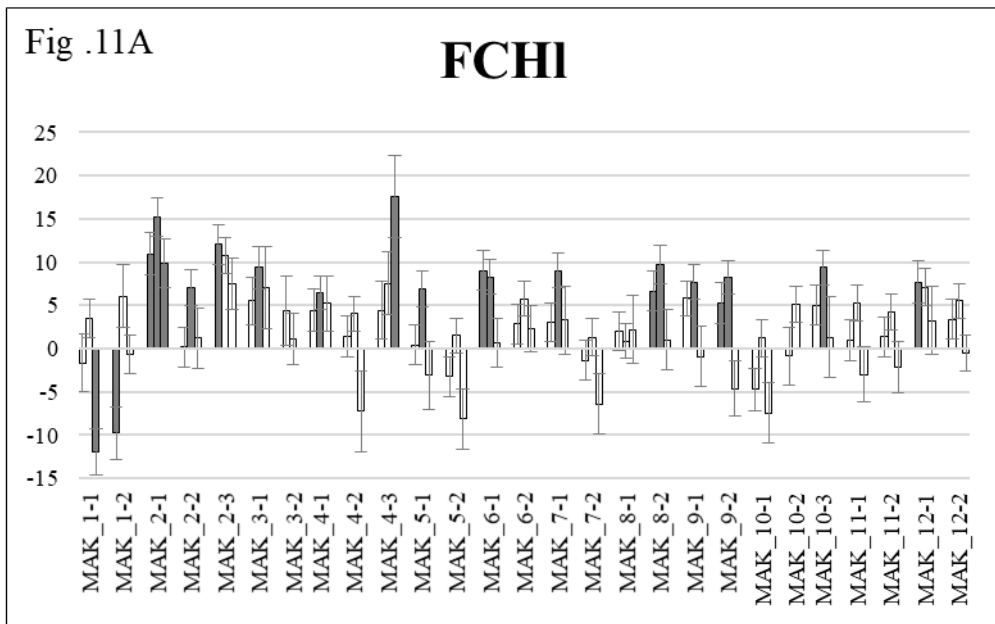
<sup>1</sup> The genes annotation *gf* and *wf* is reverse in this paper because at the time of the publication there was a discussion on which annotation was better to use. The correct annotation is described in Chapter 1.

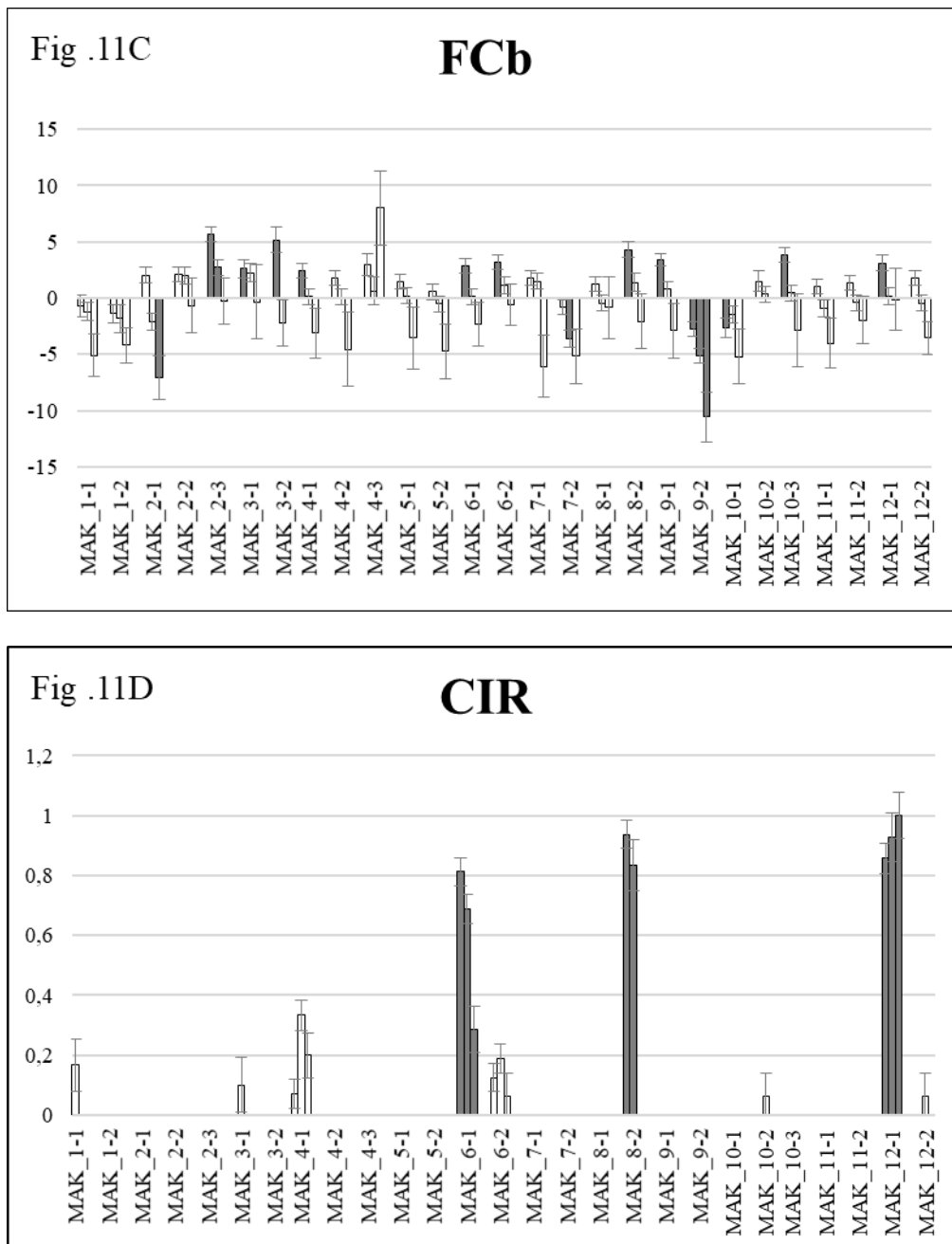
## Capítulo 2. Introgression Lines

epistatically:  $wf^{+}/-/gf^{+}/-$  and  $wf^{+}/-/gf/gf$  allelic combinations have orange flesh,  $wf/wf/gf^{+}/-$  white flesh and  $wf/wf/gf/gf$  green flesh (Clayberg, 1992). In our population, the effect of MAK introgressions containing these genes also altered fruit color. Fruits of MAK\_9-2 (with a single introgression on chromosome 9 in the region of the  $wf$ ) showed green flesh (Additional file 3 and Figure 10). MAK fruits are white-fleshed, so this cultivar has the  $gf$  and  $wf$  allelic combination that leads to white flesh ( $wf/wf/gf^{+}/gf^{+}$ ). On the other hand, the VED cultivar has the orange allele for  $wf$  and the green allele for  $gf$  ( $wf^{+}/wf^{+}/gf/gf$ ) (Monforte et al., 2004). Thus, MAK\_9-2 would have the combination of  $wf/wf$  (from MAK) and  $gf/gf$  (from VED), leading to green-fleshed fruits. We also observed the epistatic interaction between the two genes in fruits of MAK\_8-2. This line has a VED genotype in chromosome 9,  $wf^{+}/wf^{+}$ , but contains a MAK introgression in chromosome 8 in the region of  $gf$ ,  $gf^{+}/gf^{+}$ . This combination is, as expected, orange-fleshed. However, the effect of the  $gf$  gene is not totally masked, as previously suggested, by the presence of  $wf^{+}$  alleles, and the allelic combination found in MAK\_8-2,  $wf^{+}/wf^{+}/gf^{+}/gf^{+}$ , resulted in a different orange phenotype than the VED allelic combination,  $wf^{+}/wf^{+}/gf/gf$ , with higher luminosity in the orange color, and a characteristic yellow color in the internal part of the rind. This combined effect of the  $wf$  and  $gf$  genes should be considered in ‘Charentais’ breeding programs to recover the orange flesh /green inner rind phenotype characteristic of this type of melons (Figure 10).



**Figure 10.** Variability in flesh color in different introgressions lines. Columns Left to right: VED, MAK\_2-3, MAK\_8-2, MAK\_2-1 and MAK\_9-2.





**Figure 11.** Comparison of the means of the set of ILs with the mean of the recurrent parent (VED) using the Dunnett’s test. The means and standard errors are shown for each trial (Paiporta 2015, UPV 2015 and Paiporta 2014). Gray bars show significantly different ( $p < 0.05$ ) IL and VED means. Traits evaluated are: Hunter coordinates, FCHI=flesh color luminosity (Figure 11A), FCa=flesh color  $a^*$  parameter (Figure 11B), FCB=flesh color  $b^*$  parameter (Figure 11C) and CIR= color of the inner rind scored visually (Figures 11D).

#### 2.3.4.6. Sugars content

Sugar content is one of the most important traits for seed companies and producers, as it is related to the organoleptic value of the fruits. Melon germplasm can be divided into sweet and non-sweet melons, which has been attributed to variability in a sucrose accumulator gene (Burger et al., 2002), but a large number of QTLs have been detected in sugar accumulation

traits, demonstrating that this trait has a very complex genetic control in melon (Diaz et al., 2011).

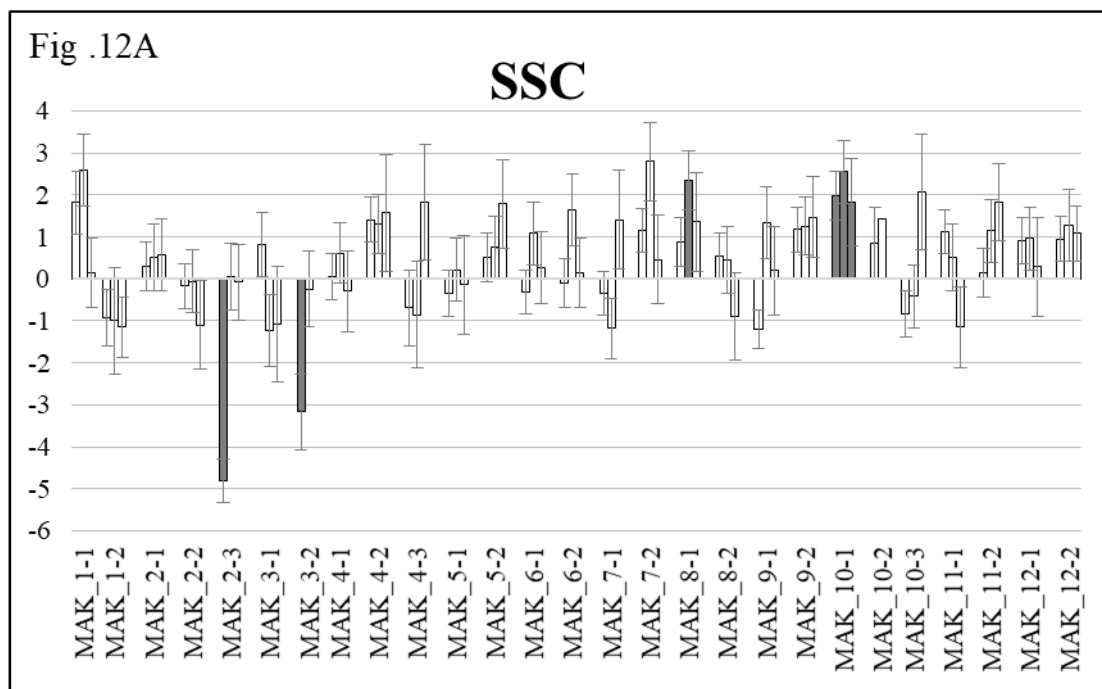
Soluble solids content, SSC, measured in the three environments, presented variable, low-to-moderate, values of heritability ( $h^2=0.08$  to  $0.5$ ), with the genotype effect being relatively modest (16.8 % of the total variation) but higher than the environmental effect (3.3 %) (Additional file 4). An important G x E interaction was detected in SSC (15.9 %). The content of specific sugars (sucrose, fructose and glucose) was measured in one environment, and also had low heritability values ( $h^2=0.29$ ,  $0.15$ , and  $0.22$ , respectively for each sugar).

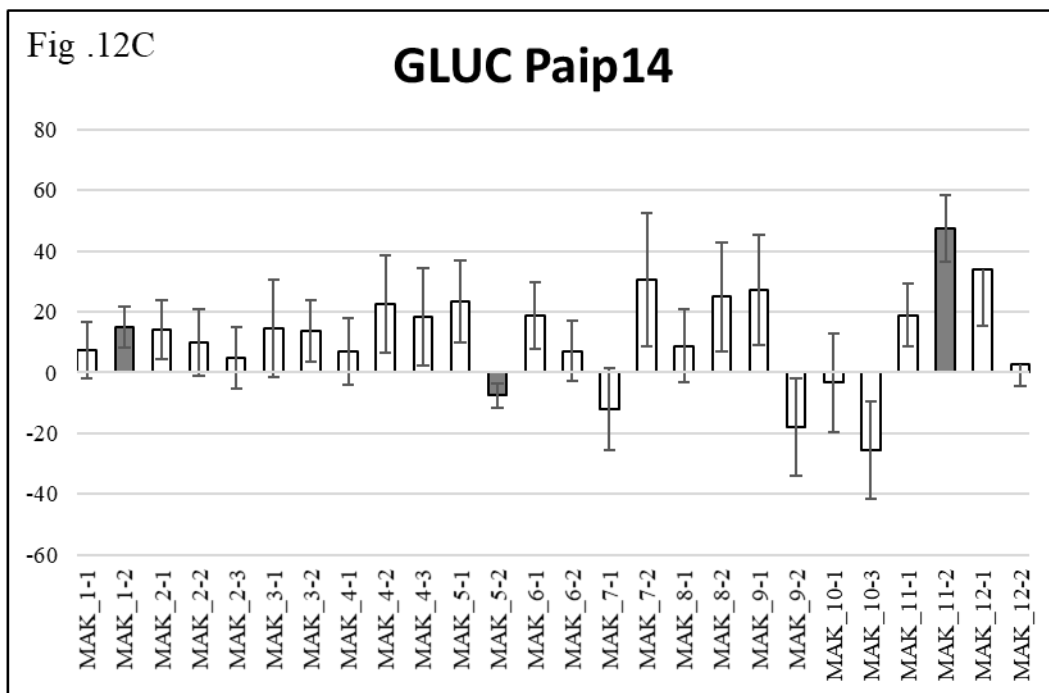
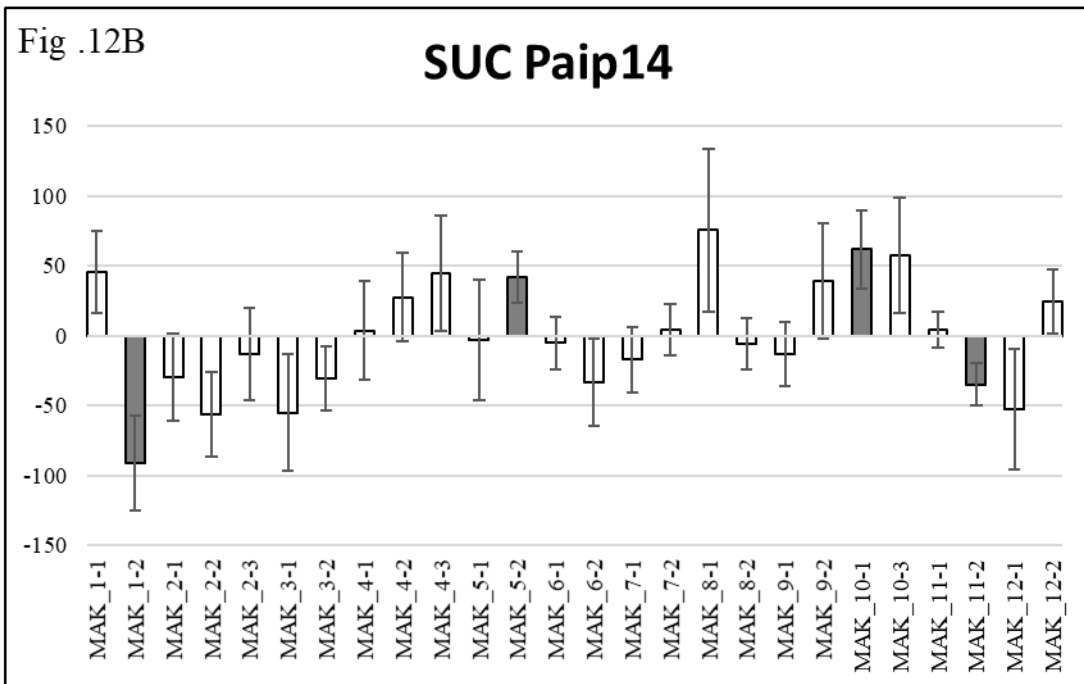
Despite the G x E interactions, fruits of the IL MAK\_10-1 had significantly higher SSC values than VED in the three environments (12.5 to 24.4 %) (Figure 6). This QTL, *ssc.10*, co-localizes with *suc.10*, which increases the sucrose amount of MAK\_10.1 fruits by 27.7 % compared to VED. Sugar accumulation is independent of climacteric behavior; in fact, non-climacteric cultivars are among the sweetest melons. However, some climacteric melons, such as the Charentais VED, suffer a rapid decay of sugar content after reaching full maturity. The major QTL on chromosome 10 co-localized with the region in which the ripening process was delayed (*al.10-ff.10- ar.10*) (Figure 1), so this higher sugar content could be related to the delay in the ripening process. Another line with significantly different sugar content than that of the recurrent parent was MAK\_5-2, which yielded fruits with significantly higher sucrose (17.9 %) and lower glucose (-8.6 %) and fructose (-5.8 %) (*suc.5*, *gluc.5* and *fruct.5*) (Figure 12 and Additional file 5). Argyris et al. (2015b) defined a QTL in chromosome 5 that affects sugar content in the PI 161375 x “Piel de sapo” population, but in this case, the alleles of PI 161375 reduced the sucrose content. To our knowledge, *suc.10* and *suc.5* are the first QTLs in which exotic alleles have been reported to increase the level of sucrose in melon.

Two other MAK regions were found to be involved in sugar variation. MAK\_1-2 had significantly reduced sucrose content (-39.4 %) and higher levels of glucose (18.3 %) than VED (Figure 6) (*suc.1*. and *gluc.1*) (Additional file 5). The introgression from MAK on chromosome 1 includes a Sulfur susceptibility gene (Perchepped et al., 2004). Sulfur dust is used to control powdery mildew in greenhouses, causing severe leaf necrosis and consequently has major effects on fruit development. The fact that MAK carries the susceptible allele could lead to the reduction in fruit sugar content resulting from a pleiotropic effect of Sulfur susceptibility. A similar effect was found in MAK\_11-2 with reduced sucrose (-15 %) and increased glucose (38%) and fructose contents (22.3 %) (*suc.11*, *fruc.11* and *gluc.11*), but this line is not sulfur sensitive (Additional file 5, Figure 12).

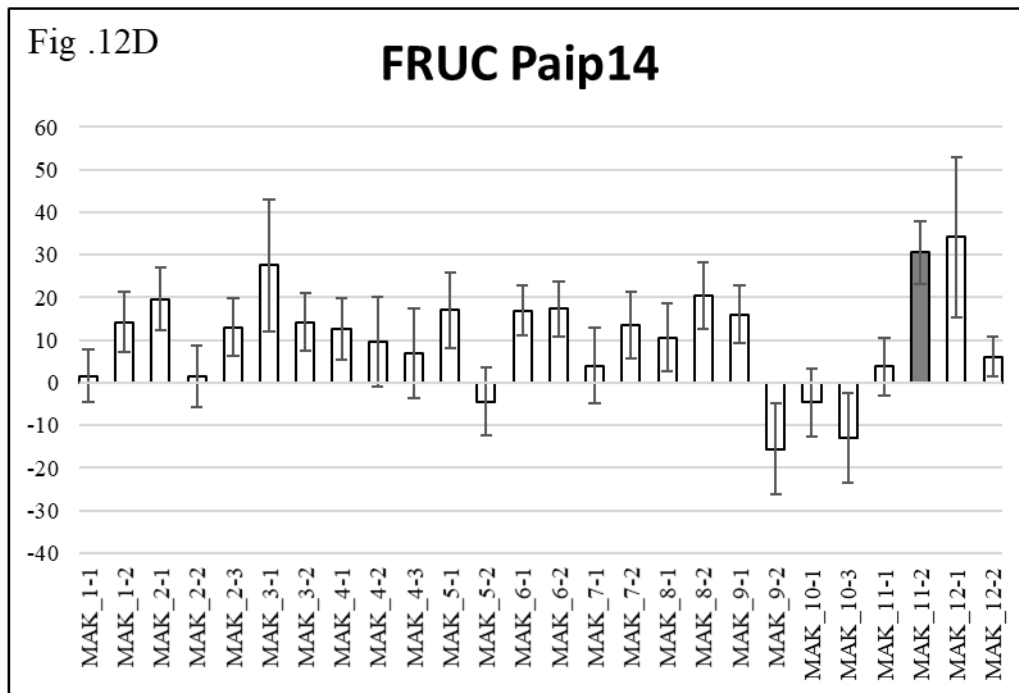
## Capítulo 2. Introgression Lines

Variation of sugar accumulation in sweet melons is controlled by a large number of QTLs, which have been mapped in all chromosomes, but are more frequent in chromosomes 2, 3, 5 and 8. Our results confirm the large effect of the G x E interaction reported in previous studies (Eduardo et al., 2007), but despite this effect, we can confirm the region previously found in chromosome 5, and suggest the existence of additional regions in chromosomes 1, 10 and 11. The major effect found in chromosome 10, which could be related to a delay in ripening, is of interest for maintaining an optimal sugar level during the ripening process in Charentais melons. The fact that no clear co-localization of QTLs with genes involved in sugar metabolism has been reported up to now (Harel-Beja et al., 2010; Leida et al., 2015) makes the identification of candidate genes difficult.









**Figure 12.** Comparison of the means of the set of ILs with the mean of the recurrent parent (VED) using the Dunnett’s test. The means and standard errors are shown for each trial (Paiporta 2015, UPV 2015 and Paiporta 2014). Gray bars show significantly different ( $p < 0.05$ ) IL and VED means. Traits evaluated are: SSC=soluble solids content in Brix degree (Figure 12A), SUC=sucrose (Figure 12B), GLUC=glucose (Figure 12C) and FRUC=fructose (Figure 12D), all in  $\mu\text{mol/gFW eq. Hexose}$ . For SUC, GLUC and FRUC, the mean of Paiporta 2014 is presented.

### 2.3.5. Stability of QTL detection in Backcrosses and ILs

The developed IL population was, as expected, more effective at detecting QTLs than the backcrosses. For example, none of the QTLs related to flowering and maturity time detected in the IL populations were detected in the backcross populations (Table 1). This result could be explained in part by the occurrence of a high G x E interaction (as observed for NMaF30, NFeF30 and Dmat, Additional file 4). A similar situation occurred with the QTLs related to fruit size, FW, FD and FL. However, in this case, the G x E interaction was not so important, suggesting that the results are more likely due to the different genetic structures of the populations. FW QTLs usually show an additive gene action (Fernández-Silva et al., 2008b), so the power to detect them in backcross populations is lower than in IL populations.

Conversely, the major QTL related to fruit shape, *fs.11*, was stable across populations (Table 1 and Additional file 5). This high stability of FS QTLs compared with FW may be explained by the common dominant gene action observed in melon FS QTLs (Fernández-Silva et al., 2008b), making their detection in backcrosses easier. A similar situation was found with QTL *ff.10*,

which is involved in flesh firmness variation. This trait, just like fruit shape, had a very low environmental effect and an only moderate G x E interaction. In addition, the strong genotype effect found for the flesh color traits, associated with almost no G x E interaction, along with the dominance of the major genes reported to be involved in flesh color, might account for the stability of the *fchl.9*, *fca.9* and *fc.9* QTLs.

We were also able to find several stable QTLs for SSC and specific sugars in chromosomes 1, 5 and 10 (Figure 1, and Additional file 5). This stability may facilitate their introduction in breeding programs.

## **2.4. Conclusion**

This work presents the first collection of ILs in a cantaloupe genetic background. This strategy of obtaining pre-breeding lines with characteristics of interest will encourage breeding in Charentais melons, one of the most commercially important types. The 27 ILs, selected after several cycles of backcrossing, selfing and marker-assisted selection, represent most of the MAK genome, with an average of 1.3 introgressions per line. This IL collection, phenotyped in three different environments and genotyped with a medium-throughput platform, has allowed us to study important traits in this crop and their association to certain genomic regions. The QTL detection performed using this IL collection has been demonstrated to be more effective compared to other populations, such as backcrosses. In total, 47 QTLs, significant in at least two IL assays, have been identified for traits related to fruit quality. Many have been detected in this work for the first time, while others confirm previously reported QTLs. The results presented herein, related to flowering and maturity time traits, fruit morphology, ripening behavior, rind characteristics, flesh color and sugars content, will not only facilitate the knowledge of the genetic control of these traits, but have also provided interesting lines for breeding, such as the one with delayed climacteric ripening behavior and sweeter fruits, or the small-fruited lines. Further genotyping with new high-throughput methods, such as GBS (Genotyping by sequencing), and new subIL sets with smaller introgressions, will allow these results to be confirmed, and will expand our knowledge of the candidate genes underlying these interesting QTLs.

### **List of abbreviations.**

SNP: Single Nucleotide Polymorphism; IL: Introgression lines; QTL quantitative trait locus; NGS: Next Generation Sequencing; SSR: Single Sequence Repeats; TILLING: Targeted Induced Local Lesions In Chromosome; MAS: Marker-assisted selection; CMV: Cucumber Mosaic Virus; VED: Vedrantaïs; MAK: Makuwa; BC: Backcross; NMaF30: Number of Male

## *Capítulo 2. Introgression Lines*

Flowers 30 days after the opening of the first female flowering on each plant; NFeF30: Number of Female Flowers 30 days after the opening of the first female flowering on each plant; DMat: Days to Maturity; FW: Fruit Weight; FL: Fruit Length; FD: Fruit Diameter; FS: Fruit Shape; CW: Cavity Width; FF: Flesh Firmness; AL: Abscission Layer; AR: External Aroma; RTh: Rind Thickness; Net: Netting; FCHI: Flesh Color Hunter Lab. L; FCa: Flesh Color Hunter Lab. a; FCb: Flesh Color Hunter Lab. b; CIR: Color of the Inner Rind; SSC: Soluble Solid Concentration; SUC: Sucrose; GLUC: Glucose; FRUC: Fructose; G: Genotype; E: Environment; LG: Linkage Group; wf: White Flesh; gf: Green Flesh.

### **Ethics (and consent to participate).**

Not applicable

### **Consent to publish.**

Not applicable

### **Competing interests.**

The authors declare they have no competing interests

### **Funding.**

This work has been carried out in the framework of the Programa de Valorización y Recursos Conjuntos de I+D+i de VLC/CAMPUS and has been funded by the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte as part of the Programa Campus de Excelencia Internacional. IL generation, genotyping and phenotyping was supported by SAFQIM project, AGL2012-40130-C02-02 of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO). The authors also wish to thank the MINECO project AGL2014-53398-C2-2-R, co-funded with FEDER funds.

### **Author's contributions.**

BP and AJM designed the study and contributed to the data analysis. GP and BP generated the populations and conducted the phenotyping and genotyping of backcrosses and IL collection in the different localities over the years, finally performing the data analysis and statistical computation. CE contributed to the genotyping and data analysis and to the manuscript draft. YG performed the chemical analysis of sugars. BP, GP and AJM drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Availability of data and materials.**

All the data supporting our findings are contained within the manuscript, in text, tables and figures and in the supplementary files.

### **Acknowledgments.**

The authors greatly appreciate the technical assistance of Eva Maria Martínez Pérez in the phenotypic analysis and that of Cristina Roig in the genotypic analysis. Authors thank M. Pitrat and U.S. Department of Agriculture, National Plant Germplasm System for providing part of the genotypes included in the core collection (established on the framework of a previous project MELRIP 2007–2010 and selfed, multiplied, characterized and conserved at COMAV-UPV) from which the accessions used in this study were selected.

## **2.5. Methods**

### **2.5.1. Plant material**

The two parents used to generate the IL population were the French cultivar Vedrantaís (VED) (*C. melo* subsp. *melo* var. *cantalupensis*, Charentais type) as recurrent parent and the Japanese accession Ginsen makuwa (MAK) (*C. melo* subsp. *agrestis* var. *makuwa*) as donor parent. VED and MAK were selected from a core germplasm collection established on the framework of a previous project MELRIP 2007–2010 (Esteras et al., 2013). Accessions of these core collection were multiplied and conserved in the genebank at COMAV-UPV. The MAK parent derived from accession PI 420176 (kindly provided by USDA, NPGS) after several selfing cycles. Both VED and MAK were morphologically characterized previously, along with a larger collection of melons, to confirm their classification in the corresponding horticultural group (Leida et al., 2015).

VED represents one of the most important market classes of cantaloupe melons. It produces medium-size, oval-to-round, sutured and orange-fleshed fruits, with a typical climacteric ripening behavior (with an autocatalytic production of ethylene during ripening), that are aromatic and have a medium sugar content. MAK fruits are small and oval. The flesh is white, sweet with little aroma, and shows a certain level of climacteric ripening behavior (Additional file 1). Makuwa cultivars are the only melon landraces belonging to subspecies *agrestis* that have a flesh sugar content similar to or even higher than that of sweet melons from subsp. *melo* (Kirkbride, 1993; Leida et al., 2015).

### **2.5.2. Breeding Scheme**

The F1 generation derived from the cross between VED and MAK was backcrossed with the recurrent VED parent to generate the BC1 population. Fifteen BC1 plants were then backcrossed with the recurrent parent thus producing fifteen BC2 families. A total of 420 BC2

## *Capítulo 2. Introgression Lines*

plants (28 per BC2 family) were genotyped at the seedling stage using a Sequenom iPLEX® Gold MassARRAY with a set of 154 SNPs evenly distributed throughout the melon genome (see details below). A subset of the 420 genotyped BC2 seedlings was selected according to their genotype: those having the highest proportion of the recurrent (VED) genome, and which contained MAK introgressions that, together, covered the entire donor (MAK) genome at least twice. The selected BC2 plants were grown in the greenhouse and backcrossed to construct the BC3 population.

A total of 363 BC3 plants were genotyped with the same set of SNPs, at the seedling stage, and were selected according to their genotype to produce the next generations. One set of selected BC3 plants, which had three or fewer MAK introgressions, was grown at the greenhouse and selfed. The BC3S1 offsprings were genotyped with the SNPs in the corresponding target introgressions by High Resolution Melting (HRM) (Vossen et al., 2009) in order to finally select plants with single homozygous introgressions. The HRM genotype of the selected BC3S1 plants was validated with the Sequenom array. The number of BC3S1 plants that were necessary to screen in each progeny to obtain single introgression lines ( $p=0.95$ ) was calculated from the binomial distribution of the allele segregation as previously described (Barrantes et al., 2014). Another set of selected BC3 plants, with four or more MAK introgressions, was also used to generate plants with single introgressions, but in two steps, as the number of progenies that needed to be screened by direct selfing to separate the introgressions was too high in this case. Then, these BC3 were first backcrossed and the resulting BC4 plants with single or double introgressions, identified by the HRM analysis, were then selfed to generate the BC4S1.

In some cases, the BC3S1 and BC4S1 that were ultimately selected were selfed again to remove a few remaining heterozygous markers and to produce seeds for the characterization assays. A first set of 27 ILs (including BC3S1, BC4S1, BC3S2 and BC4S2 plants) with single or double homozygous introgressions was characterized in the present paper. The genotype of these lines was validated again using the Sequenom array. This is a medium-sized IL population, 2 to 3 lines per chromosome, but it covers most of the MAK genome, having mostly single introgressions, and represents a set good enough for evaluating the breeding potential of the current population.

### **2.5.3. Markers and genotyping methods**

Genomic DNA was extracted from young leaves following the (Doyle and Doyle, 1990) method. The extracted DNA was dissolved in Milli-Q water, and the final concentration was adjusted to 10 ng/μl for the Sequenom and 30 ng/μl for the HRM genotyping.

SNPs were selected from those previously mapped in the melon genetic map used to anchor the first version of the melon genome (García-Mas et al., 2012). This map was constructed using a mapping population derived from the cross *C. melo* subsp *melo* var *inodorus* Piel de sapo and *C. melo* subsp *agrestis* var *conomon* Songwhan Charmi. The available map included 580 SNPs located in 249 different genetic positions (20.8 per chromosome, with an average genetic distance between markers of 4.1 cM, from 0.8 to 20.1 cM). A set of 144 of these mapped SNPs was selected according to their genetic positions, and 135 met the multiplexing requirements of Agena's Assay Designer used for the Sequenom iPLEX® Gold MassARRAY and could be implemented in the genotyping assay (representing 128 genetic positions, with an average distance of 8.2 cM, from 1.6 to 22.4 cM). Three of these markers could not be called accurately in the Sequenom assay, and thirteen failed to show the expected polymorphism between the IL parents (VED and MAK) (Additional file 2). An additional set of 35 SNPs was also added to the Sequenom array. These were selected from an SNP collection that had been validated by Sequenom in the study by (Leida et al., 2015) and had been generated in a previous resequencing study, using VED and MAK among other melon genotypes (Blanca et al., 2011) (Additional file 2). Most were located in candidate genes involved in sugar and ethylene metabolism, and some were found to be associated with these traits in (Ledía et al., 2015). All worked with the Sequenom assay and were polymorphic between VED and MAK. The final Sequenom array, with a total of 154 working and polymorphic SNPs, was used to genotype the full BC2 and BC3 populations, as well as the selected BC3S1 and the set of ILs selected for phenotyping. The Sequenom genotyping was done at the Epigenetics and Genotyping laboratory located at the Central Research Unit of the Faculty of Medicine (UCIM) belonging to the University of Valencia (Spain).

HRM genotyping with different subsets of these markers was also used to accelerate the selection and fixation of target introgressions during the construction of the IL population in several specific BC4, BC3S1, BC4S1, BC3S2 and BC4S2 offsprings. The PRIMER3 software program (Untergasser et al., 2012) was used to design the oligonucleotides for the HRM analysis. A total of 97 SNPs, out of the 154 employed in the full Sequenom platform, were adapted for HRM analysis.

#### **2.5.4. Agronomic evaluation and characters measured**

The intermediate backcross populations generated during the development of the IL population, BC2, BC3 and BC3S1, were fully genotyped at the seedling stage as described previously. Some of these genotyped plants were selected on the basis of their genotype (those with the highest proportion of VED genome and which contained MAK introgressions that, together, represented the entire MAK genome) and were transplanted to the greenhouse for phenotyping

## *Capítulo 2. Introgression Lines*

and for the generation of the next generation. A total of seventy-five BC2, one hundred BC3 and ninety-six BC3S1 plants were phenotyped in 2011, 2012 and 2013, respectively, during the spring-summer growing cycle at the greenhouse facilities of the Polytechnic University of Valencia (Valencia, Spain).

Additionally, twenty-seven lines of the final IL collection were evaluated in three trials, all conducted under greenhouse conditions. Two were conducted in spring-summer of 2014 and 2015 in the facilities of the Fundacion Cajamar in Paiporta (Valencia, Spain) (Paip14 and Paip15), and the third at the Polytechnic University of Valencia during the spring-summer of 2015 (UPV15). Each assay included six to eight plants of each of the 27 ILs that were grown in a fully randomized design along with five to ten plants of each parental line (VED and MAK). Flowers were hand-pollinated in Paip14 and UPV15, and insect pollination was used in Paip15 to produce two fruits per plant.

The UPV's greenhouse conditions used for all the backcross and for the UPV15 IL phenotyping assays were as follows: growing cycle from March to July in a glass greenhouse with automatic control of temperature with cooler and automatic window aperture (with a temperature range of 8 to 15°C and of 25 to 32°C, minimum and maximum during the whole growing cycle). Plants were grown in 15-L pots with a substrate of 100 % coconut fiber.

The greenhouse conditions of the Fundacion Cajamar, used for the Paip14 and Paip15 IL phenotyping assays were as follows: growing cycle from March to July in a glass greenhouse with automatic control of temperature with cooler and automatic window aperture (with a temperature range of 10 to 25/10 to 20 and of 25 to 37/18 to 35, minimum and maximum during the whole growing cycle for Paip2014/2015, respectively). Plants were grown in substrate bags of 29 kg (70 % coconut fiber and 30 % coconut chips). In both cases, nutrients were provided through the irrigation system and pruning was done manually when necessary to regulate vegetative growth and flowering.

Each plant was phenotyped for traits related to flowering, days to maturity and fruit quality. Regarding flowering, the number of male and female flowers 30 days after the opening of the first female flower on each plant was counted (NMaF30 and NFeF30). Also, the days to maturity (DMat), which is the number of days from the date of hand-pollination to the harvest, were counted for each fruit. Two fruits per plant were set and characterized at full maturity. The following traits were measured for each fruit: fruit weight (FW in grams, with digital scale), fruit length and diameter (FL, FD in mm, with graduated rule), fruit shape index (FS, as the ratio of fruit length to fruit diameter), cavity width (CW, as the ratio of the width of the seminal cavity to the fruit diameter), flesh and rind thickness (Fth, Rth in mm, with electronic digital caliper, I.C.T, S.L., La Rioja, España), rind and flesh firmness (RF, FF, measured as kg/cm<sup>2</sup>

with a fruit pressure tester, FT 327, with a plunger diameter of 8 mm, Alfonsine, Italy), the formation of an abscission layer, the external aroma of the whole fruit and the netting occurrence (AL, AR, NET, scored visually as 0, absent and 1, present), flesh color measured with a CR-400 colorimeter, Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan (coordinates Hunter Lab. L\* express luminosity (L=0 black and L=1 white), a\* expresses the color direction between red (positive) and green (negative) and b\* expresses the color direction between yellow (positive) and blue (negative)) (FCHI, FCa, FCb), color of the inner rind, CIR (scored visually as 0, green and 1, yellow) and soluble solids concentration (SSC) (measured as °Brix from drops of juice with a hand-held “Pocket” refractometer (PAL- $\alpha$ ), Atago CO., LTD, Tokyo, Japan). Flesh firmness, color and total soluble solids were measured at two points in the equatorial region of the mesocarp. In addition to SSC, sucrose, glucose and fructose (SUC, GLUC and FRUC) were quantified ( $\mu\text{mol/gFW}$  eq. Hexose) in fruits of the BC3, BC3S1 and Paip14 assays, where flesh samples were taken from the same regions in the equatorial slice of the fruit used for firmness, flesh color, Brix and pH measurements. Flesh tissue was shock frozen in liquid nitrogen and ground to homogeneity. Aliquots of about 20 mg were weighted and sent to INRA Bordeaux on dry ice for analysis. Metabolites were extracted by ethanolic fractionation as in Hendriks et al. (2003). Glucose, fructose and sucrose were determined enzymatically in the ethanolic supernatant as in (Jelitto et al., 1992). Assays were performed in 96-well polystyrene microplates using Starlet pipetting robots (Hamilton, Villebon-sur-Yvette, France), and absorbance was read at 340 nm in MP96 microplate readers (SAFAS, Monaco).

### **2.5.5. Association analysis in backcross families**

The phenotypic and genotypic data of the backcross populations (BC2, BC3 and BC3S1) were used to detect significant associations between markers and phenotypic values. The association analysis was performed using TASSEL v. 5 (Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage) (Bradbury et al., 2007) for both approaches: a general linear model (GLM) and a mixed linear model (MLM) analysis using a kinship matrix as cofactor to avoid spurious associations due to relatedness and population structure. Associations were considered statistically significant at  $p < 0.005$ . We considered as associations those that were significant with both the GLM and MLM approaches, or those that were significant with the GLM and which were later validated in the IL analysis. Genotype effects and percent of phenotypic variance explained by each marker were also calculated.

### **2.5.6. QTL analysis in introgression lines**

IL data in the three environments were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) that was performed in order to examine the effects of genotype, environment and genotype-x-environment interaction. Estimation of heritability ( $h^2 = \text{VarG}/(\text{VarG} + \text{VarE})$ ) was performed for



## *Capítulo 2. Introgression Lines*

each trait and environment by calculating the variance components from the mean squares (MS) within and between the ILs with a hierarchical ANOVA ( $MS_{\text{between}} = \text{VarE} + n \text{VarG}$  and  $MS_{\text{within}} = \text{VarE}$ , where  $\text{VarG}$  = genotypic variance,  $\text{VarE}$  = environmental variance, and  $n$ =number of plants per IL).

Furthermore, the mean of every IL in each environment was compared to the control VED mean with the Dunnett's test at  $p < 0.05$ . QTLs for each trait in the MAK introgression were considered to exist in those lines that had means that were significantly different from VED in at least two localities.

**Additional files**

**Additional file 1.** Fruits of the two parents used to generate the IL population and the corresponding F1. From left to right: the cultivar Vedrantaís (VED) (*C. melo* subsp. *melo* var. *cantalupensis*, Charentais type) used as recurrent parent, Ginsen makuwa (MAK) (*C. melo* subsp. *agrestis* var. *makuwa*) used as donor parent, and their F1.

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870\\_2016\\_842\\_MOESM1\\_ESM.pptx](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870_2016_842_MOESM1_ESM.pptx)

**Additional file 2.** SNPs used for the construction of the IL population. Background SNPs Sequenom-HRM: These were selected from those previously mapped in the melon genetic map used to anchor the first version of the melon genome (García-Mas et al., 2012). The map position is indicated according to the map used to anchor the genome (García-Mas et al., 2012) as well as a new version of the genetic map (Argyris et al., 2015a). The physical position in the last version of the melon genome (v3.5.1) available at [www.melonomics.net](http://www.melonomics.net) is indicated. The SNP and flanking sequence is included for all the markers used in the Sequenom assay, and the primers for those that were adapted to the HRM genotyping procedure are also provided. Markers that could not be accurately called in the Sequenom assay and that failed to show the expected polymorphism between the IL parents (VED and MAK) are marked as failed markers (f). SNPs in candidates: Additional set of SNPs located in candidate genes reported to be involved in sugar and ethylene metabolism. These markers were validated in Leida et al. (2015) and had been generated in a previous resequencing study, using VED and MAK among other melon genotypes (Blanca et al., 2012). The physical position in the last version of the melon genome (v3.5.1) available at [www.melonomics.net](http://www.melonomics.net) is indicated. The SNP and flanking sequence is included for all the markers used in the Sequenom assay.

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870\\_2016\\_842\\_MOESM2\\_ESM.xlsx](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870_2016_842_MOESM2_ESM.xlsx)

**Additional file 3.** Graphical genotype of the 27 ILs selected in this study for agronomic characterization in three trials. Rows from top to bottom: marker names, melon chromosome, genetic position according to García-Mas et al. (2009) for the background markers (the SNPs located in candidate genes are not mapped and are located according to their physical position indicated in Additional File 2), and the SNP allele (VED/MAK). Green boxes indicate MAK homozygous introgressions, and blue lines VED genetic background.

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870\\_2016\\_842\\_MOESM3\\_ESM.xlsx](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870_2016_842_MOESM3_ESM.xlsx)

## Capítulo 2. Introgression Lines

**Additional file 4.** Mean, standard deviation (SD) and range values of the number of male and female flowers 30 days after the opening of the first flower (NMaF30 and NFe30), days to maturity (DMat), fruit weight (FW), fruit length (FL), fruit diameter (FD), fruit shape (FS), cavity width (CW), flesh firmness (FF), presence of abscission layer (AL), aroma (AR), rind thickness (RTh), netting (Net), flesh color parameters (FCHL, FCa and FCb), color of the inner rind (CIR), soluble solids content (SSC), and sucrose, glucose and fructose content (SUC, GLUC and FRUC) of both parents, VED and MAK, their F1 and the IL population assayed in three experiments. In the VED and MAK data, asterisks in rows indicate significant mean differences between trials ( $p < 0.05$ ), and in the columns between parents; ns (not significant differences), na (not available). Estimation of heritability ( $h^2 = \text{VarG} / (\text{VarG} + \text{VarE})$ ) was performed for each trait and environment by calculating the variance components from the mean squares (MS) within and between ILs with an ANOVA ( $\text{MS}_{\text{between}} = \text{VarE} + n \text{VarG}$  and  $\text{MS}_{\text{within}} = \text{VarE}$ , where  $\text{VarG}$  = genotypic variance,  $\text{VarE}$  = environmental variance, and  $n$  = number of plants per IL). Data of the ILs in the three environments were analyzed using a two-factor ANOVA that was performed to examine the effect of genotype, environment and genotype-x-environment interaction. The percentage of variance explained by each effect (genotype, environment and the interaction) is indicated (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  and ns (no significant differences)).

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870\\_2016\\_842\\_MOESM4\\_ESM.docx](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870_2016_842_MOESM4_ESM.docx)

**Additional File 5.** List of all QTLs detected with the Dunnett's test in at least two of the three trials performed with the selected IL collection. Abbreviated trait name as in Additional file 4, QTL name, chromosome, QTL position (cM) and flanking markers, according to the phenotype of overlapping lines, number of trials in which the QTL was detected, MAK effect relative to the VED parental (%) with positive/negative effects indicating that MAK alleles increase/decrease the value of the trait, IL introgression position (cM) and flanking markers.

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870\\_2016\\_842\\_MOESM5\\_ESM.xlsx](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870_2016_842_MOESM5_ESM.xlsx)

**Additional file 6.** Correlation coefficient ( $p < 0.05$ ) of the traits used for phenotyping the ILs in the three trials: Paip15, UPV15 and Paip14. Dark grey represents positive correlations and light gray represents negative correlations. Abbreviated trait name as in Additional file 4.

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870\\_2016\\_842\\_MOESM6\\_ESM.xlsx](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-016-0842-0/MediaObjects/12870_2016_842_MOESM6_ESM.xlsx)

**CAPÍTULO 3: ‘MAK-10’: A LONG SHELF-LIFE  
CHARENTAIS BREEDING LINE DEVELOPED  
BY INTROGRESSION OF A GENOMIC REGION  
FROM MAKUWA MELON**



### **CAPÍTULO 3: ‘MAK-10’: A long shelf-life Charentais breeding line developed by introgression of a genomic region from Makuwa melon.**

De todas las ILs descritas en el capítulo anterior, se seleccionó la línea MAK\_10-1 por tener muy buenas características para el desarrollo de nuevas variedades. El fenotipo ya se había confirmado con anterioridad en tres ambientes, pero se añadió un ambiente extra con el objetivo de poder realizar un estudio comparativo entre el parental recurrente y la línea candidata, para caracteres de morfología, calidad de fruto y contenido en azúcares y ácidos. El artículo se publicó en la revista *HortScience*.

Este trabajo se llevó a cabo en el marco del Programa de Valorización y Recursos Conjuntos de I+D+i de VLC/CAMPUS financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte como parte del Programa Campus de Excelencia Internacional. La generación de ILs, así como el genotipado y fenotipado de las líneas, fue financiada por el proyecto Plant KBBE project (SAFQIM: SUGARS AND FRUIT QUALITY IN MELON PIM2010PKB-00691, del Ministerio de Ciencia e Innovación), y por los proyectos AGL2012-40130-C02-02 y AGL2014-53398-C2-2-R del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), todos cofinanciados con fondos FEDER.

En el marco de estos proyectos el trabajo se llevo a cabo por el grupo de Mejora genética de Cucurbitaceas del COMAV en colaboración el grupo de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP-CSIC de la UPV, liderado por Antonio J. Monforte, y por la Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria COMAV-UPV, liderado por Jaime Cebolla.



## **CAPÍTULO 3: ‘MAK-10’: A long shelf-life Charentais breeding line developed by introgression of a genomic region from Makuwa melon.**

Gorka Perpiñá<sup>1</sup>, Jaime Cebolla-Cornejo<sup>1</sup>, Cristina Esteras<sup>1</sup>, Antonio J. Monforte<sup>2</sup>, Belén Picó<sup>1</sup>.

Emails address: [gorperma@euita.upv.es](mailto:gorperma@euita.upv.es); [jaicecor@btc.upv.es](mailto:jaicecor@btc.upv.es); [criesgo@btc.upv.es](mailto:criesgo@btc.upv.es); [amonforte@ibmcp.upv.es](mailto:amonforte@ibmcp.upv.es); [mpicosi@btc.upv.es](mailto:mpicosi@btc.upv.es)

<sup>1</sup> Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

*Additional index words:* ripening behavior, flesh firmness, climacteric, cantaloupe, sugars content

Referencia: Perpiñá, G., Cebolla-Cornejo, J., Esteras, C., Monforte, A. J., & Picó, B. (2017). ‘MAK-10’: A Long Shelf-life Charentais Breeding Line Developed by Introgression of a Genomic Region from Makuwa Melon. *HortScience*, 52(11), 1633-1638. DOI:[10.21273/hortsci12068-17](https://doi.org/10.21273/hortsci12068-17)

### **3.1. Abstract**

‘MAK-10’ is a new breeding line derived from a collection of introgression lines developed from the cross between the Japanese cultivar ‘Ginsen makuwa’ PI 420176 (*Cucumis melo* Group Makuwa) and the French cantaloupe variety ‘Vedrantais’ (*Cucumis melo* Group Cantalupensis, Charentais type). ‘MAK-10’ and ‘Vedrantais’ do not differ in traits related to flowering and fruit morphology. However, ‘MAK-10’ fruits present a delayed ripening process, lacking abscission layer and external aroma. These changes in ripening provide fruits with delayed flesh softening and higher sugar content, both while attached to the plant and after harvesting. These characteristics make ‘MAK-10’ useful to extend the harvesting period and the shelf life of Charentais melons.

Melon (*Cucumis melo* L.) is a highly polymorphic cucurbit (Esteras et al., 2012; Pitrat 2017). Intra-specific variation in many fruit traits has been described, including variation in the ripening behavior, with a continuous spectrum from climacteric to non-climacteric varieties (Ezura and Owino, 2008; Saladié et al., 2015). Climacteric melons, such as those of the Cantalupensis group, exhibit a sudden rise in respiration accompanied by an autocatalytic



ethylene synthesis at the onset of the ripening (Pech et al., 2008), absent in non-climacteric fruits.

Ripening behavior greatly affects fruit quality at harvest and during post-harvest conservation (Rose et al., 1998; Saladié et al., 2015). Some of the processes that occur during the climacteric ripening, such as the formation of the abscission layer and the synthesis of aroma volatiles, are ethylene dependent, whereas the sugar accumulation is ethylene-independent, and both ethylene-dependent and independent flesh softening have been described (Pech et al., 2008).

There are many reports focused on the genetics of the melon fruit ripening process. The abscission layer formation has been reported to be controlled by two duplicated independent *loci* (*Al-3* and *Al-4*) located in chromosomes 8 and 9 (Périn et al., 2002b). Additional QTLs involved in the ripening process have been found in chromosomes 1, 2, 3, 6 and 11 (Moreno et al., 2008; Vegas et al., 2013). Several genes acting in different steps of the ripening process have been cloned, such as those involved in the ethylene biosynthesis pathway (*CmACS* (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) and the *CmACO* (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase) genes), and orthologs of the main transcription factors involved in ethylene signaling (NAC transcription factor family and the HD-zip family) (Giovannoni, 2007; Lin et al., 2008; Saladié et al., 2015). Also genes associated to sugar accumulation and fruit softening have been identified that are differentially expressed between climacteric and non-climacteric melons (Dai et al., 2011; Leida et al., 2015; Saladié et al., 2015; Zhang et al., 2016). Many studies have been performed using cultivars with contrasting phenotypes for the ripening process, non-climacteric (*Inodorus* group) and fully climacteric (*Cantalupensis* group) melons. Additionally, the variability found in this trait in Asian melons (belonging to the *Conomon* or *Makuwa* groups) that have an intermediate ripening behaviour (Guo et al., 2017) is also being explored (Moreno et al., 2008; Zhang et al., 2015).

Cantaloupe varieties are one of the melon market classes with highest economic value. Two of the main objectives of cantaloupe breeding are to extend the harvesting period and the post-harvest life maintaining fruit quality. Thus, the knowledge of the genetic basis of ripening behavior is essential for cantaloupe breeding programs. The modification of the ripening process in cantaloupe melons has been accomplished through silencing the *CmACO1* gene (Ayub et al., 1996; Pech et al., 2008) and through the induction of mutations in this gene that provide an enhanced shelf life phenotype (Dahmani-Mardas et al., 2010).

In this report, we describe the ripening pre and post-harvest behavior of a melon breeding line ('MAK-10') obtained from a collection of introgression lines (ILs) developed from the cross between a Japanese cultivar of the *Makuwa* group and the French cantaloupe variety 'Vedrantais' (Perpiñá et al., 2016). 'Vedrantais' represents one of the most important market

classes of the Charentais type. It produces medium-size, global to flattened, sutured and orange-fleshed fruits, with a full climacteric ripening behavior, aromatic and with medium sugar content. ‘Ginsen makuwa’ plants have an early female flowering and their fruits are small and oval with a thin and smooth rind, and sweet white flesh with little aroma. They have a climacteric behavior intermediate between full climacteric and non climacteric melons (Leida et al., 2015; Saladié et al., 2015). Makuwa melons do not form a clear abscission layer, while ‘Vedrantais’ melons drop off the plant when reach a commercially ripe stage. The IL ‘MAK-10’ has an introgression in the chromosome 10 of the ‘Ginsen makuwa’ genome into the ‘Vedrantais’ genetic background (Perpiñá et al., 2016). This introgression does not alter plant and fruit traits other than the ripening process. ‘MAK-10’ fruits are morphological and organoleptically similar to ‘Vedrantais’ fruits, but lack abscission layer and external aroma at full maturity. They maintain a higher flesh firmness and sugar content at maturity before and after harvesting. Therefore, ‘MAK-10’ may be an interesting source of genetic variability to develop new ‘Vedrantais’ cultivars with an improved post-harvest life.

### 3.2. Origin

The melon breeding line ‘MAK-10’ was obtained from an introgression line collection by introgressing the genome of ‘Ginsen makuwa’ PI 420176 (MAK) into the genetic background of the climacteric French ‘Vedrantais’ cultivar (VED) (Perpiñá et al., 2016). The whole IL collection was phenotyped in two locations: the greenhouse facilities of the Universitat Politècnica de València and of the Fundación Cajamar in Paiporta (Latitude 39° 25’ 2.208’’ N, Longitude 0° 25’ 3, 01’’ W and Altitude 17 m) (both in Valencia, Spain) in three independent assays in which ‘MAK-10’ fruits showed an altered ripening phenotype, without abscission layer, low external aroma, and higher flesh firmness, soluble solids and sucrose content than VED fruits at commercial maturity. This line was selected from the BC3S1 generation after marker assisted selection (MAS) using the Sequenom MassARRAY genotyping technology with SNPs evenly distributed through the genome. ‘MAK-10’ has a major MAK homozygous introgression of 1.05 Mb located in chromosome 10 (between markers CMPSNP172 and CMPSNP65, Perpiñá et al., 2016) into the VED background, not shared with any other IL of the collection.

‘MAK-10’ BC3S1 plants were selfed to produce BC3S2 seeds. These seeds were used to perform a new characterization assay, aimed to confirm the effect of the introgression. Thirty plants of each VED and ‘MAK-10’ were cultivated in the greenhouse facilities of the Fundación Cajamar in Paiporta, in the spring-summer season 2016 (from March to July). Plants were grown in substrate bags (70 % coconut fiber and 30 % coconut chips) and nutrients were

provided through the irrigation system. Each plant was phenotyped for traits related to flowering (number of male and female flowers 15 and 30 days after the opening of the first female flower, coded NMaF15, NFeF15, NMaF30 and NFeF30). The plants were self-pollinated and the fruits were sequentially harvested at different days after pollination (DAP), from 30 to 34, from 35 to 39, from 40 to 44, from 45 to 49, from 50 to 55 and >55 DAP. Additionally, fruits of the two genotypes collected at 40-44 and at 50-55 DAP were stored in a chamber at room temperature and phenotyped at 5 and 10 days after harvesting (DAH), with the aim to study the post-harvest behavior. All the fruits were phenotyped for the following traits with the methodology described by Perpiñá et al. (2016): fruit weight (FW), fruit length and diameter (FL and FD), cavity width (CW), flesh and rind thickness (Fth and Rth), flesh firmness (FF), presence of abscission layer, and netting occurrence (AL and NET), flesh color (FCHI, FCa, FCb) and soluble solids content (SSC). An olfactory sensory evaluation of the external aroma of the whole fruit was also performed, to determine if fruits have external aroma similar to that of VED or were non-aromatic as MAK (AR).

A cross section of 5 cm was obtained from the equatorial plane of each fruit. This sample was used for the quantification of sugars (sucrose, glucose and fructose) and organic acids (citric, malic and glutamic) via capillary electrophoresis with the methodology described by Cebolla-Cornejo et al., (2012) with an Agilent 7100 system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Results were expressed in grams per kilogram of fresh weight. Sucrose equivalents were calculated multiplying sucrose, glucose and fructose contents by their relative sweetening power, 1, 0.74 and 1.73 respectively, and adding them up (Koehler and Kays, 1991).

### 3.3. Description

#### 3.3.1. 'MAK-10' and VED do not differ in flowering time and fruit morphology

'MAK-10' and VED did not show differences in a number of traits related to flowering time and fruit morphology. Both lines flowered the same week after transplanting and had similar number of male (NMaF15 and NMaF30 were  $3.90 \pm 0.57$  and  $6.95 \pm 0.55$  versus  $4.11 \pm 0.25$  and  $7.10 \pm 0.39$  flowers, for 'MAK-10' and VED respectively) and female (NFeF15 and NFeF30 were  $2.66 \pm 0.24$  and  $1.66 \pm 0.34$  versus  $2.21 \pm 0.16$  and  $2.05 \pm 0.18$ ) flowers per plant, at 15 and 30 days after the opening of the first female flower.

'MAK-10' and VED fruits also did not differ in size and morphology during the ripening process, showing similar fruit weight, length, diameter, cavity width, flesh and rind thickness, and rind netting at most DAP (Table 1). Therefore, despite the early flowering, the small fruit size, the oval shape, and the thin and smooth rind of the MAK fruits (Perpiñá et al., 2016), the

MAK introgression from chromosome 10 into the VED background of line ‘MAK-10’ did not alter these traits.

**Table 1.** Mean and standard error of fruit weight (FW), fruit length (FL), fruit diameter (FD), cavity width (CW), rind thickness (Rth), flesh thickness (Fth), flesh firmness (FF), presence/absence of abscission layer (AL), aroma (AR) and netting (NET), soluble solids content (SSC) and flesh color (parameters FCHI, FCa, FCb) in ‘Vedrantais’ (VED) and ‘MAK-10’ fruits<sup>z</sup> collected at 30-34, 35-39, 40-44, 45-49, 50-55 and >55 days after pollination (DAP).

DAP	Genotype	FW (gr)		FL (mm)		FD (mm)		CW (%)		Fth (mm)		Rth (mm)		FF (Kg/cm2)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
30-34	‘MAK-10’	584.00	47.04	9.57	0.32	10.68	0.22	49.72	1.77	21.62	1.14	4.25	0.71	4.40	0.65
	VED	616.37	52.87	9.80	0.32	10.59	0.28	48.70	1.81	21.14	0.95	5.44	0.37	6.60	0.71
35-39	‘MAK-10’	460.33	25.78	8.93	0.23	9.80	0.23	49.38	2.46	20.05	2.40	3.42 *	0.12	3.40 *	0.21
	VED	580.00	103.24	9.46	0.40	10.52	0.67	50.47	4.16	22.98	3.14	4.70 *	0.18	5.52 *	0.24
40-44	‘MAK-10’	577.60	39.32	9.36	0.22	10.52	0.27	52.30	1.37	21.51	0.43	4.14	0.48	4.42	0.52
	VED	534.11	32.25	9.48	0.17	10.17	0.22	49.16	0.85	21.61	1.13	3.77	0.21	3.57	0.21
45-49	‘MAK-10’	476.25	27.57	8.70	0.17	10.10	0.17	50.64	2.72	19.65	1.08	4.20	0.42	4.27 *	0.33
	VED	498.00	32.99	9.04	0.25	9.99	0.21	48.18	1.18	20.61	0.80	3.68	0.42	2.36 *	0.33
50-55	‘MAK-10’	667.43	71.20	9.70	0.42	10.84	0.40	51.43 *	2.42	23.97	1.28	3.45	0.37	3.28 *	0.36
	VED	498.20	24.40	8.56	0.26	9.62	0.31	43.29 *	1.26	22.35	2.54	4.03	0.33	1.38 *	0.32
>55	‘MAK-10’	492.00	106.00	8.75	0.15	10.4	0.60	45.88	2.75	26.3	1.36	3.40	0.10	5.00	0.10
	VED	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DAP	Genotype	AL <sup>y</sup>		AR <sup>y</sup>		NET <sup>y</sup>		FCHI		FCa		FCb		SSC (°Brix)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
30-34	‘MAK-10’	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	64.15	2.97	-4.95 *	0.76	19.58 *	0.34	5.60	0.27
	VED	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.16	55.59	2.82	4.42 *	1.40	21.70 *	0.48	6.58	0.35
35-39	‘MAK-10’	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	59.58	3.60	4.71	4.31	21.12	1.12	7.03	1.13
	VED	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	0.20	66.19	3.36	6.17	1.65	23.72	0.51	7.40	0.97
40-44	‘MAK-10’	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	63.91 *	0.98	6.47	1.96	23.80	1.05	9.64	1.14
	VED	0.28	0.11	0.33	0.11	0.83	0.09	53.69 *	1.55	6.97	1.44	22.43	0.55	11.21	0.62
45-49	‘MAK-10’	0.00 *	0.00	0.00 *	0.00	1.00	0.00	54.65	1.75	8.25	1.32	23.19	0.65	13.65	0.64
	VED	1.00 *	0.00	1.00 *	0.00	1.00	0.00	56.56	2.81	9.90	0.53	24.08	1.03	13.08	0.91
50-55	‘MAK-10’	0.00 *	0.00	0.00 *	0.00	1.00	0.00	54.53	0.72	10.92 *	0.46	23.25	0.49	15.68 *	0.32
	VED	1.00 *	0.00	1.00 *	0.00	1.00	0.00	49.48	3.62	6.84 *	0.63	20.04	1.63	12.76 *	0.64
>55	‘MAK-10’	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	54.38	1.08	12.60	1.30	24.48	0.00	15.90	0.30
	VED	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>z</sup> Six fruits of each days after pollination (DAP) and genotype were phenotyped except for VED at >55 DAP (rotten fruits were not analyzed).

<sup>y</sup> AL, AR and NET are abscission layer (1: present as in VED, 0:absent as in MAK), external aroma of the whole fruits (1: present as in VED, 0: absent as in MAK), netting (1: presence, 0, absence). All the other traits were evaluated as described in Perpiña et al. (2016).\* are significantly different according to the Least Significant Difference test (LSD) (P ≤ 0.05) between ‘MAK-10’ and ‘Vedrantais’ (VED).

### 3.3.2. 'MAK-10' differ from VED in the ripening process

One of the traits associated to the ripening process is flesh firmness. VED fruits presented a typical profile of flesh firmness evolution (Rose et al., 1998) with a continuous decrease of firmness (FF ranging from  $6.60 \pm 0.71$  to  $1.38 \pm 0.32$  kg/cm<sup>2</sup> at 30-34 and 50-55 DAP, respectively) (Figure 1). However, the firmness of 'MAK-10' fruits remained constant during the ripening process (FF of  $4.40 \pm 0.65$  and  $3.28 \pm 0.36$  kg/cm<sup>2</sup> at 30-34 and 50-55 DAP).

VED fruits started to form the abscission layer (AL) at 40-44 DAP and at 50-55 DAP most of the VED fruits had dropped from the plant and we could not harvest fruits after 55 DAP. 'MAK-10' fruits did not form AL during the whole ripening process (Table 1), and even after 55 DAP the fruits remained attached to the plant.

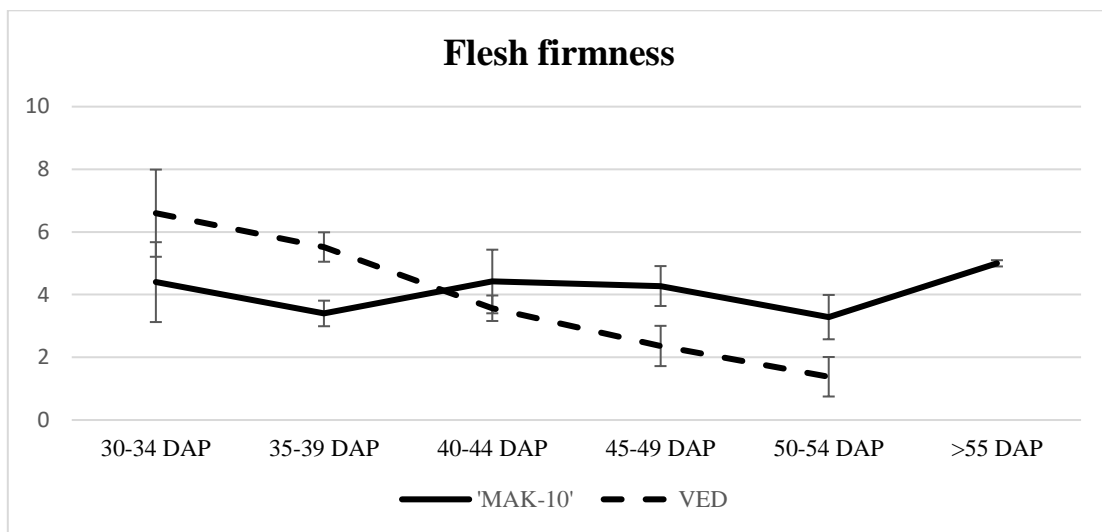
The formation of the abscission layer is an external signal of maturity of climacteric fruits and is associated to the occurrence of external aroma. VED fruits reached full maturity from 40 to 49 DAP, exhibiting at this time appropriated flesh firmness and soluble solids content, according to commercial standards (FF from  $3.57 \pm 0.21$  to  $2.36 \pm 0.33$  kg/cm<sup>2</sup> and SSC from  $11.21 \pm 0.62$  to  $13.08 \pm 0.91$  °Brix, at 40-44 and 45-49 DAP respectively). VED fruits collected later, at 50-55 DAP were over ripen, with very soft flesh (FF  $1.38 \pm 0.32$  kg/cm<sup>2</sup>). 'MAK-10' fruits collected at the VED ripening time (from 40 to 49 DAP) also met commercial requirements, although with a slight delay in the accumulation of SSC (FF from  $4.42 \pm 0.52$  to  $4.27 \pm 0.33$  kg/cm<sup>2</sup> and SSC from  $9.64 \pm 1.14$  to  $13.65 \pm 0.64$  °Brix, at 40-44 and 45-49 DAP respectively). At this time 'MAK-10' fruits were netted with rinds turning to yellow, external signals of maturity also found in VED fruits. The fruits of 'MAK-10' collected after 50 DAP were not over ripen, and still met commercial requirements for FF and SSC, even having SSC values higher than those of the VED fruits (SSC  $12.76 \pm 0.64$  °Brix *versus*  $15.68 \pm 0.32$  °Brix, for VED and 'MAK-10' respectively).

Differences in flesh properties were further studied by analyzing sugar and acid profiles in both lines during the ripening process. Both, showed the typical profile of sugar evolution (Burger et al., 2006; Zhang et al., 2016), with the hexoses content, fructose and glucose, being almost constant during the ripening process and sucrose accumulation bursting during the last phase of ripening (Figure 2). The differences between 'MAK-10' and VED resided in the higher sugar content of the introgression line, starting at 45-49 DAP and at 50 to 55 DAP for hexoses and sucrose levels respectively. Consequently, sucrose equivalents, a variable directly linked with sweetness perception was considerably higher in 'MAK-10' by the end of the ripening process. Apart from the higher sugar content observed in 'MAK-10', this line exhibited a delay in the profile of sugar accumulation (Figure 2). For example, VED tended to decrease hexoses content

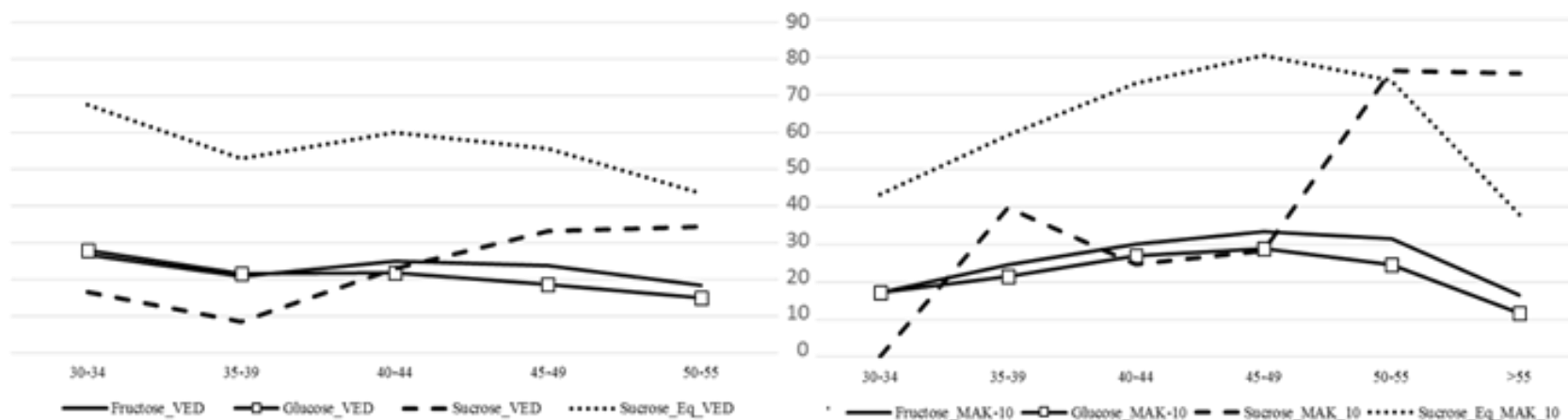
from 40-44 DAP, whereas this decrease started later (from 45-49 DAP) in ‘MAK-10’. Similarly the sucrose burst was delayed in ‘MAK-10’ (occurring from 35-39 to 45-49 in VED and from 45-49 to 50-55 in ‘MAK-10’).

The different performance in sugar accumulation did not apply to organic acid accumulation, as little differences could be found in the evolution of citric, malic and glutamic acids between ‘MAK-10’ and VED (Figure 3). In both lines citric acid content more than doubled that of malic acid, while glutamic acid accumulated mainly at the end of the ripening process.

The delayed ripening of ‘MAK-10’ could also be observed as a delay of flesh color change (Table 1). Fruits harvested at the immature state (30-34 DAP) still had green to yellow flesh color, whereas VED fruits were already light orange (FCa:  $-4.95 \pm 0.76$  and  $4.4 \pm 1.4$ ; FCb:  $19.58 \pm 0.34$  and  $21.7 \pm 0.48$ , for MAK-10 and VED, respectively) (Figure 4). Despite this delay in color change, ‘MAK-10’ fruits did not differ from VED fruits at maturity (40 to 49 DAP) and even retained better flesh color when collected later at 50-55 DAP (FCa:  $10.92 \pm 0.46$  versus  $6.84 \pm 0.78$ , for ‘MAK-10’ and VED respectively).

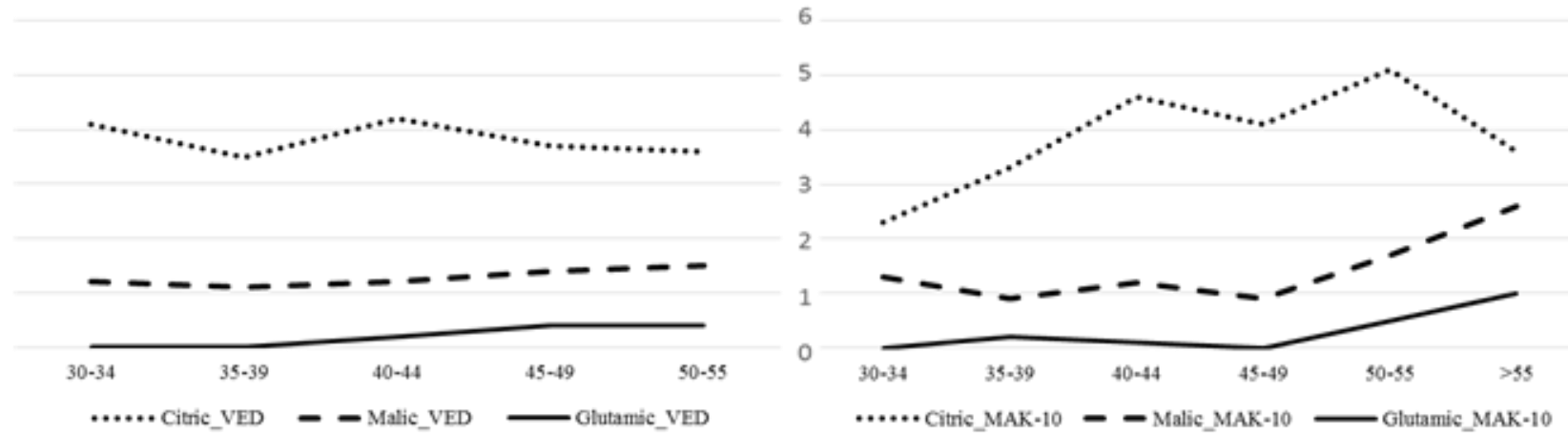


**Figure 1.** Flesh firmness ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ ) changes in fruits harvested at different days after pollination (DAP).



30-34 DAP	35-39 DAP	40-44 DAP	45-49 DAP	50-55 DAP
FR: ns	FR: ns	FR: ns	FR: P<0.01	FR: P=0.01
GL: P=0.04	GL: ns	GL: ns	GL: P<0.01	GL: P=0.01
SC: ns	SC: ns	SC: ns	SC: P<0.01	SC: P=0.03
EQ: ns	EQ: ns	EQ: ns	EQ: P=0.01	EQ: P=0.01

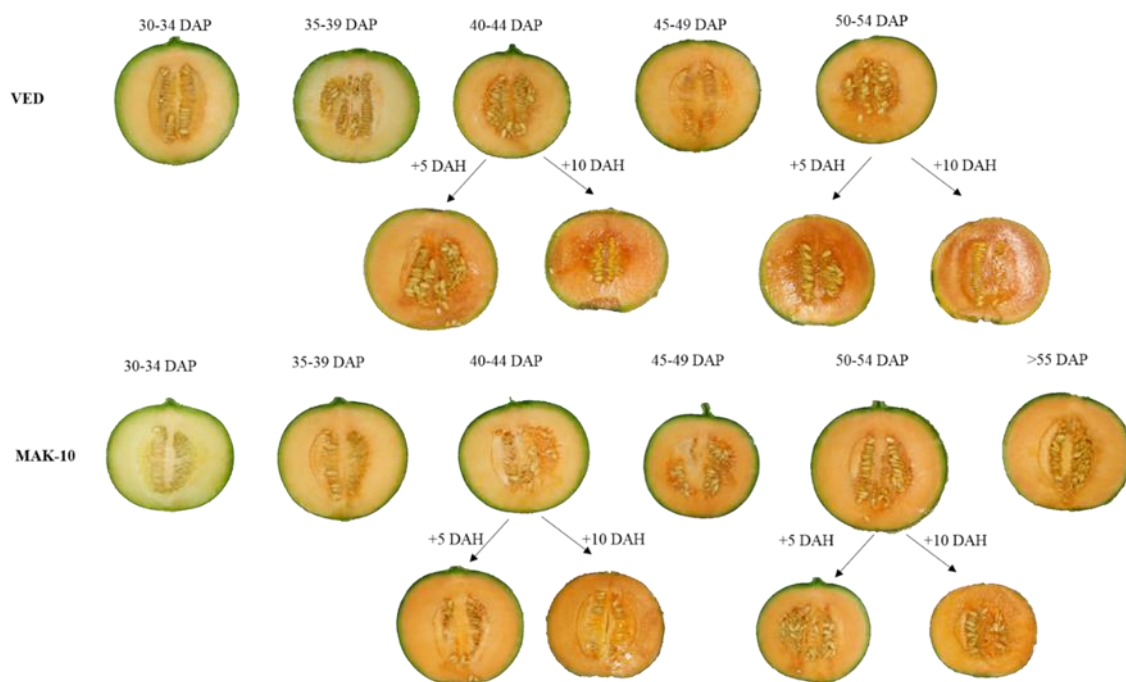
**Figure 2.** Sugar components (gr/Kg of fresh weight) at different days after pollination (DAP). Left: sugar components in ‘Vedrantais’ (VED) fruits. Right: sugar components in ‘MAK-10’ fruits. Bottom: Analysis of variance (ANOVA) P-values for the genotype effect for fructose (FR), glucose (GL), sucrose (SC) and sucrose equivalents at different DAP. ns= not significant difference.



30-34 DAP	35-39 DAP	40-44 DAP	45-49 DAP	50-55 DAP
CT: P=0.03	CT: ns	CT: ns	CT: ns	CT: P=0.01
ML: ns	ML: ns	ML: ns	ML: P=0.01	ML: ns
GL: ns	GL: ns	GL: ns	GL: ns	GL: ns

**Figure 3.** Principal organic acid components (gr/Kg of fresh weight) at different days after pollination (DAP). Left: organic acid components in ‘Vedrantais’ (VED) fruits. Right: organic acid components in ‘MAK-10’ fruits. Botom: Analysis of variance (ANOVA) P-values for the genotype effect for citric acid (CT), malic acid (ML) and glutamic acid at different days after pollination (DAP). ns= not significant difference.





**Figure 4.** Changes of ‘Vedrantais’ (VED) and ‘MAK-10’ fruits at different days after pollination (DAP) (30–34, 35–39, 40–40, 45–49, 50–55, and >55) and different days after harvest (DAH) (5 and 10 d of storage at room temperature).

### 3.3.3. ‘MAK-10’ and VED differ in the post-harvest behavior.

Despite the FF of ‘MAK-10’ fruits being constant while the fruits remained attached to the plant (Figure 1), during storage it decreased slowly (Table 2), as it has been previously reported for Makuwa melons (Zhang et al., 2015). Nevertheless, ‘MAK-10’ fruits harvested at 40-44 DAP maintained a significantly higher FF than VED at 10 DAH ( $2.05 \pm 0.05$  versus  $1.10 \pm 0.12$  kg/cm<sup>2</sup>). Similarly, ‘MAK-10’ fruits harvested at 50-55 DAP were firmer than VED fruits at 5 DAH ( $1.45 \pm 0.05$  versus  $0.90 \pm 0.10$  kg/cm<sup>2</sup>). In this case, VED fruits could not be analyzed at 10 DAH because they were already rotten.

A decrease of SSC was observed during room storage (Table 2), more rapid in VED fruits collected at 40-44 DAP ( $13.3 \pm 0.8$  and  $9.8 \pm 0.9$  °Brix, at 5 and 10 DAH respectively) than in ‘MAK-10’ fruits ( $14.00 \pm 0.96$  and  $13.15 \pm 0.15$  °Brix, respectively). ‘MAK-10’ fruits collected at 50-55 DAP also had a stable Brix degree after 5 and 10 DAH ( $14.60 \pm 0.20$  and  $14.90 \pm 0.70$  °Brix, respectively). These results do not disagree with those of Zhang et al. (2015), who described an initial increase of SSC in post-harvest Makuwa fruits, reaching a maximum after seven days of storage followed by a slow decrease.

VED and ‘MAK-10’ fruits differed in the post-harvest evolution of hexoses content (Table 3), which presented a more accentuated decrease in VED than in ‘MAK-10’ fruits. This decrease,

which specially affected glucose content, was consistent with the anticipation of hexoses decrease during the ripening process observed in VED fruits attached to plants. These differences were more marked in fruits harvested at 40-44 DAP (a harvesting time closer to commercial maturity of VED melons). Sucrose content increased during storage in both genotypes in fruits harvested at 40-44 DAP, more in VED than in ‘MAK-10’, consistently with the delay in sucrose burst previously observed in ‘MAK-10’ fruits at harvest (Figure 2). In fruits harvested at 50-55 DAP a similar slight decrease in sucrose content was observed for both genotypes during post-harvest. Despite this reduction, the sucrose content in ‘MAK-10’ during post-harvest was nearly twice that of the VED fruits (65.1 to 73.4 *versus* 29.3 to 34.2 gr/kg in ‘MAK-10’ and VED fruits stored 5 and 10 DAH respectively).

These changes in sugar content resulted in a higher loss of sucrose equivalents in VED than in ‘MAK-10’, which was more pronounced in fruits harvested at 40-44 DAP (Table 3). Consequently, fruits of ‘MAK-10’ showed higher sucrose equivalents levels, which remained more stable during post-harvest storage, and they had a higher potential in terms of sweetness perception. Previous studies with Makuwa melons have also reported reductions in hexoses and increase in sucrose contents during the post-harvest storage (Liu et al., 2012).

Regarding the acid profile, citric acid slightly decreased in a similar way in both lines; whereas a different evolution was observed in glutamic and malic acid, mainly in fruits harvested at 40-44 DAP. Both acids increased in VED fruits during storage, but decreased or remained stable in ‘MAK-10’ fruits.

**Table 2.** Mean and standard error of flesh firmness (FF) and soluble solids content (SSC) in fruits<sup>2</sup> collected at 40-44 days after pollination (DAP) and at 50-55 DAP conserved at room temperature 5/10 days after harvesting (DAH).

	FF (kg/cm <sup>2</sup> )				SSC (°Brix)			
	VED		‘MAK-10’		VED		‘MAK-10’	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
40-44 DAP+5 DAH	0.60 a	0.10	2.50 a	1.00	13.30 a	0.80	14.00 a	0.96
40-44 DAP+10DAH	1.10 a	0.12	2.05 b	0.05	9.80 b	0.90	13.15 b	0.15
50-55 DAP+5DAH	0.90 a	0.10	1.45 b	0.05	12.65 a	0.55	14.60 a	0.20
50-55 DAP+10DAH	-	-	1.00	0.00	-	-	14.90	0.70

<sup>2</sup>Six fruits of each day after pollination (DAP), day after harvesting (DAH) and genotype were phenotyped except for ‘Vedrantais’ (VED) fruits at 50-55 DAP+10DAH (rotten fruits were not analyzed). Mean values in a column (for each harvesting date) followed by the same letter are not significantly different according to the Least Significant Difference test (LSD) ( $P \leq 0.05$ ) between ‘MAK-10’ and ‘Vedrantais’ (VED).

**Table 3.** Relative percentage of gain and loss of sugar compounds (fructose, glucose, sucrose and sucrose equivalents) and acid compounds (citric, malic and glutamic) of ‘MAK-10’ and ‘Vedrantais’ (VED) fruits<sup>2</sup> harvested at different days after pollination (DAP) (40-44 and 50-55) and different days after pollination (DAH) (5 and 10) in comparison with fruits harvested at the same day after pollination (DAP) without storage.

DAP + DAH	Genotype	% Fructose	% Glucose	% Sucrose	% Sucrose eq	% Citric	% Malic	% Glutamic
40-44+5	‘MAK-10’	0.00	-25.92	85.42	-6.97	-15.21	-25.00	0.00
	VED	-1.60	-47.00	193.42	-13.66	-26.19	83.33	750.00
40-44+10	‘MAK-10’	15.23	11.85	-8.09	14.22	-17.39	-33.33	-100.00
	VED	-53.20	-58.06	91.22	-54.50	-4.76	50.00	300.00
50-55+5	‘MAK-10’	-42.08	-36.17	-14.90	-40.65	-19.60	-23.52	40.00
	VED	-39.44	-69.12	-14.57	-47.11	-11.11	-33.33	50.00
50-55+10	‘MAK-10’	-31.32	-62.19	-4.05	-38.88	23.52	-11.76	20.00
	VED	-35.51	-81.20	11.37	-47.34	2.77	-40.00	-100.00

<sup>2</sup>Sugars and organic acid compounds were quantified with the methodology described by Cebolla-Cornejo et al. (2012). Six fruits were analyzed for each genotype and DAP+DAH.

### 3.4. Conclusions

Our results indicate that the introgression from ‘Ginsen makuwa’ carried by ‘MAK-10’ clearly affects the ripening process, delaying flesh softening, flesh color change, and sugar accumulation, and preventing the formation of the abscission layer and external volatiles emission in whole fruits. However, apart from the lack of abscission layer and external aroma, the characteristics of the ‘MAK-10’ fruits at VED commercial maturity (40 to 49 DAP) are similar to that of the VED fruits. The ‘MAK-10’ line has the additional advantage that the fruits maintain commercial value for longer attached to the plant and have higher sugar content. This property could be useful to extend the harvesting period when using ‘MAK-10’. ‘MAK-10’ fruits also retain flesh firmness, sweetness and have less variation of the organic acid profile for longer during room storage, which could be useful to extend the shelf life of Charentais melons. Despite the lack of external aroma, that could be a limitation for its use in specific markets, the flesh of ‘MAK-10’ fruits is aromatic, we did not find apparent differences in their internal aroma with VED fruits during fruit characterization. A quantitative analysis of flesh volatiles is being conducted to characterize the aromatic profile of this breeding line.

The Makuwa introgression of ‘MAK-10’ is located at chromosome 10. Therefore, the two genes, *AL-3* and *Al-4*, reported to prevent the formation of abscission layer by Périn et al. (2002b) are not involved in this phenotype. This region contains two genes (*MELO3C012390*, annotated as NAC/NAM transcription factor, and *MELO3C012332*, annotated as a HD-Zip homeobox transcription factor) related with the ethylene transcriptional regulation (Ríos et al.,

2017; Saladié et al., 2015). These genes are good candidates to be involved in the observed ripening delay.

This ripening delay may also account for the observed differences in sugar content between VED and ‘MAK-10’. Differences in sugar content in melon fruits can be due to differences in sugar accumulation and/or in sugar metabolism. In general, the increase in sucrose level is associated with a gradual decline in invertase activity and an increase in sucrose phosphate synthase activity, although contributions of additional enzymes have also been proposed. Several studies indicate that gene expression is reprogramed during the onset of ripening. According to Saladié et al. (2015), there exist differences between climacteric and non-climacteric varieties in the expression of genes related to sugar metabolism, suggesting that they may be potential determinants of sucrose content and post-harvest stability of sucrose levels in fruit. After the autocatalytic ethylene synthesis, the sucrose levels are stable in the flesh of VED melons (from 45 to 49 days on), whereas sucrose levels continue rising in ‘MAK-10’. Fruits of both genotypes were collected from plants at 50-55 days (all still attached to the plant). However, whereas VED fruits had already started the climacteric ripening process, that can stabilize sucrose content, ‘MAK-10’ fruits lacked the autocatalytic ethylene synthesis and continued accumulating sucrose. Also the presence in the introgression of MAK alleles of genes involved in sugar metabolism can contribute to this differential sucrose accumulation behaviour. In the introgressed genomic region also maps *MELO3C012320*, a Sucrose-P phosphatase 2 (*CmSPP2*) involved in sugar metabolism (Leida et al., 2015). This gene is a good candidate for future studies on this phenotype. Despite Makuwa melons are not so sweet as VED melons, MAK genes can have a different behaviour when introgressed in a different genetic background. There are many examples of this type of masked variation when using introgression lines (Perpiñá et al., 2016).

In conclusion, ‘MAK-10’ provides fruits with an increase of sugar and flesh firmness that could be distributed in markets where typical Cantaloupe melons were not established. In addition, the increase of post-harvest life could allow marketing on a larger scale.

### **Availability**

Small samples of ‘MAK-10’ seeds are available for research purposes, may be obtained by written request to the author ([mpicosi@btc.upv.es](mailto:mpicosi@btc.upv.es)).

### **Acknowledgements**

This work has been carried out in the framework of the Programa de Valorización y Recursos Conjuntos de I+D+i de VLC/CAMPUS and has been funded by the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte as part of the Programa Campus de Excelencia Internacional. IL generation, genotyping and phenotyping was supported by SAFQIM project, AGL2012-40130-C02-02 of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO). The authors also wish to thank the MINECO project AGL2014-53398-C2-2-R, co-funded with FEDER funds.

**CAPÍTULO 4. Analysis of aroma-related volatile compounds affected by ‘Ginsen Makuwa’ genomic regions introgressed in ‘Vedrantais’ melon background**



## **CAPÍTULO 4. Analysis of aroma-related volatile compounds affected by ‘Ginsen Makuwa’ genomic regions introgressed in ‘Vedrantais’ melon background**

En la mejora de la calidad del fruto, además de tener en cuenta aspectos como la morfología, el contenido de azúcares y ácidos, y aspectos de calidad interna del fruto, también se ha de tener en cuenta otros aspectos que afectan a la calidad organoléptica, como el contenido de compuestos aromáticos volátiles. Por ello, se decidió analizar el perfil aromático de las ILs en dos ambientes, con el objetivo de estudiar de forma preliminar, las regiones genómicas y en algún caso más en concreto los genes, involucrados en el metabolismo de compuestos aromáticos. El trabajo realizado que se describe a continuación, se está preparando para enviarlo a la revista Food Chemistry.

Este trabajo se llevó a cabo ha llevado a cabo en el marco del Programa de Valorización y Recursos Conjuntos de I+D+i VLC/CAMPUS financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte como parte del Programa Campus de Excelencia Internacional. La generación de ILs, así como el genotipado y fenotipado de las líneas, fue financiada por el proyecto Plant KBBE project (SAFQIM: SUGARS AND FRUIT QUALITY IN MELON PIM2010PKB-00691, del Ministerio de Ciencia e Innovación), y por los proyectos PROMETEO/2017/078 de la convocatoria de investigación para grupos de excelencia (financiado por la Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport, Generalitat Valenciana) y el proyecto AGL 2017-85563-C2 (financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades con cofinanciación de Fondos FEDER)

En el marco de estos proyectos el trabajo se llevo a cabo por el grupo de Mejora genética de Cucurbitaceas del COMAV en colaboración el grupo de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP-CSIC de la UPV, liderado por Antonio J. Monforte, los grupos del COMAV-UPV y de la UJI-UPV (Unidad Mixta de Investigación en Mejora de la Calidad Agroalimentaria), liderados por Jaime Cebolla y Salvador Roselló, respectivamente, y el grupo del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA), de Universitat Jaume I, liderado por Joaquín Beltran.





## **CAPÍTULO 4. Analysis of aroma-related volatile compounds affected by ‘Ginsen Makuwa’ genomic regions introgressed in ‘Vedrantais’ melon background**

Perpiñá, G<sup>1</sup>, Roselló, S<sup>2</sup>, Esteras, C<sup>1</sup>, Beltrán, J<sup>3</sup>, Monforte, AJ<sup>4</sup>, Cebolla-Cornejo, J<sup>5</sup>, Picó, B<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> COMAV, Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad, Universitat Politècnica de València, Cno. de Vera, s.n. 46022 València, Spain. E-mail: G.P.: gorperma@euita.upv.es; C.E.: criesgo@btc.upv.es; B.P: mpicosi@btc.upv.es

<sup>2</sup>Unidad Mixta de Investigación en Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV, Department de Ciències Agràries i del Medi Natural, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castellón, Spain. E-mail: [rosello@uji.es](mailto:rosello@uji.es)

<sup>3</sup>Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA), Universitat Jaume I, Campus de Riu Sec, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castellón, Spain. E-mail: [beltranj@uji.es](mailto:beltranj@uji.es)

<sup>4</sup>IBMCP, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) UPV-CSIC, Ciudad Politécnica de la Innovación Edificio 8E, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain. E-mail: [amonforte@ibmcp.upv.es](mailto:amonforte@ibmcp.upv.es)

<sup>5</sup>Unidad Mixta de Investigación en Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV, COMAV, Universitat Politècnica de València, Cno. de Vera, s.n. 46022 València, Spain. E-mail: [jaicecor@bct.upv.es](mailto:jaicecor@bct.upv.es)

**\* Corresponding author**

Tel:+34-963879415

E-mail: [mpicosi@btc.upv.es](mailto:mpicosi@btc.upv.es)

### **4.1. Abstract**

Volatile organic compounds (VOCs) have an important role in melon flavour, one of the most important traits influencing consumer’s preferences. The volatile profile of 25 introgression lines (ILs), developed from the Japanese cultivar ‘Ginsen makuwa’ (MAK) and the ‘Charentais’ cultivar ‘Vedrantais’ (VED), as donor and recurrent parent, respectively, was characterized in two environments. A total of 57 VOCs were identified using purge and trap extraction followed by chromatography-mass spectrometry. In addition, the IL population was genotyped with

2.146 SNP distributed throughout the melon genome to tag Makuwa introgressions. The aromatic profiles of both parents (VED and MAK) and the hybrid revealed the genetic dominance of the MAK alleles against the VED alleles. MAK fruit displayed a significant decrease of most VOCs, mainly alkyl esters and apocarotenoid, compared to VED fruit, but had higher amounts of some specific aldehydes, esters, and phenolic compounds, such as eugenol. MAK introgressions affected the production of VOCs in ILs. Although the environmental effect was remarkable, the trend of certain ILs was similar in both environments. Interesting ILs were detected with specific VOCs affected by specific MAK introgressions and also some ILs showed changes in VOCs profiles due to pleiotropic effects of changes in color flesh and the ripening process. Joint analysis of VOCs profile and ILs GBS genotypes allowed the identification of candidate genes for volatile production, such as MELO3C024886 (4-coumarate:CoA ligase) involved in the eugenol pathway, *CmCRTISO1* (MELO3C009571, carotenoid isomerase) related with the accumulation of carotenoids, precursors of the volatiles apocarotenoids, MELO3C006703 and MELO3C006545 (acyl-CoA ligases genes) involved in esters profile, and MELO3C030975 (aminotransferase) related with the aldehydes production. This study show how the use of genetic resources, such as those of the makuwa group, for breeding commercial melon can have an impact on the aromatic profiles.

**Keywords:** *Cucumis melo* L., introgression line, quality, genomics, metabolomics

## 4.2. Introduction

Melon (*Cucumis melo* L.) fruit quality is a complex trait which depends on many aspects such as fruit size, shape, color, texture, flavour and nutritional content. Flavour is one of the fruit traits that mostly determines the consumer perception of quality. It highly depends on the sweetness and acidity of the fruit flesh and on the fruit aroma profile. Aroma profile is characterized by a specific qualitative and quantitative pattern of volatile organic compounds (VOCs), especially abundant are esters, but also aldehydes, alcohols and terpenes, among others (Kourkoutas et al., 2006). Most of the VOCs affecting flavour increase at maturity and decrease when fruits are over-ripen (Beaulieu and Grimm, 2001). The final profile is the result of a combination of genotype and environmental effects (Bernillon et al., 2013). In addition, the specific ability to accumulate precursors and/or to form and release conjugates during ripening are also important factors influencing the final profile (Rambla et al., 2017).

Melon is a highly polymorphic species (Pitrat, 2017), traditionally splitted into two subspecies subsp. *melo* and subsp. *agrestis*, and 19 groups. Accordingly, melon volatile profile is complex and more than 300 different compounds have been reported within the species, and more than 100 in a single cultivar (Gonda et al., 2016; Esteras et al., 2018).

Huge differences in the aroma profile between climacteric, more aromatic, and non-climacteric melons have been reported in several studies (Burger et al., 2006; Esteras et al., 2018). In climacteric melons, such as ‘Vedrantais’ (*C. melo* subsp. *melo* group Cantalupensis, subgroup ‘Charentais’), esters, low-odor threshold compounds with fruity, sweet, melon-like, and floral aroma notes, are the main group of VOCs followed by alcohols and aldehydes, that also influence their unique aroma (Beaulieu and Grimm, 2001; Aubert and Bourger, 2004; Esteras et al., 2018). Non-climacteric melons, such as ‘Piel de Sapo’ melons (*C. melo* subsp. *melo* group Ibericus, sub-group ‘Piel de Sapo’), however, present lower levels of esters and higher amounts of aldehydes and alcohols, displaying green, fresh, and cucumber-like aroma notes (Obando-Ulloa et al., 2010). A deep study of melon aroma using a large germplasm collection (Esteras et al., 2018) revealed more variability than expected within each melon group. In fact, four VOC profiles were reported within the Cantalupensis group, being the orange-fleshed ‘Vedrantais’ melons in the group with the highest levels of ethyl esters.

The group of Makuwa melons (*C. melo* subsp. *agrestis* group Makuwa) has an oriental origin and is extensively cultivated in the Far-East. These melons, which have dehiscent peduncles, have often been considered climacteric, but detailed characterization indicates an intermediate ripening behaviour between climacteric and non-climacteric melons (Leida et al., 2015). In fact, fruits drop from ‘Vedrantais’ plants when the fruit reaches the commercial ripening stage, while Makuwa fruits remain longer attached to the plant, even in more advanced stages of ripening. Makuwa melons have a thin and edible rind, white, sweet and crispy, juicy flesh, with an aromatic profile unique among the melons of the subsp. *agrestis*. According to their VOC profile, Makuwa melons clustered together with Near-East aromatic Dudaim melons (*C. melo* subsp. *melo* group Dudaim), close to aromatic cantaloupes (Esteras et al., 2018). This group of melons displays one of the highest total ester content among *agrestis* melons, being straight-chain esters (such as ethyl, butyl or hexyl acetate) especially important (Tang et al., 2015). Previous analysis report that Makuwa melons have approximately one third of the ester amount in ‘Vedrantais’ melons, with Makuwa having lower amounts of certain esters. The volatile profile of Makuwa fruit also varies during ripening (Li et al., 2016).

The genetic control of aroma production in melons has been studied in segregating populations derived from crosses between cultivars with contrasting VOC composition. Available genomic/transcriptomic tools have allowed the study of the genes involved in the aroma production (Freilich et al., 2015; Gonda et al., 2016; Gonda et al 2018; Tuan et al., 2019). Melon volatiles are mainly derived from fatty acids, aminoacids, and carotenoids. It is known that aldehydes, that contribute fresh and green notes to melon aroma, are produced from fatty acids *via* the action of lipoxygenases (LOX) and hydroperoxide lyases (HPL). Specifically, in the

case of Makuwa melons it has been demonstrated that LOX enzymes play a central role in aroma production, promoting the accumulation of aldehydes and their derived esters (Tang et al., 2015). Aldehydes are also derived from aminoacids, such as L-phenylalanine, L-methionine and branched-chain aminoacids (L-leucine, L-isoleucine and L-valine), *via* aromatic and branched chain aminoacid aminotransferases that generate the respective  $\alpha$ -keto-acids (ArAT and BCAT), such as the encoded by genes *CmArATI* and *CmBCATI* characterized in melon (Gonda et al., 2016). Both fatty-acid and aminoacid-derived aldehydes contribute to fruit aroma, but are also precursors of alcohols and esters, the most important contributors to melon odor. Alcohols, the main constituents of non-climacteric melons aroma, are derived from aldehydes *via* alcohol dehydrogenases (ADH) such as the encoded by *CmADH1* and *CmADH2* (Manríquez et al., 2006), the two better characterized genes in melon (Chen et al., 2016). Alcohols also serve as esters precursors through the esterification of an alcohol and acyl-coenzyme A (acyl-CoA) substrates by alcohol acyl-transferases (AAT). The acyl-CoA substrates are generated by acyl-CoA synthetases, also called acyl-CoA ligases, from fatty acids with varying chain lengths, short (acetic, propionic, butyric), medium (hexanoic, heptanoic, octanoic acids) and long-chain, that are used to form different esters. For example, the widely distributed acetate esters are formed with acetyl-CoA, while butyrate or hexanoate esters are derived from butyryl-CoA and hexanoyl-CoA, respectively. Different AAT enzymes use different substrates (alcohols/acyl-CoA) (Gonda et al., 2016). Several *CmAAT* have been functionally characterized (El-Sharkway et al., 2005) that differ in their substrate specificity. For example, *CmAAT1* is the most active producing a wide range of short and long-chain acyl esters and it has strong preference for the formation of E-2-hexenyl acetate and hexyl hexanoate, *CmAAT2* was thought to be inactive, but now is associated to the synthesis of several ethyl, thio and thioethyl esters, *CmAAT3* has a strong preference to produce benzyl acetate, and *CmAAT4* forms mainly cinnamyl acetate.

Some specific routes of volatile formation have been further studied, such as the biosynthesis of L-phenylalanine-derived volatiles, the most important compounds in melon aroma. These are produced by different biosynthetic routes. L-phenylalanine can be converted into phenylpyruvate by an aromatic aminoacid aminotransferase (*CmArATI*) that later results into phenylacetaldehyde and phenethyl alcohol and its esters (Gonda et al., 2010). L-phenylalanine can also follow the phenylpropanoid pathway that involves the action of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL), generating (E)-cinnamic acid, a key intermediate. The gene *CmCNL* has been characterized which encodes for (E)-cinnamic acid:CoA ligase, that ligates (E)-cinnamic acid and CoA to form cinnamoyl-CoA, which is processed by cinnamoyl CoA reductase (CCR) to produce (E)-cinnamaldehyde (Gonda et al., 2018).

Other VOCs, such as the phenylpropene eugenol, are also synthesized from L-phenylalanine *via* the phenylpropanoid pathway using (E)-cinnamic acid, followed by the action of (E)-cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) and p-coumaric acid CoA ligase (4CL) (Liu et al., 2018). Within the same route the melon gene *CmBAMT*, encoding a benzoic acid:S-adenosyl-L-methionine carboxyl methyltransferase, having a role in the accumulation of methyl benzoate from benzoic acid has been characterized.

The aminoacid L-methionine is also catabolized to produce sulfur volatiles *via* two different routes, one involving the conversion into the aldehyde 3-(methylthio) propanal by the L-methionine aminotransferase (MetAT), and the second involving the L-methionine- $\gamma$ -lyase, encoded by the gene *CmMGL* to generate methanethiol, further incorporated into sulphides and thioesters (Gonda et al., 2013; Gonda et al., 2016).

Other pathways to produce melon volatiles include the production of apocarotenoids *via* the oxidative cleavage of larger terpenoids, such as carotenoids, through the activity of carotenoid cleavage dioxygenases (CCD), such as the characterized *CmCCD1* (Ibdah et al., 2006; Vogel et al., 2008), and the production of mono and sesqui-terpenes from geranyl diphosphate (GPP) or farnesyl diphosphate (FPP) *via* terpene synthases (TPS) (Gonda et al., 2016).

The expression of many of the genes involved in the volatiles biosynthesis is regulated by ethylene changes, resulting in different volatile profiles in melons with different ripening patterns (Saladié et al., 2015).

Makuwa melons have gained attention as a possible source of interesting traits in melon breeding programs. Many disease resistances have been identified in this group (resistance to viruses, to Fusarium wilt and to *Aphis gossypii*) (Pitrat, 2017; Giner et al., 2017; Pascual et al., 2019) but they are also being used in breeding programs focused on melon quality. An introgression line (IL) collection has been recently developed by introgressing single fragments of the Makuwa genome (using the Japanese cultivar ‘Ginsen makuwa’ as donor parent) into the French cultivar ‘Vedrantais’ genetic background (Perpiñá et al., 2016). Some of these lines show features interesting for the diversification of the cantaloupe melons, such as variability in fruit traits (weight, fruit shape and flesh color), early maturing and delayed ripening, increased accumulation of metabolites (sugars and organic acids), etc. (Perpiñá et al., 2016, 2017), but it remains unknown how the Makuwa introgressions can influence the VOC profile of aromatic ‘Charentais’ melons.

In the present study, we analysed the VOC profile of this IL collection and used a genotyping by sequencing (GBS) strategy to characterize the genomic introgressions of each IL. These

aromatic and molecular profiles will be valuable to improve our knowledge of the genetic control of aroma development in melon.

### 4.3. Material and Methods

#### 4.3.1. Plant material

The two melon cultivars, the Japanese accession ‘Ginsen makuwa’, PI 420176, (MAK) (*C. melo* subsp. *agrestis* group Makuwa, sub-group ‘Yuki’), donor parent, and the cultivar ‘Vedrantais’ (VED) (*C. melo* subsp. *melo* group *Cantalupensis*, subgroup ‘Charentais’), recurrent parent, were previously selected considering their contrasting phenotype regarding many traits, including a different fruit flesh VOC profile (Leida et al., 2015; Esteras et al., 2018). A set of twenty-five introgression lines (ILs) were developed by introgressing the genome of MAK in to the VED genetic background. MAK introgressions were defined with a set of 154 SNPs. The ILs showed an average of 1.3 introgressions/IL and covered nearly 100% of the donor genome (Perpiñá et al. 2016).

#### 4.3.2. ILs Genotyping

In order to obtain a more accurate genomic characterization of Makuwa introgressions represented in the 25 IL set, this collection was further genotyped using the Genotyping-by-sequencing (GBS) strategy. DNA was extracted from three plants/IL with DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). GBS libraries were prepared using ApeKI and were subsequently sequenced using the HiSeq 2000 Illumina platform (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) in the LGC Genomics GmbH (Germany) following the procedure reported by Elshire et al. (2011). Quality-filtered reads were mapped to the melon genome (assembly v.3.6.1; <https://www.melonomics.net>) using the GEM toolkit (version 3) (Marco-Sola et al., 2012). Alignment files containing only properly paired, uniquely mapping reads were processed using Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) to add read groups. The Genome Analysis Tool Kit (GATK) (McKenna et al., 2010) was used for local realignment. Variant calling was done using UnifiedGenotyper from GATK. Variants were filtered, the positions for which ones at least 1 sample had 10 reads were kept. Subsequently, the vcf file obtained was further filtered for minor allele frequency (MAF)>0.01 and to avoid indels and excessive missing data (>10 % missing data SNPs discarded).

#### 4.3.3. Experimental design.

The same three plants per IL sampled for the GBS were grown under greenhouse conditions during the spring-summer season of 2015 in the Universitat Politècnica de València (UPV), in Valencia (39°29'00.4'N 0°20'28.0'W). Plants were transplanted the last week of March and

fruits harvested during the second half of August. A replicate of this assay was conducted at the greenhouse facilities of the Fundación Cajamar in Paiporta (PAIP), in Valencia (39°25'05.8'N 0°25'03.4'W). Plants were transplanted at the beginning of March and fruits were harvested during the first half of July. In both locations, the three plants per IL were randomly distributed. Crop management and fruit harvesting at commercial maturity were performed as described by Perpiñá et al. (2016). Six plants of the recurrent parental (VED), the donor parent (MAK), and their corresponding F1 were also grown in PAIP as a reference.

#### **4.3.4. Sample preparation and analysis conditions**

One fruit was harvested per plant, in both assays, PAIP and UPV, when the abscission layer appeared (commercial maturity for VED melons). In the case of lines MAK\_7-2 and MAK\_10-1, that did not develop abscission layer (Perpiñá et al., 2017), fruits were collected at 45-50 days after pollination and checked for quality (appropriate flesh color, Brix degree, texture, and flavour). A cross-section of 10 cm was obtained from the equatorial plane of each fruit. Pericarp and approximately 2 mm of flesh, and seeds were discarded. The remaining flesh was homogenized (KRUPS KB720, Groupe Seb Iberica, Barcelona, Spain) and kept frozen at -80°C until the analysis of volatile compounds. Three fruits per IL were sampled in each location, parentals were also sampled in PAIP assay, and equal volumes of the homogenate from the three fruits from each location were pooled for VOC analysis. Additionally, individual fruit samples of six fruits, three per location (PAIP and UPV), of each of 6 selected ILs (MAK\_6-1, MAK\_2-1, MAK\_9-2, MAK\_8-2, MAK\_7-2, and MAK\_4-1) were also analysed. These ILs were selected due to their specific phenotypes.

#### **4.3.5. Reagents for metabolite analysis**

Reference standards of volatile compounds were supplied by Supelco (Sigma-Aldrich and Fluka; Barcelona, Spain) as pure compounds (90 - 99.5 % purity) and individual stock standard solutions (500 mg L<sup>-1</sup>) were prepared in acetone and used to generate mix standard solutions (using a 10-fold volume dilution steps). Calibration solutions were prepared from mix working solutions by consecutive volume dilutions with n-hexane to different final concentrations, according to the detector response for each compound. All standard solutions were stored at -18°C in sealed glass vials (avoiding any headspace). Gas chromatography grade solvents were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Supelclean<sup>TM</sup> ENVI-Carb<sup>TM</sup> 120-400 mesh, 500 mg/6 mL SPE Tubes (Supelco, Barcelona, Spain) were used as traps.

#### **4.3.6. Determination of volatiles**

Volatiles were extracted and determined following the methodology described by Fredes et al. (2016). The extraction was performed by dynamic headspace (DHS) using a purge & trap



#### *Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds*

home-made device (Beltran et al., 2006; Sales et al., 2017) using commercial (500 mg) SPE cartridges as trap. Before analysis, trap cartridges were conditioned with 5 mL of diethyl ether (Et<sub>2</sub>O), followed by 5 mL of n-hexane and finally vacuum dried for 10 minutes. A sample amount of 30 g of homogenized fruit was weighed into a 150 mL Erlenmeyer flask closed with a glass cap with two connection tubes; the inlet tube was connected to a dry nitrogen gas (N<sub>2</sub>) source and the outlet tube to the trap. Extraction was performed at 40 °C during 49 minutes with a nitrogen flow rate of 1.6 L min<sup>-1</sup> and magnetic stirring at 300. Each trap cartridge was eluted after extraction with 5 mL of diethyl ether/hexane (1:1, v:v) followed by 5 mL of diethyl ether directly into a graduated glass tube. The extract was then evaporated under a gentle nitrogen stream at 35°C to a final volume of 0.5 mL. The final extract was divided into two aliquots and stored in a freezer at -20°C until their analysis by GC-MS.

A Varian CP-3800 gas chromatograph coupled to an ion trap mass spectrometry detector (Saturn 4000, Varian) was used for the determination of the volatiles. A 30 m×0.25 mm Supelcowax 10 (0.25 µm film thickness) capillary column was used for the separation, using helium at a constant flow of 1 mL min<sup>-1</sup> as carrier gas. The temperature program was: 40°C for 5 min, then increased to 160 °C at 4 °C min<sup>-1</sup>, and finally increased to 250 °C at 30°C min<sup>-1</sup>, with a final isothermal stage of 1 min (total chromatographic analysis time 39 min). Injection of 1 µL of the sample in the splitless mode (injection port temperature 220°C) was performed using a Varian 8400 autosampler. MS (ion trap) measurements were performed in full scan mode (m/z scan range of 50 – 200 Da) using electron ionization (70 eV) in positive mode and external ionization configuration. GC-MS interface, ion trap, and manifold temperatures were set at 275°C, 190°C and 60°C, respectively.

For identification purposes, retention indices for all studied compounds were calculated by using a standard solution containing n-alkanes (C7-C30) and following the formula given by Kovats (1958). Quantitation was carried out by using external standard calibration curves using peak areas for the selected quantitation ion (Q) for each compound. Compounds with concentration exceeding linearity range were quantified by diluting extracts with n-hexane until proper concentration (Supp. Table 1).

#### **4.3.7. Data processing and statistical analysis**

Principal Component Analysis (PCA) with the volatile dataset was performed using S-Plus v. 8.01 for windows (Insightful Corp., Seattle). Hierarchical Cluster Analysis (HCA), using Euclidean distances and average linkage clustering, combined with heatmaps, using scaled data, were obtained with the online software *heatmapper* (<http://www.heatmapper.ca>). Correlation network analysis was conducted with the Expression Correlation ([www.baderlab.org/Software/ExpressionCorrelation](http://www.baderlab.org/Software/ExpressionCorrelation)) plug-in implemented for the Cytoscape

software (Shannon et al., 2003). Networks were visualized with the Cytoscape software, v3.3.0 ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)). The nodes represented the volatiles groups (alcohols, aldehydes, esters, and apocarotenoids). Positive and negative correlations were indicated with black and red edges, respectively. Line thickness indicated correlation strength: the wider the line, the stronger correlation.

SNP calling results obtained from the GBS data were used to define the MAK introgressions of each IL. The MAK introgressions (mostly homozygous, but also some heterozygous) into the VED genetic background were defined by the physical position of flanking SNPs (located using the version CM3.6.1 (pseudomolecules) (<https://www.melonomics.net>) of the melon genome) (Supp. Table 2). Candidate genes reported previously to be involved in aroma-related VOC metabolism in melon (El-Sharkway et al., 2005; Galpaz et al., 2018; Gonda et al., 2010, 2013, 2018; Ibdah et al., 2006; Lucchetta et al., 2007; Manriquez et al., 2006; Portnoy et al., 2008; Saladie et al., 2015; Tuan et al., 2019; Tzuri et al., 2015; Yahyaoui et al., 2002; Zhang et al., 2014) were located in these MAK introgressions, according to the melon genome annotation (CM 4.0 transcripts). Similar genes were found by mining the melon transcriptome using BLAST with the sequences of previously reported candidate genes and with the description of their functions as keywords. Qualitative or significant quantitative variation of specific VOCs were assigned to unique MAK introgressions of specific ILs, and the role of candidate genes located in the corresponding introgressions was discussed.

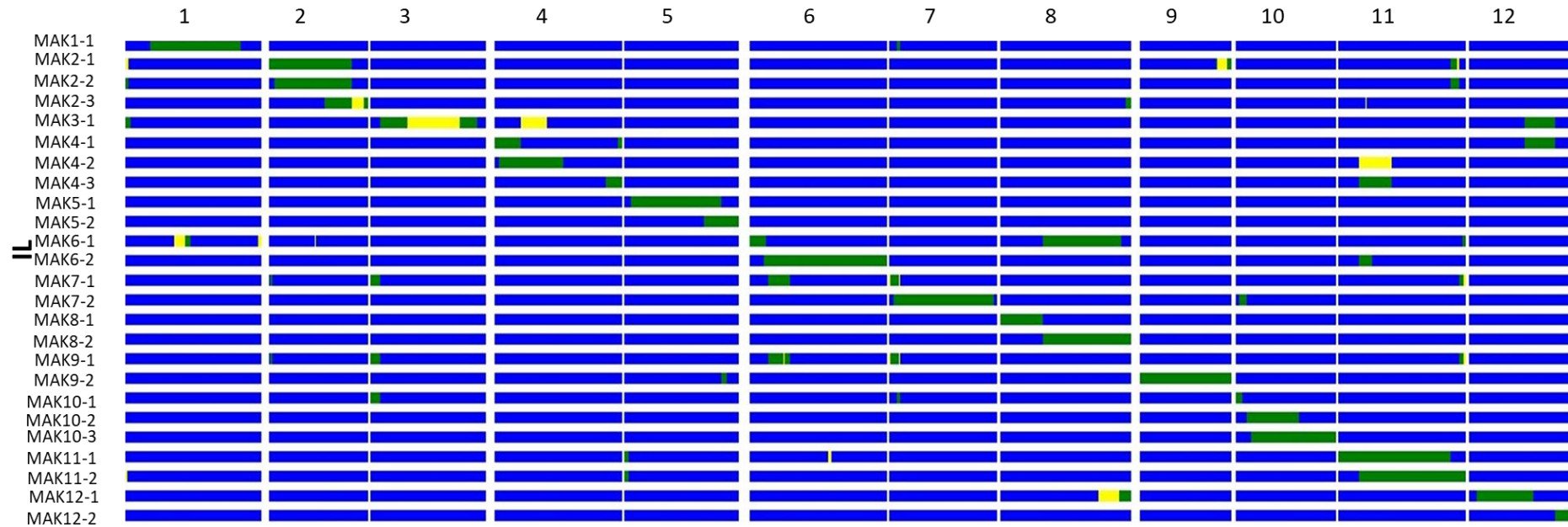
## **4.4. Results and discussion**

### **4.4.1. GBS analysis of IL genotypes**

Approximately 143.000 SNPs with a minimum of 10 read depth were identified. They were subsequently filtered for mapping quality and to avoid excessive missing data, and finally, a set of 2.146 high quality SNPs, evenly distributed throughout the melon genome, were selected to better characterize MAK introgressions in each of these ILs.

The previous genotyping of this IL population with the Agena Bioscience genotyping (formerly Sequenom) platform (Perpiñá et al., 2016) detected 1.3 introgressions per line. With the new SNP set derived from the GBS the average increased to 2.77 introgressions per line (Fig. 1, Supp. Table 2). Most of the main introgressions previously detected were confirmed (average size 10.9 Mb), except for MAK\_9-1 that had no introgression in chromosome 9. Apart from the main introgression, this high density genotyping revealed additional introgressions with an average size of 1.7 Mb. Only 4.3 % of the MAK genome was not represented in the ILs collection. The gaps were located in chromosomes (Chr.) 1, 4, 5 and 7.

Chromosome



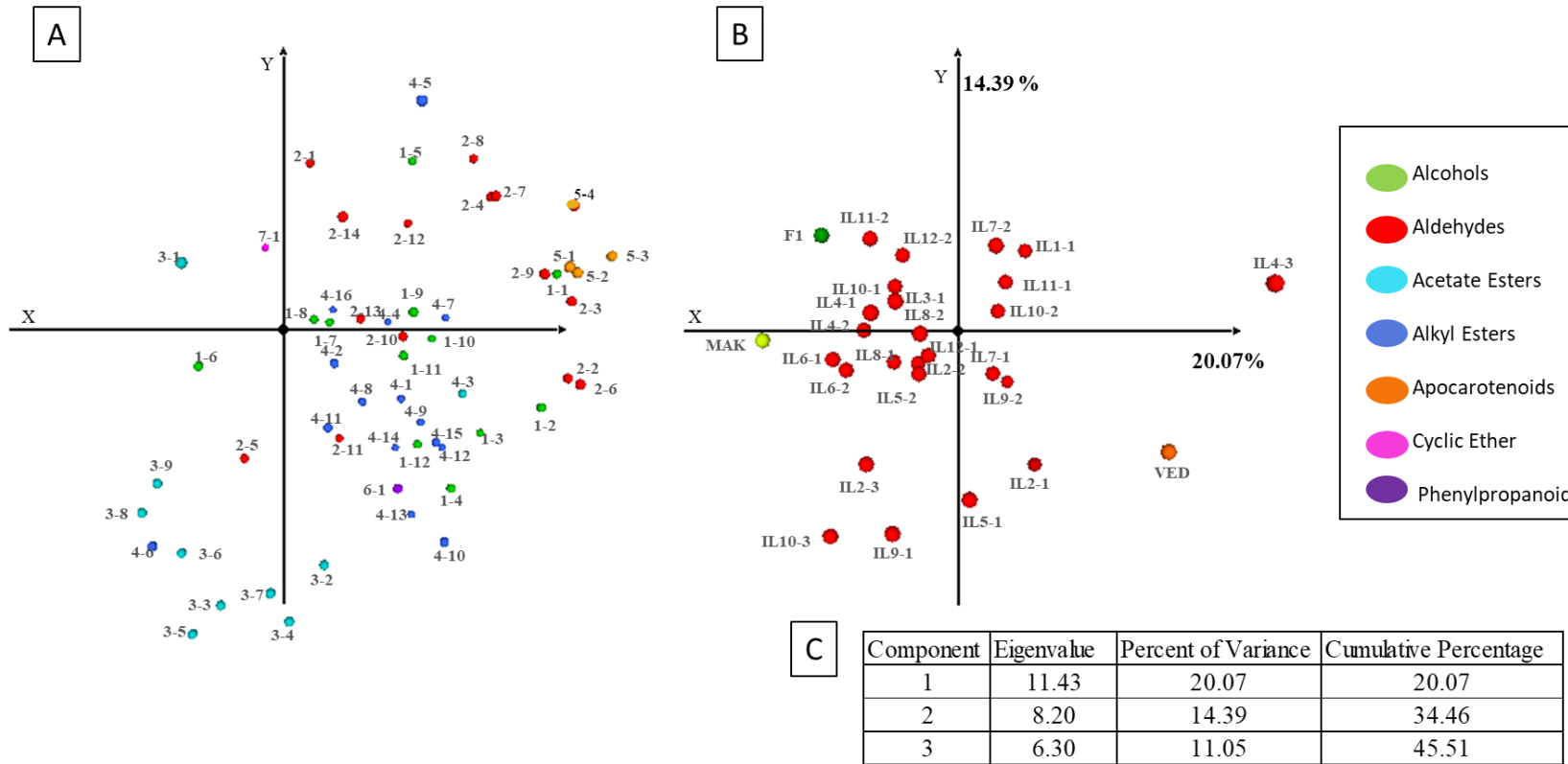
**Figure 1.** Graphical representation of the genotype of the 25 introgression lines obtained with the 2146 high quality SNPs identified from the GBS analysis. Blue color represents the regions homozygous for the alleles of the recurrent parent ‘Vedrantais’, VED; Green color represents regions homozygous for the alleles of the donor parent ‘Makuwa’, MAK; yellow color represents regions heterozygous for MAK/VED alleles.

#### 4.4.2. VOCs profiles of parents and ILs

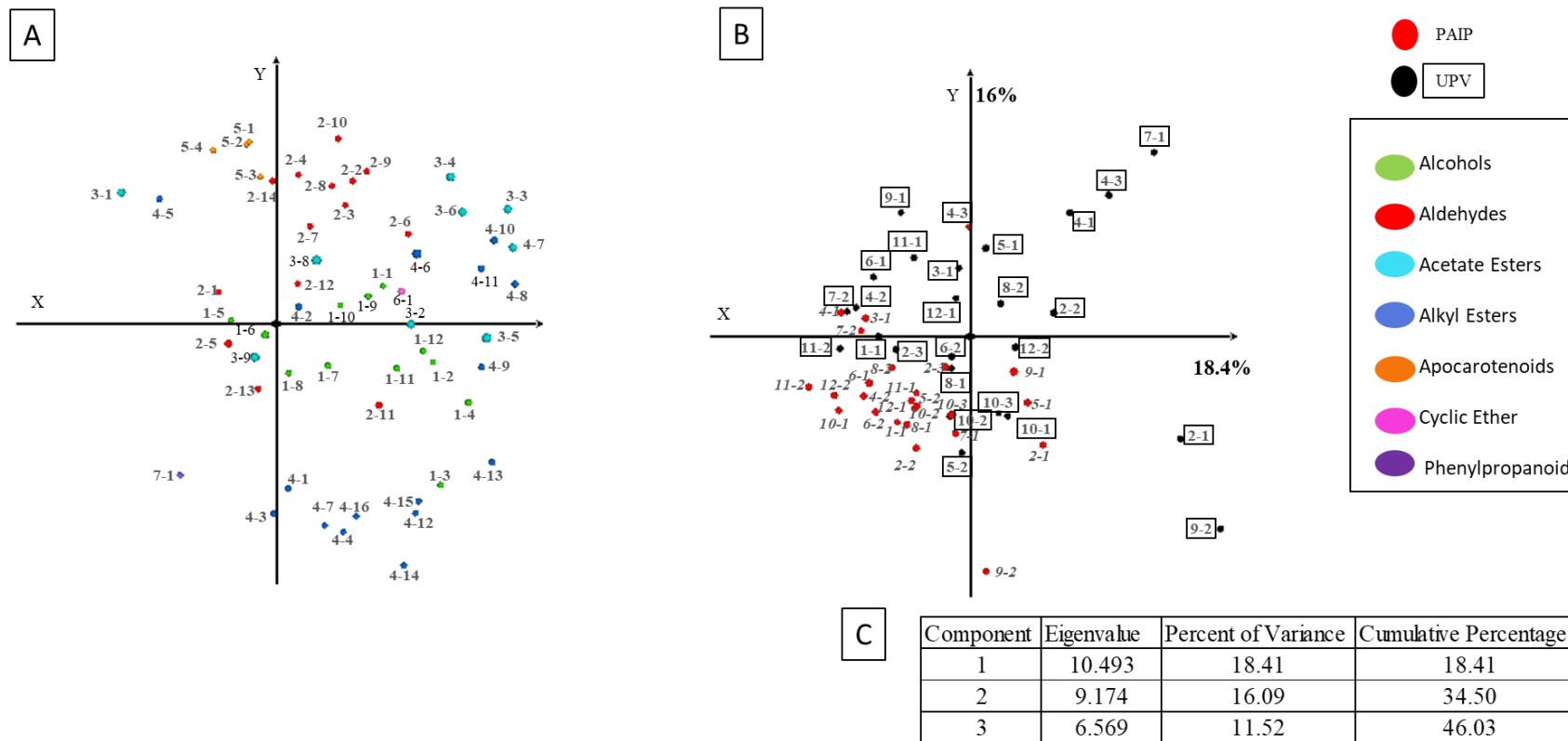
A total of 57 VOCs were identified in MAK, VED, F1 and the IL collection (Supp. Table 3). In the previous paper by Esteras et al. (2018), the profiles of VED and MAK were analysed. The total amount of volatile compounds in flesh tissue of MAK fruit was significantly lower than in VED fruit, with a reduction of 78 % in total VOCs. This reduction was different among VOC groups, while total amount of alcohols, aldehydes, and acetate esters were only two to four times higher in VED than in MAK, the alkyl esters, the main contributors to the aroma of climacteric melons (Gonda et al., 2016), and the apocarotenoids volatiles, typical of carotenoid accumulating melons such as the orange flesh VED (Ibdah et al., 2006), were more than fifteen times higher in VED fruit compared with MAK. Our results confirmed these differences and showed a 66.2 % reduction in total VOCs in MAK, being the highest reduction in alkyl esters and apocarotenoids amounts (Supp. Table 3). Among the alkyl esters, the highest differences were found in the ethyl esters ethyl butanoate, ethyl-2-methyl butyrate, and ethyl hexanoate, that have been described as having an important role in the overall aroma profile of melon (Amaro et al., 2013; Beulieu and Grim, 2001; Gonda et al., 2016). The specific ester profile of MAK melons, rich in some straight-chain esters (such as butyl and hexyl acetates) (Supp. Table 3) had also been reported in other works (Zhang et al., 2014; Tang et al., 2015; Li et al., 2016). Apart from the different ester and apocarotenoid profile, our assay showed that MAK fruits had higher amounts than VED fruits of some compounds of the phenylpropanoid pathway, such as eugenol (Supp. Table 3). Eugenol has been associated with the aroma of the Queen Anne's Pocket melon (*C. melo* group Dudaim) (Aubert and Pitrat, 2006), and higher contents of this compound in MAK compared to VED fruits were also reported by Esteras et al. (2018).

In general, the F1 (VED x MAK) fruit VOC profile was more similar to MAK than to VED (Supp. Table 3), suggesting a dominant gene action of MAK over VED alleles. Also, most ILs showed lower amount of VOCs than VED, with an average reduction of 33.26 % (from a 3.53% in MAK\_9-1 to a 61.40 % reduction in MAK\_11-2). This decrease was variable among VOC groups. In order to better analyse the variability of VOCs profile in the experiment, a PCA and a heatmap with PAIP data for parents, F1 and ILs were performed (Fig. 2a and 3a). In the PCA, the first two principal components explained the 20.07 % and 14.39 % of the variation respectively. The PCA confirmed a clearly different VOCs profile between both parents. The first component separated VED fruit from MAK, mainly due to its higher amounts of some alcohols (1-pentanol, (Z)-3-hexen-1-ol and 1-hexanol), and some aldehydes (hexanal, (E,E)-2,4-heptadienal, octanal and Z-6-nonenal), and due to its higher content of all apocarotenoids (6-methyl-5-hepten-2-one, genarylacetone,  $\beta$ -ionone, and  $\beta$ -ciclocytral) and specific abundant

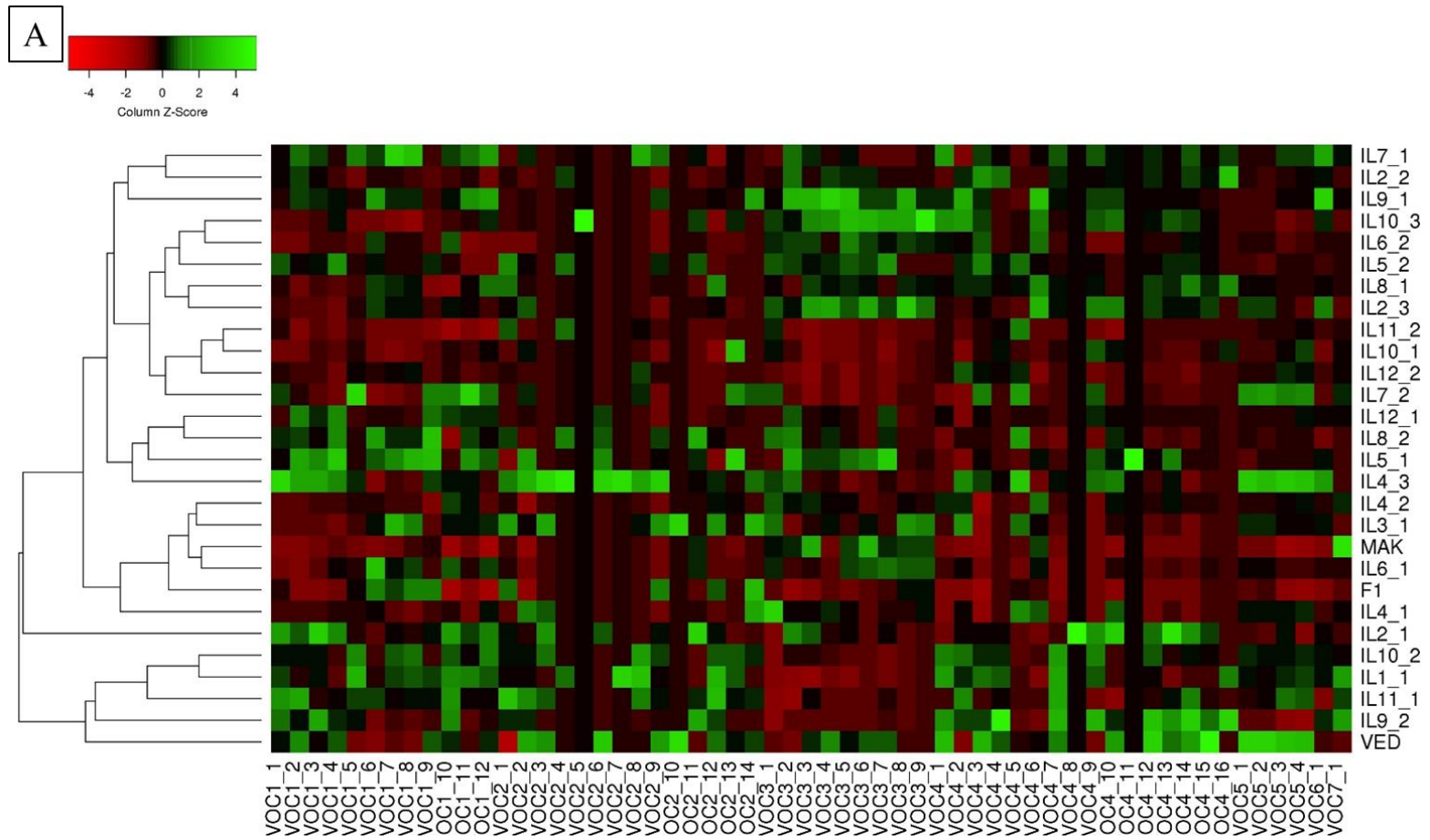
alkyl esters (mainly the aforementioned ethyl butanoate and ethyl-2-methyl butyrate) (Supp. Table 4). As observed previously, the multivariate profile of the F1 was very similar to MAK. The heatmap showed the ILs more similar to both parentals (Fig. 3a). For example, the group of ILs with the highest content in alkyl esters (Supp. Table 3), MAK\_9-2, MAK\_10-2, MAK\_1-1 and MAK\_2-1 were more similar to VED, except for their low content in apocarotenoids. MAK\_6-1 was the most similar to MAK, with a similar quite low contents of main alkyl esters, but a quite lower eugenol content, and MAK\_3-1, MAK\_4-2 and MAK\_4-1 also had more MAK-like profile.



**Figure 2a.** Principal component analysis of the volatile data set. A) Loading plots of PC1 and PC2. Each volatile in the corresponding color according to volatile groups (coded as in Supp. Table 1). B) Principal component analysis of the IL population, VED, MAK and F1 harvested in PAIP environment. C) Eigenvalue, percent of variance and cumulative percentage of PC1, PC2 and PC3.

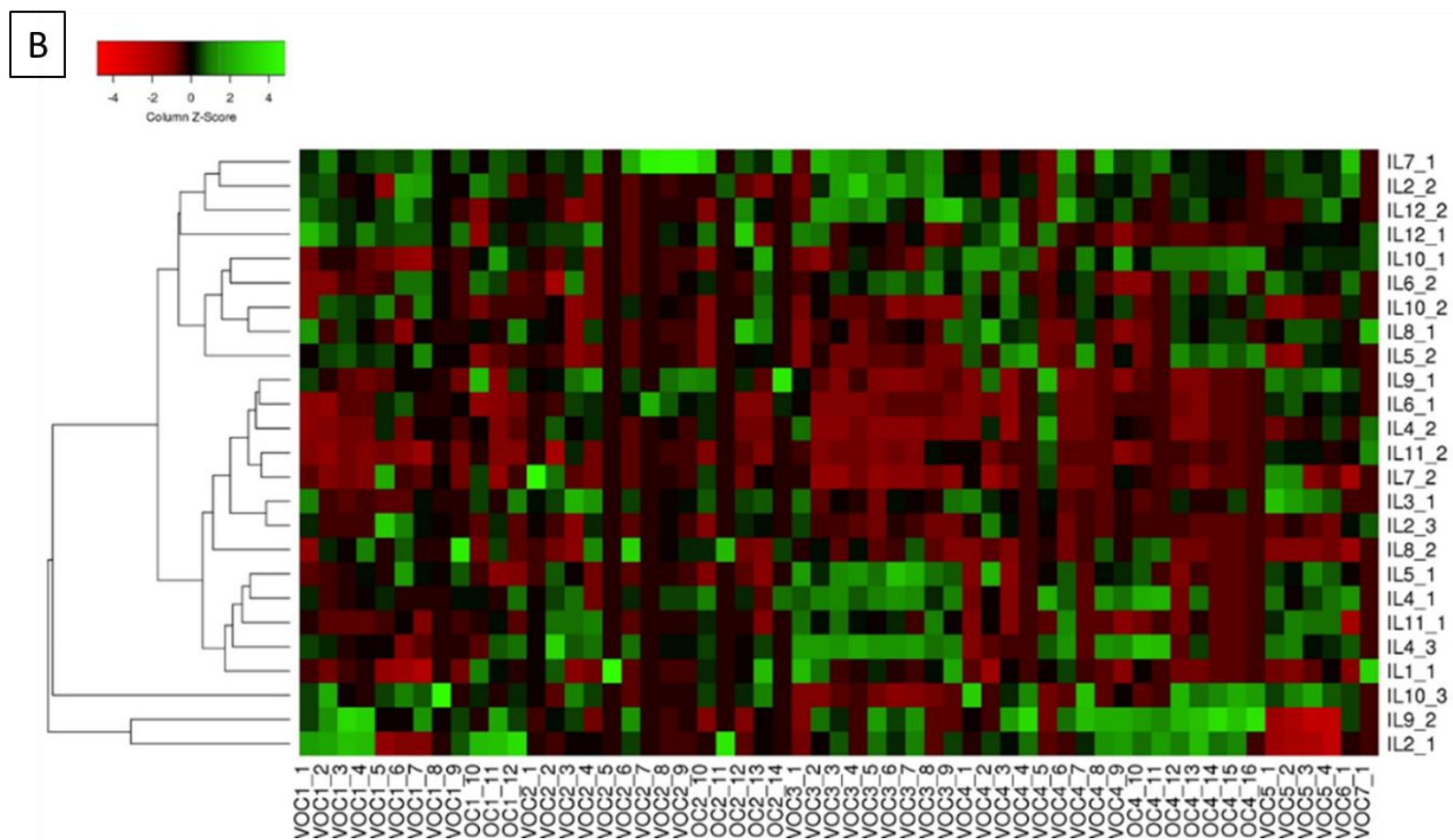


**Figure 2b.** Principal component analysis of the volatile data set. A) Loading plots of PC1 and PC2. Each volatile in the corresponding color according to volatile groups (coded as in Supp. Table 1). B) Principal component analysis of the IL population in PAIP and UPV environment. C) Eigenvalue, percent of variance and cumulative percentage of PC1, PC2 and PC3.



**Figure 3a.** Heatmap and cluster analysis (Euclidean distance, UPGMA) of the IL population, VED, MAK and F1 harvested in PAIP environment. Greenish colors imply higher contents of the volatiles, whilst reddish colors imply lower contents. Equivalence of figure codes of volatiles in Supp. Table 1.





**Figure 3b.** Heatmap and cluster analysis (Euclidean distance, UPGMA) Universitat Politècnica de València (UPV). Greenish colors imply higher contents of the volatiles, whilst reddish colors imply lower contents. Equivalence of figure codes of volatiles in Supp. Table 1.

#### 4.4.3. Effect of the assay on VOCs content

The PCA performed with the ILs data of both environments (Fig. 2b) showed a higher variability in UPV than in PAIP environment. The effect of the assay on VOCs content was expected, as it is well known that volatiles are affected by environment (Beaulieu, 2006; Bernillon et al., 2013). In general, fruits of the ILs grown in PAIP had similar average alcohol levels than fruits harvested in UPV. Total alcohols averaged 936.92 *versus* 961.98 ng.g<sup>-1</sup> in PAIP and UPV (ranging from 498.74 to 2116.28 ng.g<sup>-1</sup> and from 218.95 to 2649.48 ng.g<sup>-1</sup>, respectively) (Supp. Table 3). However, the total amount of aldehydes was higher in UPV (ranging from 13.95 to 230.73 ng.g<sup>-1</sup>, with an average of 70 ng.g<sup>-1</sup>) than in PAIP (15.36 to 90.23 ng.g<sup>-1</sup>, with an average of 39.15 ng.g<sup>-1</sup>). The two esters classes were differentially affected, whereas the amount of acetate esters was similar in both environments (970.79 ng.g<sup>-1</sup>, range 206.44 to 1998.69 ng.g<sup>-1</sup> *versus* 862.52 ng.g<sup>-1</sup>, range 241.45 to 1739.24 ng.g<sup>-1</sup>, in PAIP and UPV, respectively), the total amount of alkyl esters was higher in PAIP (1523.73 ng.g<sup>-1</sup>, ranging from 531.57 to 3202.29 ng.g<sup>-1</sup>) than in UPV (1085.59 ng.g<sup>-1</sup>, ranging from 223.48 to 3097.14 ng.g<sup>-1</sup>). Regarding the apocarotenoids content, this was lower in PAIP (21.11 ng.g<sup>-1</sup>, ranging from 2.72 to 84.44 ng.g<sup>-1</sup>) than in UPV (33.6 ng.g<sup>-1</sup>, ranging from 1.23 to 59.72 ng.g<sup>-1</sup>). Fruits were collected in both assays when the abscission layer appeared, but the different environmental conditions, among PAIP and UPV assays, might account for these differences. The aroma profile of UPV fruit suggests a delayed ripening in this environment.

The PCA indicated (Fig. 2b) that some ILs have similar profiles for the VOCs that explain most of the variation in both environments, but other show quite high environment effect. In general, MAK\_2-3, MAK\_3-1, MAK\_5-2, MAK\_7-2, MAK\_8-1, MAK\_10-2, MAK\_10-3 and MAK\_11\_2 have similar profiles (all with high and significant correlations between environments, Supp. Table 3), although with a higher ester content in PAIP samples in most cases. However, MAK\_2-1, MAK\_4-3, MAK\_9-2, MAK\_10-1 and MAK\_12-2 have profiles in UPV and PAIP separated according to the first component (with UPV fruits richer in some specific acetate esters and alkyl esters, mainly butyrates, such as propyl butyrate and ethyl-2-methyl butyrate), whereas UPV and PAIP profiles of MAK\_1-1, MAK\_4-2, MAK\_5-1, MAK\_6-1 and MAK\_11-1 are separated according to the second component (with UPV samples having higher levels of some aldehydes, hexanal or nonanal, and apocarotenoids, but lower of alkyl esters). The ILs MAK\_2-2, MAK\_4-1, MAK\_6-2, MAK\_7-1, MAK\_8-2, MAK\_9-1 and MAK\_12-1 were separated according with both components and had the highest effect of the environment over the main VOCs profile.

The heatmap with the data of the PAIP (Fig. 3a) and UPV (Fig. 3b) also showed this environmental effect, although it reflected some similarities in both assays. ILs were grouped into two main clusters in both environments, one with a few ILs more similar to VED, with high alcohol and alkyl esters content, although low in apocarotenoids (consistently MAK\_2-1 and MAK\_9-2), and the main one with most of the ILs more similar to MAK, subdivided in two main subclusters, one with a more MAK-like profile (being consistently MAK\_6-1, MAK\_4-1, MAK\_4-2 and MAK\_3-1), and the other with some ILs with consistent similar VOCs profiles in both environments (such as MAK\_2-2 and MAK\_7-1). Some lines maintained high levels of specific volatiles in both environments, such as the MAK\_1-1, the one with the highest levels of eugenol and MAK\_4-3, the one with the lowest reduction in apocarotenoid levels compared with VED and rich in aldehydes (Supp. Table 3).

#### 4.4.4. Correlation network among VOCs

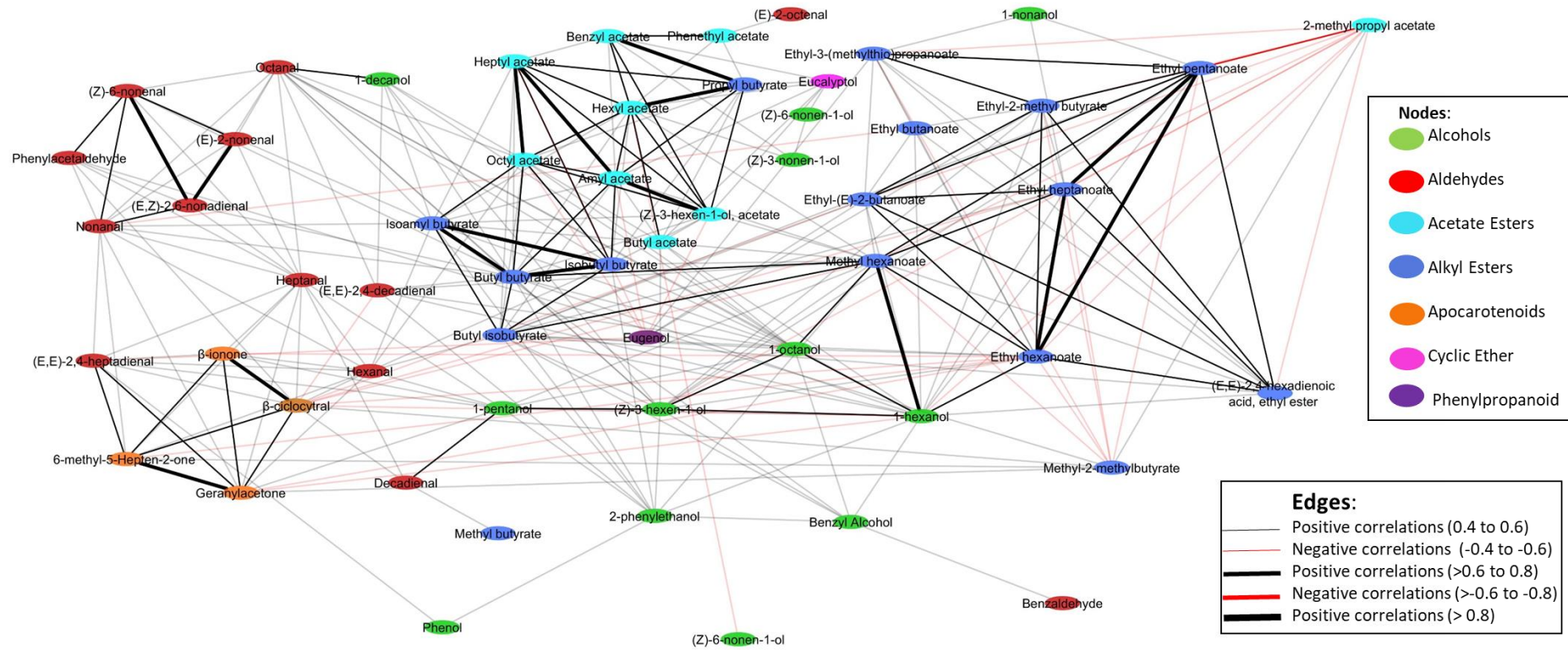
Correlations of VOCs contents between both environments were calculated (Supp. Table 5). A 40 % of VOCs showed moderate significant correlations ( $R^2 > 0.35$ ). Interestingly, these significant correlations between both environments were found in some of the main alcohols and aldehydes (1-hexanol, hexanal, and phenylacetaldehyde) and also within the group of alkyl esters, which have deep effects on melon aroma perception, and also apocarotenoids. The lowest correlation occurred in the acetate esters. A Cytoscape analysis was run to study VOCs network interactions (Fig. 4). The network obtained mostly identified correlations within groups of compounds for esters, aldehydes, and apocarotenoids. In the case of esters, two subgroups were identified considering the correlations registered. The first group included acetate esters and the butyrate subgroup of alkyl esters, except from the ethyl-2-methyl butyrate. Compounds from this first group were found in similar concentrations in both parents or were more abundant in MAK than in VED melons as described above (Supp. Table 3). The second group included other alkyl esters, more abundant in VED fruit, including ethyl-3-(methylthio) propanoate, ethyl butanoate, ethyl-2-methyl butyrate, and ethyl hexanoate, known to have a key role in setting the typical melon aroma profile (Beulieu and Grim, 2001; Amaro et al., 2013; Gonda et al., 2016). The highest within group correlations were found within these two esters groups, especially among some acetates, among butyrates, and among ethyl esters (penta, hexa and heptanoates). Freilich et al. (2015) and Esteras et al. (2018), employing a RIL population (derived from the cross between PI 414723 (*C. melo* group *Momordica*) and ‘Dulce’ cv. (*C. melo* group *Cantalupensis*), and a core collection of melon germplasm, respectively, found the highest correlations between acetate and ethyl esters, although all kind of esters were

significantly correlated. Even using different materials, their clustering pattern in both studies was quite similar to the one obtained with these ILs.

Aldehydes grouped together, as previously reported by Esteras et al. (2018), with the exception of benzaldehyde, which appeared grouped with alcohols, and (E)-2-octenal which grouped with acetates. Within the group of aldehydes, higher correlations were found among C-9 aldehydes and phenylacetaldehyde.

Alcohols appeared mostly scattered among esters. Nevertheless, high correlations were found among C5, C6 and C8 alcohols. The fact that alcohols appeared scattered among esters was expected, as they are used as precursors by alcohol acyltransferases (AATs), in the formation of esters (Burger et al., 2006). Freilich et al. (2015) also found that ethyl esters grouped with their alcohol precursors.

Apocarotenoids strongly correlated among them and with the aldehyde (E,E)-2,4-heptadienal. The strong correlations among apocarotenoids was also expected. All of them derive from carotenoid degradation (Burger et al., 2006) *via* carotene cleavage dioxygenase (CCDs), as in the case of other vegetables such as tomato or watermelon (Lewinsohn et al., 2005; Ibdah et al., 2006). Following a similar pathway, the strong correlation between  $\beta$ -ciclo-cytral and  $\beta$ -ionone would point to the common origin from  $\beta$ -carotene degradation as reviewed by these authors. For the rest of apocarotenoids, geranylacetone would derive from carotenoids from the first half of the carotenoid biosynthesis pathway, as well as 6-methyl-5-hepten-2-one, which can also be derived from  $\delta$ -carotene (Vogel et al., 2008).



**Figure 4.** Correlation network analysis of the accumulation of volatiles. The nodes represent the volatiles, grouped considering their chemical family (see color legend). Positive and negative correlations are indicated with black and red lines, respectively, with variable thickness considering their strength (see legend).

#### 4.4.5. Specific effects of MAK introgressions on VOC accumulation

##### *High levels of eugenol in IL MAK\_1-1*

The IL MAK\_1-1 was the line among the ILs with the highest levels of eugenol in both assays (4.92 and 1.94 ng.g<sup>-1</sup> in PAIP and UPV respectively). This phenylpropanoid was abundant in MAK and not detected in VED (Supp. Table 3). The GBS data showed that this line has a major introgression in Chr.1 (from 6.785.822 to 28.575.758 pb), that is only partially shared by MAK\_6-1 (13.242.386 to 16.830.387 pb), and a small introgression in Chr. 7 (1.044.582 to 2.497.023 pb) that is shared with MAK\_7-1, MAK\_7-2 and MAK\_10-1 (Supp. Table 2). None of these ILs share this trait. Interestingly the specific region of MAK\_1-1 contains one farnesyl pyrophosphate synthase *CmFPPS1* (MELO3C024967: 10.314.385-10.318.697 pb) (Supp. Table 6), a key enzyme for the synthesis of terpenoids (Dubey et al., 2003; Saladié et al., 2105), and a 4-coumarate:CoA ligase (4CL) (MELO3C024886: 11.806.353-11.810.755 pb), involved in the synthesis of diverse compounds derived from the phenylpropanoid pathway. Specifically, 4CLs are involved in the conversion of hydroxycinnamic acids in their corresponding Coenzyme A esters, which are precursors in the synthesis of eugenol. In fact, the expression of 4CLs has been directly related with the production of eugenol in other species (Rastogi et al., 2013). MAK alleles of this gene present in MAK\_1-1 could account for the high eugenol contents specific of this line.

In melon eugenol has been reported to be the major volatile constituent of the skin of ‘Queen’s Anne pocket melon’ (*C. melo* group Dudaim) (Aubert and Pitrat 2006), a group of aromatic melons with a unique aroma, so it needs to be studied how this high eugenol level affects consumer perception of MAK\_1-1 aroma. Additionally, increasing the knowledge on eugenol synthesis would have an added interest, as it has been related with antifungal and antimicrobial activity, and in tomato it has been shown that it contributes to the defence against TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*). Furthermore, eugenol has been described as a bioactive compound promoting benefits in human health, thus its accumulation would be interesting to increase the functional value of the fruit (Atkinson, 2016).

##### *High levels of aldehydes and apocarotenoids in IL MAK\_4-3*

MAK\_4-3 had a singular VOCs profile, with the highest levels of aldehydes recorded in both environments, including aldehydes with a high reported impact in green, leafy and fresh melon aroma, such as hexanal. At the same time, it was the IL with an apocarotenoid profile more similar to VED, contrasting with the profile of most ILs that reduced significantly the apocarotenoids content. The GBS analysis detected two introgressions in this IL, the one in

#### *Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds*

Chr. 4 (33.060.774-34.122.550 pb) and an additional one in Chr. 11 (5.677.104-13.283.619 pb) (Supp. Table 2). This additional introgression is completely shared with MAK\_4-2, another IL that did not display any of the two characteristic traits of MAK\_4-3 aroma profile. Interestingly, the introgression in Chr. 4 of MAK\_4-3 is only partially shared with MAK\_4-1 (33.101.237-34.122.550 pb), an IL with moderate aldehydes and low apocarotenoids content. That is, MAK\_4-3 has a specific introgression in Chr. 4 flanked by SNP\_33.060.774 (MAKMAK genotype) and SNP\_27.745.979 (VEDVED genotype), so genes within this region cannot be discarded. This genomic interval includes two interesting genes involved in VOCs metabolism (Supp. Table 6). One of them is MELO3C030975 (28.830.018-28.838.794 pb), a branched-chain-amino-acid aminotransferase. These type of enzymes are known to be involved in the synthesis of aldehydes from branched-chain aminoacids (Gonda et al., 2016). Thus, the presence of the MAK allele might be linked with the increase of aldehyde content detected in this line in comparison with VED. However, it would be necessary to increase the marker density in this interval to better define the recombination point, to see if the MAK allele of MELO3C030975 is introgressed or not. In this region also maps the carotenoid isomerase *CmCRTISO1* (MELO3C009571: 131.107.278- 31.114.107 pb; Saladié et al., 2015). *CmCRTISO1* isomerizes all four cis-double bonds in prolycopene yielding all-trans-lycopene from which different carotenoids are synthesized (Galpaz et al., 2013). The high apocarotenoids content found in MAK\_4-3, unique among the ILs, could be related with specific carotenoids accumulation in this ILs associated to the function of the *CRTISO* MAK alleles in a VED genetic background. Further analyses of the MAK\_4-3 carotenoid profile are necessary to test this hypothesis.

#### *MAK VOCs profiles in MAK\_6-1 and MAK\_4-1*

As stated before MAK\_6-1 was the IL with the VOCs profile more similar to MAK. This IL had the highest number of MAK introgressions in the VED background (Supp. Table 2) which probably accounts for this strong effect on VOCs accumulation. Its profile was studied in more detail by analyzing 6 individual fruits, three per environment (Fig. 5). The individual analysis confirmed the significant effect on the reduction of alkyl esters that most contribute to melon aroma (ethyl-3-(methylthio) propanoate, ethyl butanoate, ethyl-2methyl butyrate, ethyl pentanoate and ethyl hexanoate). However, MAK\_6-1 had most acetate esters contents similar to VED. This low alkyl ester profile is shared with other ILs, such as the MAK\_4-1 (Fig. 5), with which MAK\_6-1 do not share genomic regions. MAK\_6-1 has, however, an exclusive region in Chr. 6 (2.177.861-5.949.182 pb) (Supp. Table 2) that includes the genes MELO3C006703 (5.190.527-5.193.590 pb; CoA ligase) and MELO3C006545 (4.040.429-

4.055.853 pb; long-chain acyl-CoA synthetase). Acyl-CoA synthetases, also called acyl-CoA ligases generate acyl-CoA substrates from fatty acids that are used to form different esters by alcohol acyl-transferases (AAT) (Shalit et al., 2001; Gonda et al., 2016). In other crops, such as tomato, qualitative differences in ester composition have been related with differences in efficiency or acyl-CoA specificity of the AAT enzymes involved in ester synthesis (Goulet et al., 2015). Also in melon, Freilich et al. (2015) analysing a RIL collection showed that *CmAAT-1* (MELO3C024771: Chr. 11, 8.184.873-8.187.698 pb) produced eight out of ten prominent acetate esters, while *CmAAT-2* (MELO3C024766: Chr. 11, 8.060.892-8.063.565 pb) correlated with six compounds including ethyl esters, thio-esters, and thio ethyl esters (El-Sharkway et al., 2005; Lucchetta et al., 2007; Yahyaoui et al., 2002). MAK\_6-1 has VED alleles of the two *CmAAT* genes, and also of two additional AAT genes, *CmAAT-3* (MELO3C024762 : Chr. 11, 7.933.534- 7.935.291 pb) and *CmAAT-4* (MELO3C017688: Chr. 7, 26.408.004- 26.409.442). Differential production of acyl-CoA substrates by MAK alleles and differential AAT specificity of VED proteins may account for part of these differences in esters profiles. MAK alleles for *CmAAT* genes are in MAK\_4-2, MAK\_4-3, MAK\_11-1, and MAK\_11-2, ILs with MAK-like profiles that deserve further characterization.

The analysis of individual samples also confirms that MAK\_4-1 showed important reductions in the content of alkyl esters (Fig. 5), while the levels of acetate esters were high. This profile is similar to that of MAK\_6-1, but with higher content in some acetate esters (such as Z-3-hexen-1-ol, acetate) and in some alkyl ester (propyl butyrate). This IL presented three introgressions, two on Chr. 4 (1.743.247-2.994.383 pb and 33.101.237-34.122.550 pb) and one on Chr. 12 (14.951.154-22.514.823 pb) (Supp. Table 2). Two genes located in the exclusive introgression of this IL on Chr. 4 are related to the production of esters. MELO3C003373 (665.354-665.653 pb) is an allyl alcohol dehydrogenase, and MELO3C003454 (1.361.276-1.364.284 pb) is a branched-chain-amino-acid aminotransferase. MAK\_4-1 also shares an introgression with MAK\_4-2 and MAK\_3-1 with low levels of alkyls esters (Supp. Table. 3), in which MELO3C003803 (4.801.220-4.803.110 pb), the *CmBAMT* gene maps, involved in the production of esters through the L-phenylalanine route. Further studies are needed to see if any of these genes affect alkyl content.

#### 4.4.6. Pleiotropic effects of MAK introgressions

Some of the effects on volatile accumulation of MAK introgressions may have their origin in genes with pleiotropic effects affecting other traits, such as flesh color, color of the inner rind and ripening behaviour. In this sense, while most ILs showed the typical orange flesh with green inner rind of VED, MAK\_2-1 and MAK\_9-2 developed green fleshed fruits (Perpiñá et al.,



2016). On the other hand, MAK\_6-1, MAK\_8-2, and MAK\_12-1 presented a yellow band in the internal rind, differing from the rest of ILs that had the typical VED, green, internal rind (described in Perpiñá et al., 2016). Other lines had altered ripening behaviour. It was the case of MAK\_7-2 and MAK\_10-1, which had already been described as non-climacteric in the previous study by Perpiñá et al. (2016). The VOCs profile of these lines was studied in more detail by analyzing individual fruit harvested in both environments and are further described below.

#### 4.4.6.1. Green flesh and yellow inner rind

MAK\_2-1 and MAK\_9-2 presented the lowest apocarotenoids content (Fig. 5) compared with the orange-fleshed ILs. The major differences were found in the content of 6-methyl-5 hepten-2-one and mainly geranylacetone, much lower in these two ILs compared to VED and to the other ILs. This characteristic is likely due to the lack of carotenoid precursors, considering the green flesh of these lines. In fact, the low accumulation of these VOCs has been reported previously in melons with green or white flesh (Burger et al., 2006). Melon fruit flesh color can be white, green, and orange. The main carotenoid accumulated in orange-fleshed cultivars, such as VED, is  $\beta$ -carotene (Burger et al., 2010). Fruit flesh color is governed by two major *loci* in Chr 9 and 8. The gene underlying the *locus* of Chr 9 has been cloned and characterized, *CmOr* gene, MELO3C005449 (Tzuri et al., 2015). *CmOr* is involved in the regulation of chromoplasts, and their carotenoid storage capacities and formation (Tzuri et al., 2015). Two candidates have been proposed to explain the effect of the locus in Chr 8. One is *CmPPR1* (MELO3C003069), that encodes a member of the pentatricopeptide protein family, involved in processing of RNA in plastids, where carotenoid and chlorophyll pigments accumulate (Galpaz et al., 2018), and the second is MELO3C003097 (Protein SLOW GREEN 1, chloroplastic) (Zhao et al., 2019). Classic studies indicate that these *loci* interact epistatically:  $CmOr^{+}/Chr8^{+}$  and  $CmOr^{+}/Chr8Chr8$  allelic combinations have orange flesh,  $CmOrCmOr/Chr8^{+}$  white flesh and  $CmOrCmOr/Chr8Chr8$  green flesh. MAK fruits are white-fleshed, so this cultivar has the recessive (no orange) allele *CmOr* and the white allele of the candidate of the *locus* in Chr. 8,  $Chr8^{+}$ , being the MAK genotype  $CmOrCmOr/Chr8^{+}Chr8^{+}$ . On the other hand, the VED cultivar has the dominant (orange) allele  $CmOr^{+}$  and the recessive (green) allele of *Chr8* (whose presence is apparent in the green color of the inner rind of VED fruit), being the VED genotype  $CmOr^{+}CmOr^{+}/Chr8Chr8$ .

Both ILs MAK\_2-1 and MAK\_9-2 share a MAK introgression in Chr. 9 (21.547.871-25.241.434 pb), homozygous in both lines, that includes *CmOr* (MELO3C005449: 21.683.406–21.690.712 pb), and also share a VED genotype in the Chr. 8 region where map *CmPPR1*

(MELO3C003069: 31.800.854- 31.807.421 pb) and MELO3C003097: 32.003.211- 32.007.029 pb) (Supp. Table 2 and 6). Therefore, according to the GBS genotyping results, MAK\_9-2 and MAK\_2-1 would have the genotype *CmOrCmOr* (from MAK) and *Chr8Chr8* (from VED), displaying green flesh. The oxidative cleavage of carotenoids leads to the production of apocarotenoids and it is catalyzed by a family of carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) (Gonda et al., 2016). CCDs often exhibit substrate promiscuity, which probably contributes to the diversity of apocarotenoids found in nature. We have found 6 CCD genes (Supp. Table 6) in the melon genome, mapping at Chr. 1, 3 6 and 11, but no one is in MAK introgressions of MAK\_2-1 and MAK\_9-2, thus suggesting that the significant reduction in apocarotenoids is in these ILs a consequence of the lack of carotenoid precursors more than of the effect of CCD MAK alleles.

Regarding flesh color, a set of ILs showed a different phenotype. MAK\_6-1, MAK\_8-2 and MAK\_12-1 have the inner rind yellow instead of green as VED and the other ILs (Perpiñá et al., 2016). The VOCs analysis in individual samples of MAK\_6-1 and MAK\_8-2 (Fig. 5) confirm a level of apocarotenoids significantly lower than that of VED, but higher than that of the green fleshed MAK\_2-1 and MAK\_9-2, mainly for 6-methyl-5-hepten-2-one and geranylacetone levels. MAK\_6-1, MAK\_8-2 and MAK\_12-1 share an introgression including the MAK region in which map the two candidates of the *locus* in Chr. 8 involved with flesh color (white-green flesh) (MELO3C003069 and MELO3C003097). These ILs have the genotype *CmOR<sup>+</sup>CmOR<sup>+</sup>* (from VED) and *Chr8<sup>+</sup>Chr8<sup>+</sup>* (from MAK), that confers orange color to flesh, but the typical green color of the VED inner rind change to yellow color due to the dominant allele (white) of the *locus* in Chr. 8. This color change does not seem to differentially affect their apocarotenoid profile, as the two ILs with this phenotype analysed individually, MAK\_6-1 and MAK\_8-2, did not differ from ILs MAK\_7-2 and MAK\_4-1 (Fig. 5) that have the VED genotype for both *loci CmOr<sup>+</sup>CmOr<sup>+</sup>/Chr8Chr8* displaying fruit with VED-like flesh and inner rind color. The fact that ILs with VED genotype in *CmOr* and in *Chr8*, such as MAK\_7-2 and MAK\_4-1, have significantly lower amounts of apocarotenoids than VED parental suggest the influence of other genes on carotenoids precursors accumulation or cleavage to apocarotenoids in these and most ILs (Supp. Table 3).

#### 4.4.6.2. Climateric behaviour

MAK\_7-2 and MAK\_10-1 did not form an abscission layer at full maturity and exhibit a significant delay in the formation of the layer compared to VED (Perpiñá et al., 2016). Fruits from those ILs had also firmer flesh and higher sugar content than VED melons (Perpiñá et al., 2017). Interestingly, these two ILs share a common region in Chr. 10 (1.335.417-2.206.788 pb)

where maps the gene MELO3C012215 (1.933.739-1.938.444 pb), a NAC domain-containing protein that could be related with this trait, as recent research has associated another NAC domain transcription factor (MELO3C016540: Chr. 6, 27.663.292-27.665.351 pb) with melon climacteric ripening (Ríos et al., 2017).

Ripening behavior regulated by ethylene is related with the development of some VOCs, especially with those sensitive to ethylene production, such as esters and apocarotenoids (Freilich et al., 2015). In agreement, both lines showed low levels of esters and apocarotenoids compared to VED (Supp. Table 3). The profile of MAK\_7-2 was further studied with individual samples (Fig. 5). Its profile of alcohols was similar to VED, but with lower levels of some alcohols as 1-hexanol, one of the main alcohols of ‘Charentais’ melons (Beaulieu and Grimm, 2001; Allwood et al., 2014), and higher levels of (E,Z)-2,6-nonadien-1-ol (described as typical cucumber and melon odor) compared to VED and the ILs population. The aldehydes content was quite variable (Fig. 5), but in general MAK\_7-2 presented significantly lower values than VED of hexanal, and of other aldehydes more typical of cantaloupe melons, such as octanal (Obando-Ulloa et al., 2010; Bai et al., 2014). Interestingly, MAK\_7-2 presented significantly higher values of benzaldehyde than VED and most ILs (Fig. 5). These changes in alcohols and aldehydes content can be a consequence of the delayed ripening, but also an effect of MAK introgressions with specific aminotransferases (Supp. Table 2). Interestingly, in the specific region of Chr. 7 of MAK\_7-2 (2.701.809-27.623.980 pb) maps MELO3C025614 (5.068.667-5.071.324 pb), the aromatic amino-acid aminotransferase *CmArAT1* (MELO3C025613: 5.071.692-5.075.274, Gonda et al., 2016), which catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenyl pyruvate from which benzaldehyde can be derived (Gonda et al., 2010). Also in this region map several MAK PAL genes (L-phenylalanine ammonia-lyase, MELO3C017809 (27.312.256-27.314.607 pb), MELO3C017810 (27.317.836-27.320.203 pb) and MELO3C017811 (27.322.473-27.324.829 pb), known to lead the L-phenylalanine through the phenylpropanoid pathway.

The low ester content of MAK\_7-2 was confirmed (Fig. 5) as this IL displayed one of the lowest esters levels among the selected ILs (Fig. 5). It released levels of some specific acetate esters (amyl acetate, Z-3 hexen-1-ol acetate, hexyl acetate, heptyl acetate, and octyl acetate) and alkyl esters (Ethyl-3-(methylthio) propanoate, ethyl butanoate, ethyl-2-methyl butyrate, ethyl pentanoate and ethyl hexanoate) significantly lower, not only than VED, but also than other climacteric MAK-derived ILs. MAK\_7-2 showed very low levels of the alkyl esters most relevant to the ‘Charentais’ aroma (Allwood et al., 2014; Spadafora et al., 2019) (ethyl butanoate: 402.1 vs 1452.2 ng.g<sup>-1</sup>; isobutyl butyrate: 0.31 vs 4.8 ng.g<sup>-1</sup>; ethyl hexanoate: 16.4

vs 450.65 ng.g<sup>-1</sup>, respectively for MAK\_7-2 and VED), but also showed very low levels of acetate esters that are typical of MAK melons (Bai et al., 2014), such as the hexyl acetate (11.7 vs 132.05 ng.g<sup>-1</sup>, respectively for MAK\_7-2 and VED). The observed reduction of esters typical of both parents, VED and MAK, suggests pleiotropic effect of the ripening delay, although the effect of MAK alleles of genes directly involved in ester production located in MAK\_7-2 specific introgressions could also account for part of these variations. For example, the alcohol acyl transferase *CmAAT4* (MELO3C017688: 26.408.004-26.409.442 pb) (El-Sharkawy et al., 2005; Lucchetta et al., 2007), involved in the formation of esters through the esterification of specific alcohols and acyl-coA, and demonstrated to be up-regulated during ripening and inhibited in antisense ACO, non-climacteric melons.

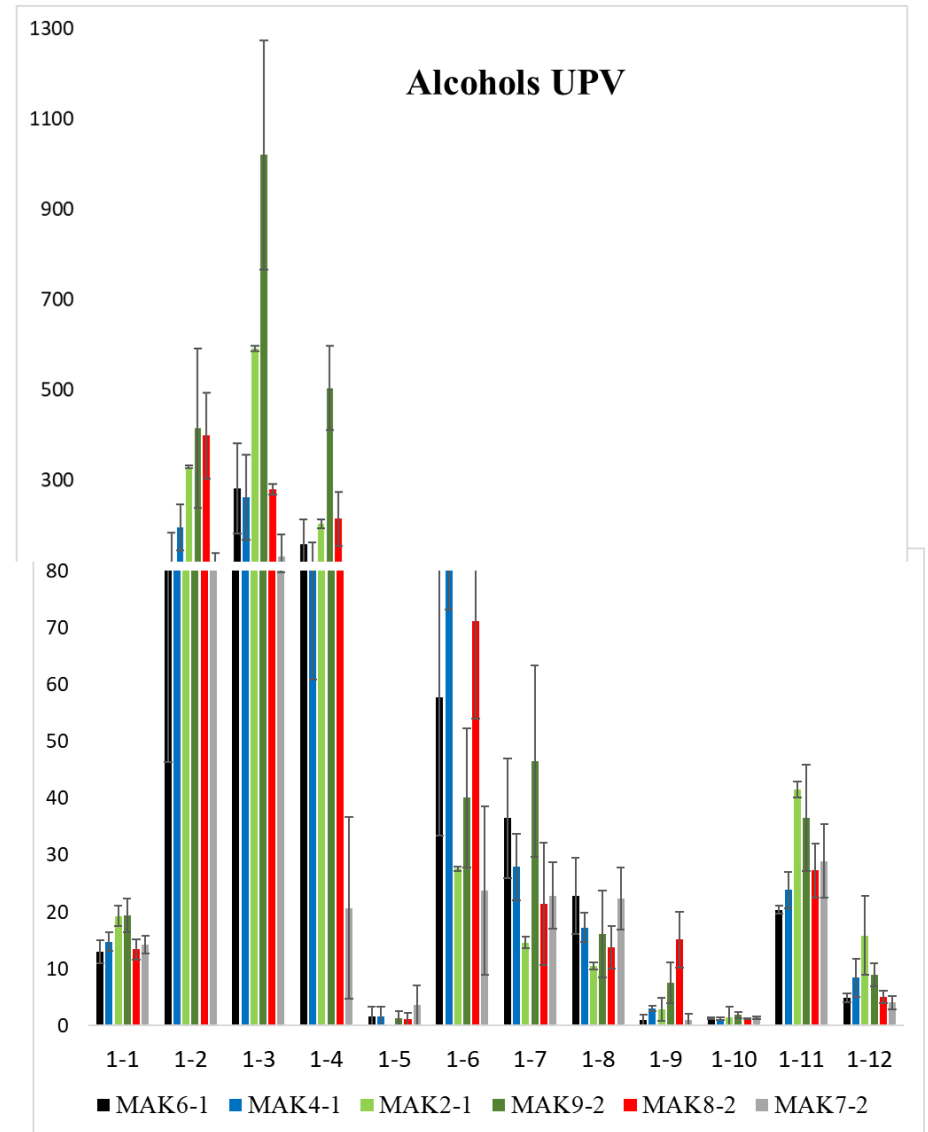
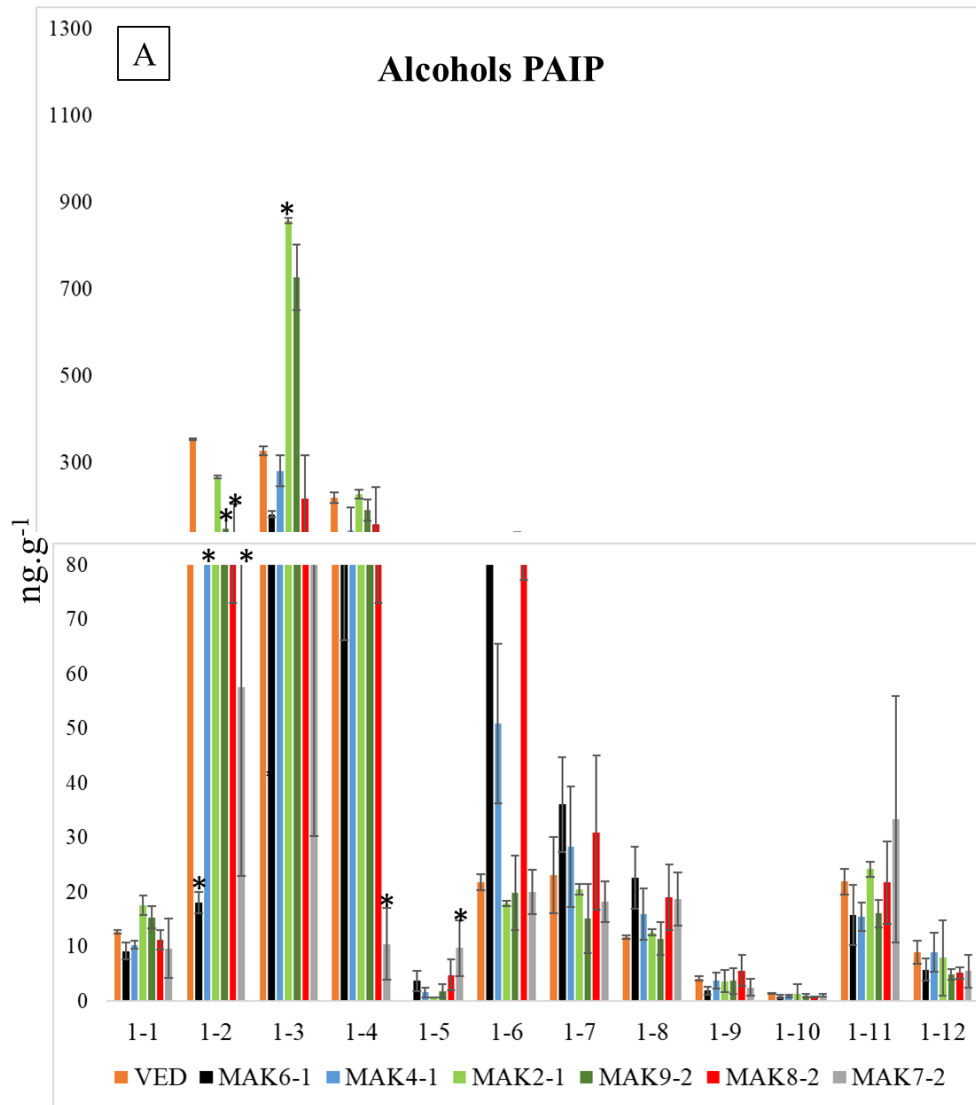
Despite the altered profile due to the ripening delay, the aroma of MAK\_7-2 still differ from non-climacteric non aromatic melons, such as the non-climacteric model the Spanish cultivar ‘Piel de Sapo’ (*Cucumis melo* subsp. *melo* group Ibericus). The aroma of this melon has been studied in detail compared with that of the climacteric model VED (Obando et al., 2008; Esteras et al., 2018). ‘Piel de Sapo’ aroma has higher levels than VED of key aldehydes, such as hexanal, whose levels in MAK\_7-2 were reduced compared to VED. Also the ‘Piel de Sapo’ profile is characterized by low acetate and alkyl esters, some of which are still similar to VED in MAK\_7-2 (2-methyl propyl acetate, benzyl acetate and methyl-2-methyl butyrate).

Also the MAK\_7-2 profile is richer in esters than that reported for VED melons in which climacteric ripening has been inhibited using the antisense gene aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO), a key enzyme for climacteric ripening (Bauchot et al., 1998), as this non-climacteric VED melons reduce by a 97 % the lower and potent odorants 2-methylpropyl acetate and ethyl-2-methylbutanoate, similar or only moderately reduced in MAK\_7-2 compared to VED (2-methylpropyl acetate: 230.4 vs 144.8 ng.g<sup>-1</sup>; ethyl-2-methylbutanoate: 138.2 vs 927.85 ng.g<sup>-1</sup>). Also this non-climacteric line still retained levels of some of the main aroma contributors similar to those found in other climacteric ILs and VED. Then the intermediate climacteric ripening of MAK\_7-2, along with the effect of MAK introgressions are not enough to completely block the ester profile.

MAK\_7-2 also had a significant reductions of apocarotenoids content (Fig. 5) similar to other ILs. This IL is orange fleshed and Perpiña et al. (2016) did not report flesh color differences with VED melons. In its specific introgression there are several genes involved in carotenoid biosynthesis, including *CmPSY3* (Chr. 7, MELO3C016185: 21.849.416- 21.852.838 pb; Saladié et al., 2015), MELO3C017709 (Chr. 7, 26.522.044-26.525.060 pb), a zeta carotene isomerase, a phytoene desaturase, *CmPDS* (Chr. 7, MELO3C017772: 27.001.123-2.7011.565

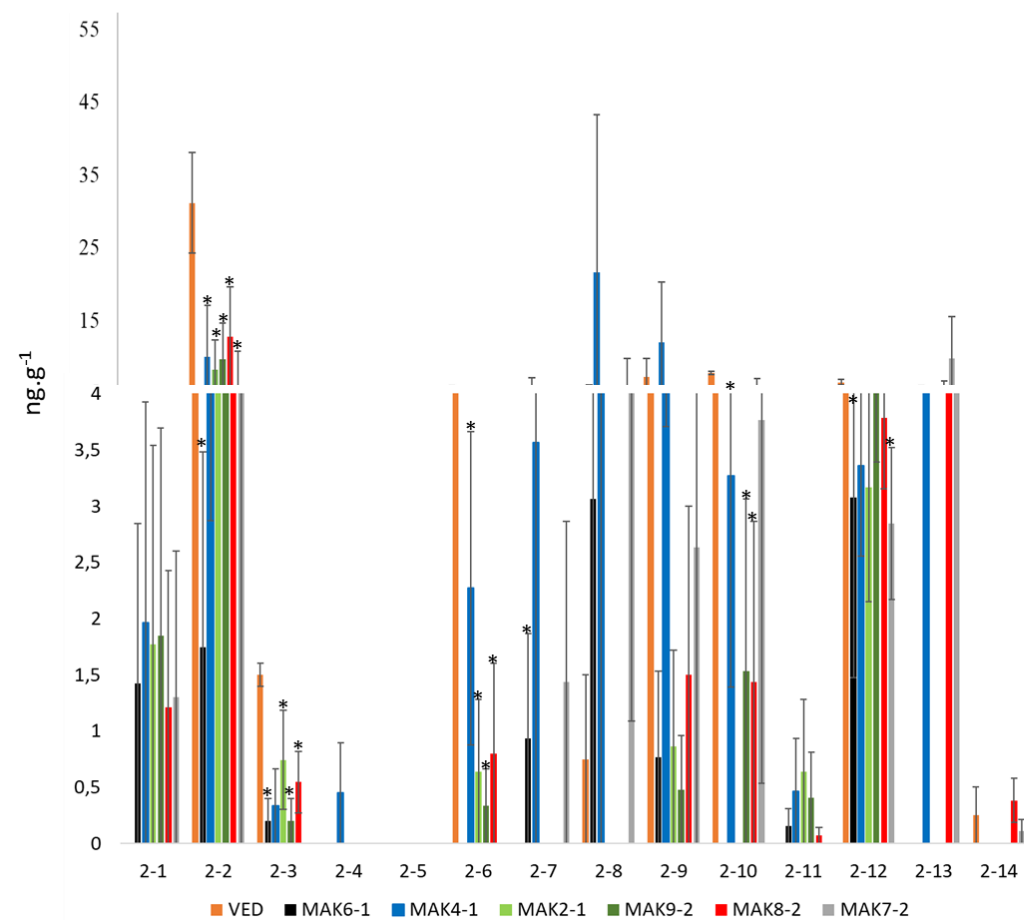
*Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds*

pb; Saladié et al., 2015), and MELO3C016224 (Chr. 7, 22.480.061-22.482.158 pb), a putative epoxy-carotenoid digxygenase, related with the carotenoid degradation pathway). Further analysis are to see if carotenoid precursors are affected in this ILs that can affect apocarotenoids profile.

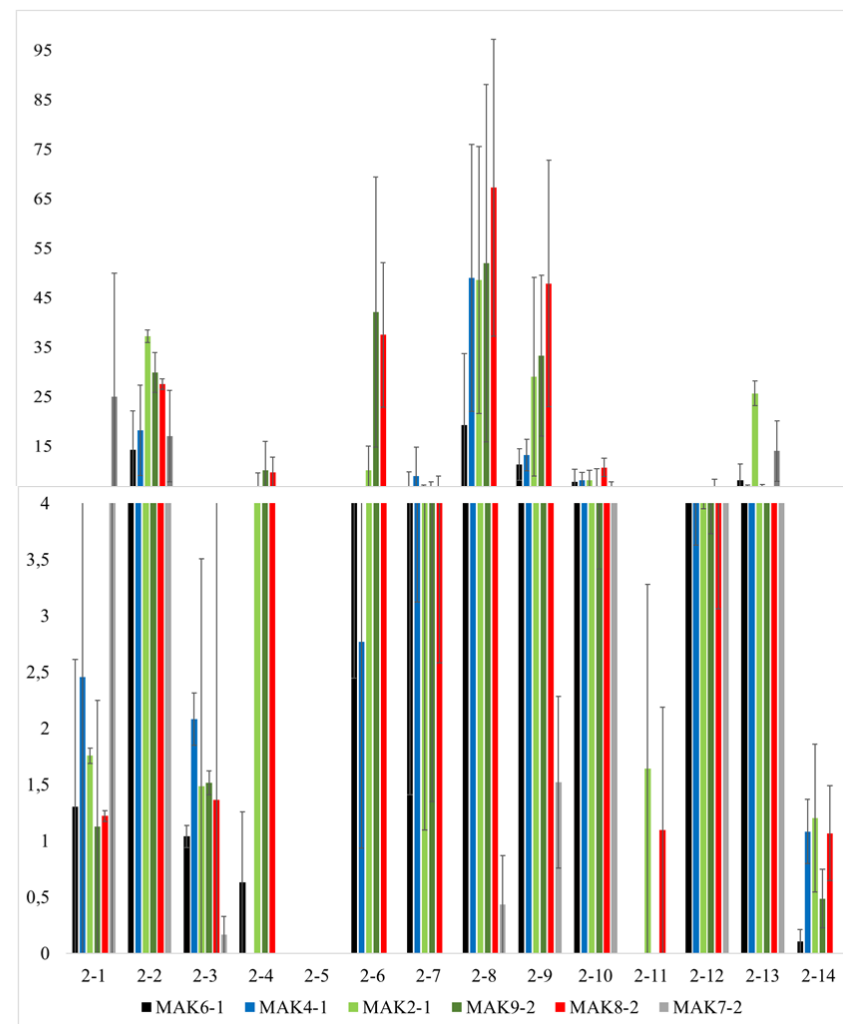


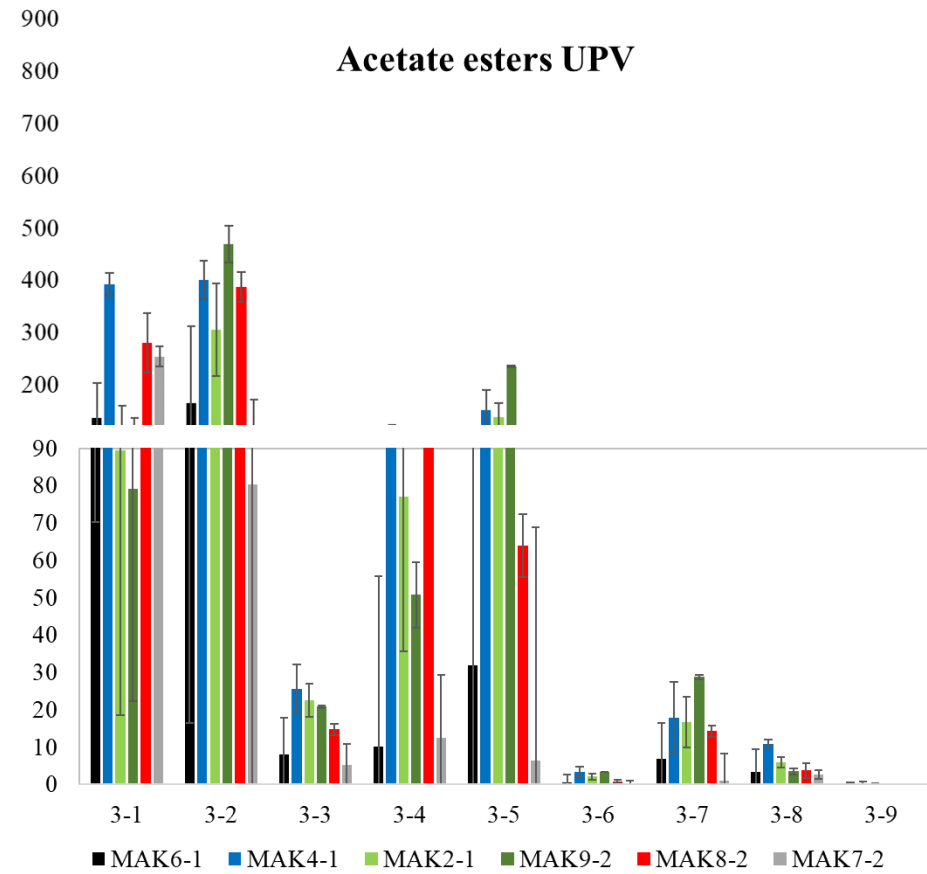
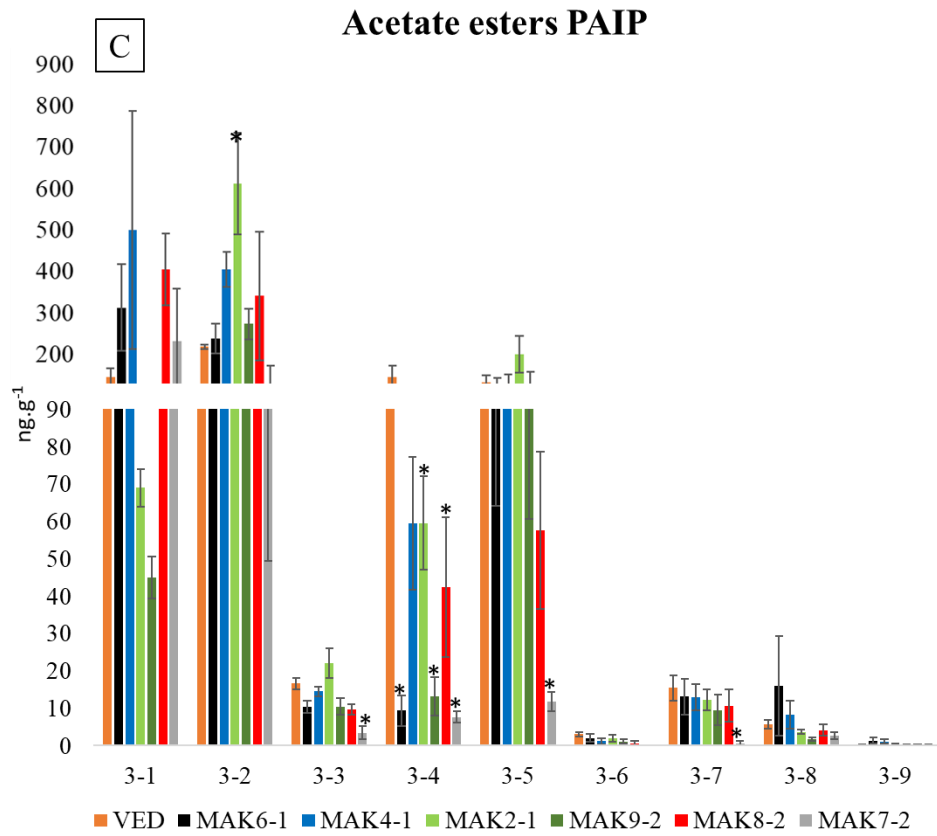
B

### Aldehydes PAIP



### Aldehydes UPV

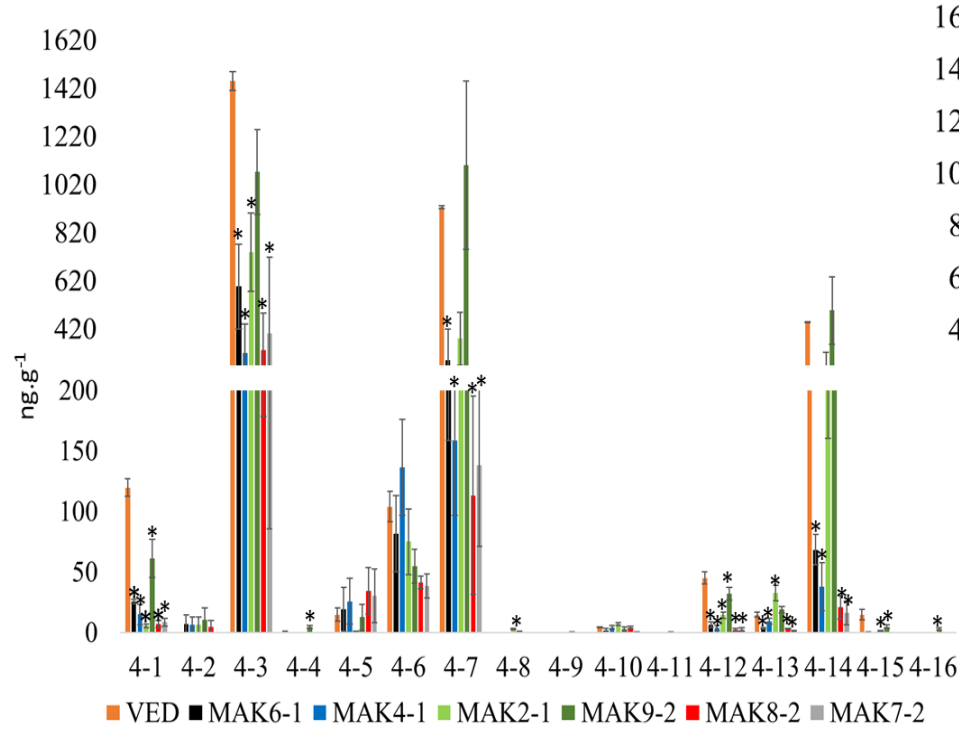




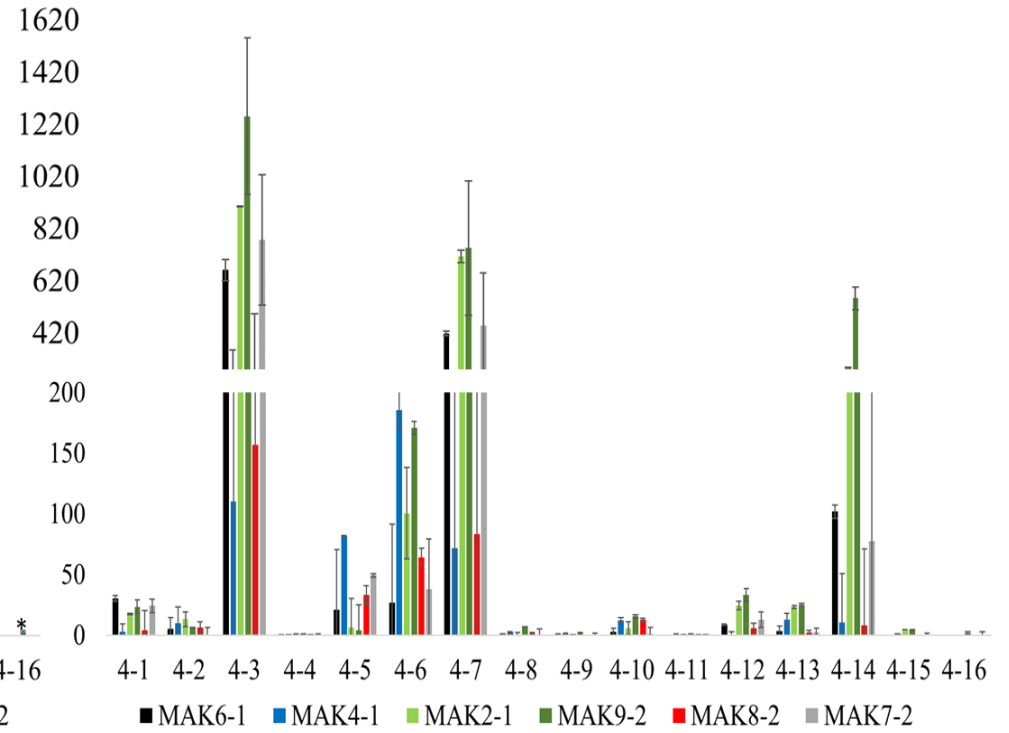


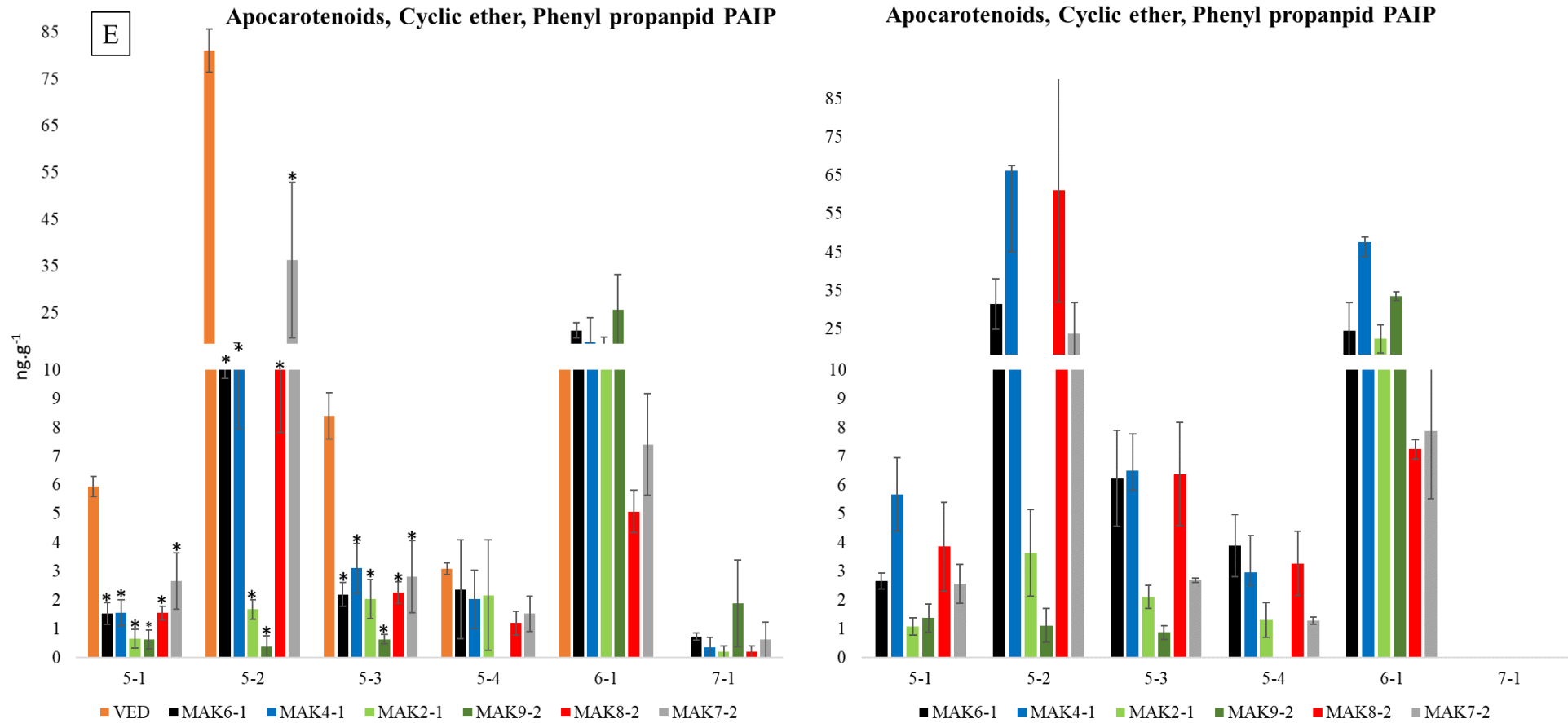
D

Alkyl esters PAIP



Alkyl esters UPV





**Figure 5.** Quantities (ng.g<sup>-1</sup>) of the compounds detected in the selected ILs and VED in PAIP, and selected ILs in UPV, for alcohols (Figure 5A), aldehydes (Figure 5B), acetate esters (Figure 5C), alkyl esters (Figure 5D), apocarotenoids, cyclic ether y phenylpropanoid (Figure 5E). \* Significant differences regarding VED in PAIP environment. Equivalence of figure codes of volatiles in Supp. Table 1.

## 4.5. Conclusions

MAK introgressions in the VED background in general reduced the accumulation of VOCs in fruit. The F1 VOC profile suggest a dominant effect of MAK alleles. Our results showed a more pronounced reduction for alkyl esters and apocarotenoids than other VOCs families such as alcohols, aldehydes and acetate esters. Although a strong environmental effect has been observed between trials, we have found several ILs with similar profiles in both environments.

We detected interesting lines with specific VOCs affected by specific MAK introgressions with candidate genes. MAK\_1-1 with the highest amounts of eugenol that contains a MAK 4CL gene (MELO3C024886, 4-coumarate:CoA ligase), which is involved in the eugenol pathway. MAK\_4-3, with the highest level of aldehydes that has introgressed a MAK region with an AT gene (MELO3C030975, branched-chain-amino-acid aminotransferase) related with aldehydes production and *CmCRTISO1* (MELO3C009571, carotenoid isomerase) related with the specific carotenoids accumulation. MAK\_6-1 with a VOCs profile similar to MAK, contains the acyl-CoA ligases MAK genes (MELO3C006703 and MELO3C006545) and alcohol acyl transferase VED genes *CmAAT-3* and *CmAAT-4*, that could explain the differences in esters profiles. Also, we observed some effects of the volatiles profiles that can be a pleiotropic effect of a differential carotenoids accumulation, such as the low levels of 6-methyl-5 hepten-2-one and mainly geranyl acetone in two green flesh IL (MAK\_2-1 and MAK\_9-2). Finally, we reported the effect of an altered ripening pattern found in MAK\_7-2 on esters and apocarotenoids profiles, resulting in a new ester profile different from classical non aromatic and non-climacteric inodorus melons, characterized by an intermediate accumulation of alkyl esters, the main contributors to melon aroma.

These results confirm the effect of different MAK introgressions on VED aroma. The information generated about the candidate regions and genes will be of interest to avoid negative effects when using MAK genetic resources in breeding programs and also to develop new lines with VED background but new aroma profiles.

## Acknowledgements

This study was partially supported by ‘Programa de Valorización y Recursos Conjuntos de I + D + i VLC/CAMPUS’ funded by the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte as part of the ‘Programa Campus de Excelencia Internacional’ and the projects AGL2017-85563-C2-1-R-AR and AGL2014-53398-C2-2-R-AR funded by Ministerio de Economía Industria Y Competitividad and FEDER funds, and by PROMETEO project 2017/2018 (to promote excellence groups) by the Consellería d’Educació, Investigació, Cultura I Esports (Generalitat Valenciana). The enthusiasm of the authors made up for the lack of public funds to support the remaining part (one-half) of costs.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

## Supplementary tables

**Supplementary table 1.** Volatiles quantified in the ILs, figure codes, Chemical Abstract Service numbers (CAS no.), molecular weights (MW), retention time (Rt), retention index (RI)<sup>a</sup> and quantitation ions (Quan. ion), linearity range and coefficient of determination ( $r^2$ ) of the calibrations.

**Supplementary table 2.** Name code of each IL with the location (chromosome) of the introgressions carried, the size (Mb) of each introgression. The physical position of each introgression (v3.6.1) and percentage of background genome. Introgressions in bold correspond to the introgressions previously detected in Perpiñá et al. (2016). In the introgression with homozygous and heterozygous alleles, physical position of heterozygous fragment.

**Supplementary table 3.** Accumulation of volatiles ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) in the recurrent parent ‘Vedrantais’, VED, the donor parent Makuwa, MAK, F1 grown in the Paiporta, PAIP, environment, and ILs grown in the Paiporta (PAIP) and Universitat Politècnica de València (UPV). Relative accumulation compared to the recurrent parent ‘Vedrantais’ is given in the PAIP environment. Correlations and their corresponding P-values between the volatile profile of each IL and environment.

**Supplementary table 4. 4 a.** Vector tables of Principal Component and Component Weight of ILs, VED, MAK and F1 of PAIP environment. Table of Principal Component order goes from the greatest to the least vector of Component 1. Table of Component Weight order goes from the greatest to the least vector of each component. **Supplementary table 4 b.** Vector tables of Principal Component and Component Weight of ILs of PAIP and UPV environment. Table of

*Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds*

Principal Component order goes from the greatest to the least vector of Component 1. Table of Component Weight order goes from the greatest to the least vector of each component.

**Supplementary table 5.** Correlations, and their corresponding P-values, between the contents of each volatile in the Paiporta and Valencia environments. Positive values indicate higher values in Valencia , UPV.

**Supplementary table 6.** Genes related with aroma volatile biosynthesis in melon fruits that are affected by the Makuwa, MAK, introgressions in certain lines. Gene codes as described in [www.melonomics.net](http://www.melonomics.net). The physical position (v3.6.1) and description of each gene and the introgression lines with MAK alleles are indicated. Italicized ILs represent that the location of the gene is between the last SNP of the introgression and the next SNP. Bold ILs represent that the location of the gene is between a heterozygous and a homozygous allele.

**Supplementary table 1.** Volatiles quantified in the ILs, figure codes, Chemical Abstract Service numbers (CAS no.), molecular weights (MW), retention time (Rt), retention index (RI)<sup>a</sup> and quantitation ions (Quan. ion), linearity range and coefficient of determination ( $r^2$ ) of the calibrations.

	Volatiles code	Compound name	CAS no.	MW	Rt (min)	RI	Quan Ion (m/z)	Linearity range	$r^2$
						(SupelcoWax 10)		(ng mL <sup>-1</sup> )	
Alcohols	1-1	1-pentanol	71-41-0	88	12.91	1162	55	128 - 3195	1
	1-2	(Z)-3-hexen-1-ol	928-96-1	100	17.57	1297	67	51 – 5050	0.992
	1-3	1-hexanol	111-27-3	102	16.54	1267	56	205 – 4100	1
	1-4	1-octanol	111-87-5	130	23.14	1474	55	41 - 2063	0.999
	1-5	(E,Z)-2,6-nonadien-1-ol	28069-72-9	140	29.15	1685	67	22 - 2183	0.999
	1-6	(Z)-3-nonen-1-ol	10340-23-5	142	26.8	1600	67	24 – 4750	1
	1-7	(Z)-6-nonen-1-ol	35854-86-5	142	27.75	1634	67	37 – 7455	0.999
	1-8	1-nonanol	143-08-8	144	26.15	1585	55	41- 4140	0.999
	1-9	1-decanol	112-30-1	158	29.01	1680	55	83 - 2075	0.996
	1-10	Phenol	108-95-2	94	35.24	1937	94	54 – 2173	0.988
	1-11	Benzyl Alcohol	100-51-6	108	31.99	1795	79	13 – 2500	0.999
	1-12	2-phenylethanol	60-12-8	122	32.85	1830	91	13 - 1250	0.999
Aldehydes	2-1	(E)2methyl2butenal	497-03-0	84	7.32	1010	84	175 - 6998	0.999
	2-2	Hexanal	66-25-1	100	7.2	993	56	743 – 7425	0.995
	2-3	(E,E)-2,4-heptadienal	881395	110	21.17	1408	81	22 - 2203	1
	2-4	Heptanal	111-71-7	114	10.49	1096	70	55 - 2720	1
	2-5	(E)-2-octenal	2548-87-0	126	19.05	1343	55	33 – 833	0.999
	2-6	Octanal	124-13-0	128	14.27	1200	69	50 – 2479	0.998

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

	2-7	(E)-2-nonenal	18829-56-6	140	22.43	1450	81	49 – 9780	0.982
	2-8	(E,Z)-2,6-nonadienal	557-48-2	138	23.95	1501	70	95 - 9460	0.996
	2-9	(Z)-6-nonenal	2277-19-2	140	19.75	1366	81	61 - 12260	0.988
	2-10	Nonanal	124-19-6	142	17.9	1307	57	108 – 5420	0.999
	2-11	(E,E)-2,4-decadienal	25152-84-5	152	30.3	1727	81	22 – 2180	0.996
	2-12	Decanal	112-31-2	156	21.31	1413	67	25 – 2469	0.999
	2-13	Benzaldehyde	100-52-7	106	21.97	1436	105	26 – 2613	1
	2-14	Phenylacetaldehyde	122-78-1	120	25.59	1559	91	23 - 2260	0.941
Acetate esters	3-1	2-methyl propyl acetate	110-19-0	116	4.67	926	43	111 - 2765	1
	3-2	Butyl acetate	123-86-4	116	6.51	985	43	105 - 2616	0.999
	3-3	Amyl acetate	123-86-4	116	10.11	1086	43	116 - 2900	1
	3-4	(Z)-3-hexen-1-ol, acetate	3681-71-8	142	15.3	1231	67	27 – 2660	1
	3-5	Hexyl acetate	142-92-7	144	13.73	1188	43	30 - 3038	1
	3-6	Heptyl acetate	112-06-1	158	17.27	1288	43	30 – 2975	1
	3-7	Octyl acetate	112-14-1	172	20.6	1391	43	58 - 2913	1
	3-8	Benzyl acetate	140-11-4	150	28.04	1646	108	13 - 1250	1
	3-9	Phenethyl acetate	103-45-7	164	30.38	1734	104	25 – 2452	1
Alkyl esters	4-1	Ethyl-3-(methylthio) propanoate	13327-56-5	148	23.37	1483	74	32 - 3185	1
	4-2	Methyl butyrate	623-42-7	102	4.04	900	43	454 - 2268	0.988
	4-3	Ethyl butanoate	105-54-4	116	5.94	947	71	265-2648	1
	4-4	Ethyl-(E)-2-butanoate	623-70-1	114	9.69	1074	69	26 – 2596	0.999
	4-5	Methyl-2-methylbutyrate	868-57-5	116	4.55	921	88	23 – 2270	1
	4-6	Propyl butyrate	105-66-8	130	8.24	1034	43	55 - 2745	1
	4-7	Ethyl-2-methyl butyrate	7452-79-1	130	5.8	963	57	44 – 2173	0.995
	4-8	Butyl butyrate	109-21-7	144	11.74	1131	71	60 - 2965	0.988

	4-9	Butyl isobutyrate	97-87-0	144	9.13	1059	89	22 - 2155	0.999
	4-10	Isobutyl butyrate	539-90-2	144	9.58	1071	71	30 - 2950	1
	4-11	Isoamyl butyrate	106-27-4	158	13.46	1178	70	26 - 2640	1
	4-12	Ethyl pentanoate	539-82-2	130	8.7	1047	88	25 - 2508	0.999
	4-13	Methyl hexanoate	106-70-7	130	10.58	1099	74	26 - 2643	1
	4-14	Ethyl hexanoate	123-66-0	144	12.32	1147	88	87 - 2183	1
	4-15	Ethyl heptanoate	106-30-9	158	15.88	1247	88	30 - 2980	1
	4-16	(E,E)-2,4-hexadienoic acid, ethyl ester	2396-84-1	140	21.58	1423	67	24 - 2370	0.999
Apocarotenoids	5-1	6-methyl-5-Hepten-2-one	110-93-0	126	15.99	1251	109	21 - 4260	0.999
	5-2	Geranylacetone	689-67-8	194	31.44	1773	43	44 - 4345	0.997
	5-3	$\beta$ -ionone	14901-07-6	192	33.49	1856	177	24 - 2363	0.999
Apocarotenoids	5-4	$\beta$ -ciclocytral	5392-40-5	152	24.82	1533	110	24 - 2358	0.996
Cyclic ether	6-1	Eucalyptol	470-82-6	154	10.99	1111	93	21 - 2083	1
phenylpropanoid	7-1	Eugenol	97-53-0	164	36.99	2098	164	27 - 2650	0.997
<sup>a</sup> Retention index calculated with n-alkanes on Supelcowax 10 (bonded polyethylene glycol) capillary column.									



**Supplementary table 2.** Name code of each IL with the location (chromosome) of the introgressions carried, the size (Mb) of each introgression. The physical position of each introgression (v3.6.1) and percentage of background genome. Introgressions in bold correspond to the introgressions previously detected in Perpiñá et al. (2016). In the introgression which homozygous and heterozygous alleles, physical position of heterozygous fragment.

IL	Chr.	IL size (Mb)	Homozygous/Heterozygous	IL position (pb)		% background
				Start	End	
MAK_1-1	<b>1</b>	<b>21.8</b>	Homozygous	6.785.822	28.575.758	94
	7	0.6	Homozygous	1.882.791	2.497.023	
MAK_2-1	1	0.8	Heterozygous	27.328	831.510	93.4
	<b>2</b>	<b>18.6</b>	Homozygous	1.279.455	19.882.272	
	<b>9</b>	<b>3.7</b>	Homozygous/Heterozygous (21.897.759-24.047.116)	21.547.871	25.241.434	
	11	1.7	Homozygous/Heterozygous (32.351.909-32.392.151)	30.700.104	32.392.151	
MAK_2-2	1	0.8	Homozygous	27.328	831.510	94.8
	<b>2</b>	<b>16.9</b>	Homozygous	2.943.700	19.882.272	
	11	1.7	Homozygous	30.700.104	32.392.151	
MAK_2-3	<b>2</b>	<b>10.5</b>	Homozygous/Heterozygous (25.247.416-25.247.578)	15.971.423	26.521.667	96.9
	<b>8</b>	<b>0.9</b>	Homozygous	33.745.199	34.715.638	
	11	0.0005	Heterozygous	6.977.617	6.978.141	
MAK_3-1	1	0.9	Homozygous	27.328	992.178	91.6
	<b>3</b>	<b>22.3</b>	Homozygous/Heterozygous (12.110.922-23.185.828)	4.319.686	26.681.530	
	4	0.7	Heterozygous	13.152.144	13.852.296	
	12	7.5	Homozygous	14.951.154	22.514.823	
MAK_4-1	<b>4</b>	<b>1.2</b>	Homozygous	1.743.247	2.994.383	97.6
	<b>4</b>	<b>1.0</b>	Homozygous	33.101.237	34.122.550	
	12	7.5	Homozygous	14.951.154	22.514.823	
MAK_4-2	<b>4</b>	<b>12.3</b>	Homozygous	2.631.752	14.956.862	94.7

	11	7.6	Heterozygous	5.677.104	13.283.619	
MAK_4-3	<b>4</b>	<b>1.0</b>	Homozygous	33.060.774	34.122.550	97.7
	11	7.6	Homozygous	5.677.104	13.283.619	
MAK_5-1	<b>5</b>	<b>2.7</b>	Homozygous	1.615.020	4.399.111	99.2
	<b>5</b>	<b>19.8</b>	Homozygous	4.926.554	24.792.184	
MAK_5-2	<b>5</b>	<b>8.4</b>	Homozygous	20.703.288	29.173.009	97.7
MAK_6-1	1	3.5	Homozygous/Heterozygous (13.242.386-15.601.014)	13.242.386	16.830.387	94.8
	1	0.7	Heterozygous	34.120.998	34.846.190	
	2	0.04	Heterozygous	13.495.295	13.540.954	
	5	0.03	Homozygous	4.729.567	4.762.898	
	<b>6</b>	<b>3.8</b>	Homozygous	2.177.861	6.062.186	
	<b>8</b>	<b>11.0</b>	Homozygous	21.279.831	32.350.814	
	11	0.7	Homozygous	33.636.718	34.368.904	
MAK_6-2	<b>6</b>	<b>26.8</b>	Homozygous	5.949.182	32.791.234	92.3
	<b>3</b>	0,0001	Heterozygous	119.228	119.783	
	11	2.1	Homozygous	5.677.104	7.857.919	
MAK_7-1	2	0.4	Homozygous	1.621.123	2.013.337	97.5
	3	0.3	Homozygous	59.858	420.610	
	6	4.9	Homozygous	6.875.646	11.858.167	
	<b>7</b>	<b>2.4</b>	Homozygous/Heterozygous (39.007-368.150)/(2.346.975-2.497.023)	39.107	2.497.023	
	11	0.8	Homozygous/Heterozygous (34.039.824-34.368.904)	33.477.716	34.368.904	
MAK_7-2	<b>7</b>	<b>26.5</b>	Homozygous	1.044.582	27.623.980	92.4
	<b>10</b>	<b>1.8</b>	Homozygous	1.335.417	3.196.155	
MAK_8-1	<b>8</b>	<b>1.7</b>	Homozygous	152.847	1.929.225	99.5
	9	0.04	Heterozygous	16.861.535	16.904.017	
MAK_8-2	5	0.03	Homozygous	4.729.567	4.762.898	96.4
	<b>8</b>	<b>13.4</b>	Homozygous	21.279.831	34.752.783	

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

MAK_9-1	<b>2</b>	0.4	Homozygous	1.621.123	2.013.337	97.6
	3	0.3	Homozygous	59.858	420.610	
	6	4.9	Homozygous/Heterozygous (10.546.705-10.708.212)	6.875.646	11.858.167	
	7	2.4	Homozygous/Heterozygous (39.007-368.225)/(2.346.975-2.497.023)	39.107	2.497.023	
	<b>11</b>	<b>0.8</b>	Homozygous/Heterozygous (34.039.824-33.983.340)	33.477.716	34.368.904	
MAK_9-2	<b>5</b>	<b>1.0</b>	Homozygous	23.957.513	24.997.050	93.7
	<b>9</b>	<b>23.5</b>	Homozygous	1.732.612	25.241.434	
MAK_10-1	3	0.3	Homozygous	59.858	420.610	99.2
	7	0.6	Homozygous	1.882.791	2.497.023	
	<b>10</b>	<b>1.7</b>	Homozygous	424.008	2.206.788	
MAK_10-2	<b>10</b>	<b>13.1</b>	Homozygous	3.443.278	16.613.886	96.4
MAK_10-3	<b>10</b>	<b>20.7</b>	Homozygous	4.404.666	25.162.010	94.4
MAK_11-1	5	0.6	Homozygous	26.855	717.331	91.7
	6	0.00002	Heterozygous	24.676.012	24.676.038	
	6	0.006	Heterozygous	21.914.450	21.915.145	
	<b>11</b>	<b>30.4</b>	Homozygous	35.031	30.531.403	
MAK_11-2	1	0.3	Heterozygous	27.328	425.297	92.1
	5	0.6	Homozygous	26.855	717.331	
	<b>11</b>	<b>28.6</b>	Homozygous	5.677.104	34.368.904	
MAK_12-1	5	0.03	Homozygous	4.729.567	4.762.898	93.2
	<b>8</b>	<b>13.4</b>	Homozygous/Heterozygous (31.838.681-31.838.684)/(33.859.721-33.859.782)	21.279.831	34.752.783	
	<b>12</b>	<b>11.8</b>	Homozygous	3.998.399	15.827.971	
MAL_12-2	<b>12</b>	<b>4.4</b>	Homozygous	23.065.488	27.543.193	98.8

**Supplementary table 3.** Accumulation of volatiles (ng.g<sup>-1</sup>) in the recurrent parent ‘Vedrantais’, VED, the donor parent Makuwa, MAK, F1 grown in the Paiporta, PAIP, environment, and ILs grown in the Paiporta (PAIP) and Universitat Politècnica de València (UPV). Relative accumulation compared to the recurrent parent ‘Vedrantais’ is given in the PAIP environment in brackets. Correlations and their corresponding P-values between the volatile profile of each IL and environment.

Code	Compounds	VED PAIP	MAK PAIP	F1 PAIP	MAK_1-1	
					Correlation p-value PAIP	UPV 0.0015
1-1	1Pentanol	12.78	6.32	10.67	14.81 (15.90)	13.40
1-2	(Z)3hexenol	354.58	3.94	13.80	122.41 (-65.48)	98.23
1-3	1Hexanol	327.65	97.28	34.24	413.87 (26.31)	198.12
1-4	1Octanol	219.61	28.99	21.93	47.95 (-78.17)	124.68
1-5	(E,Z)2,6Nonadienol	0.00	0.00	2.70	11.9 (1190)	0.00
1-6	(Z)3Nonenol	21.83	18.92	137.38	60.11 (175.30)	16.93
1-7	(Z)6Nonenol	23.12	16.12	60.76	59.21 (156.06)	3.21
1-8	1Nonanol	11.76	17.36	40.91	36.50 (210.28)	7.09
1-9	1Decanol	4.19	1.69	5.13	3.81 (-9.17)	0.00
1-10	Phenol	1.45	0.92	0.84	1.70 (17.77)	1.91
1-11	Benzyl Alcohol	21.96	18.09	14.00	46.83 (113.27)	32.79
1-12	2phenylethanol	9.03	0.00	0.00	10.44 (15.64)	8.03
Total alcohols		1007.96	209.62	342.35	829.57 (-17.70)	504.39
2-1	(E)2methyl2butenal	0.00	3.92	6.90	4.6 (460)	6.92
2-2	Hexanal	31.16	0.00	0.00	12.27 (-60.63)	30.50
2-3	(E,E)2,4Heptadienal	1.48	0.00	0.00	0	0.00
2-4	Heptanal	0.00	0.00	0.00	1.2 (120)	0.00
2-5	(E)2Octenal	0.00	0.00	0.00	0 (0)	2.78
2-6	Octanal	5.77	0.00	0.00	0	0.00
2-7	(E)2Nonenal	0.00	0.00	0.00	3 (300)	0.00
2-8	(E,Z)2,6Nonadienal	0.76	0.00	0.00	8.56 (1.024.68)	0.00
2-9	(Z)6Nonenal	7.31	0.00	5.49	1.80 (-75.26)	0.00
2-10	Nonanal	7.78	0.00	0.00	0	6.74
2-11	(E,E)2,4Decadienal	0.00	0.52	0.00	0 (0)	0.00
2-12	Decanal	6.50	3.89	6.06	8.92 (37.34)	6.49
2-13	Benzaldehyde	9.63	1.72	5.58	14.72 (52.83)	16.45
2-14	Phenylacetaldehyde	0.27	0.00	0.81	0	0.00
Total aldehydes		70.66	10.04	24.86	55.03 (-22.12)	69.88
3-1	2Methyl propyl acetate	144.50	321.99	172.94	58.56 (-59.47)	658.23
3-2	Butyl acetate	217.60	439.32	92.84	126.02 (-42.09)	438.06
3-3	Amyl acetate	16.68	30.14	5.80	3.37 (-79.77)	18.66
3-4	(Z)3Hexenol, acetate	145.40	4.52	9.95	3.45 (-97.63)	85.03
3-5	Hexyl acetate	132.05	187.13	23.42	11.61 (-91.21)	147.77
3-6	Heptyl acetate	3.05	6.40	0.00	0	2.81
3-7	Octyl acetate	15.50	12.34	5.76	1.70 (-89.02)	11.82
3-8	Benzyl acetate	5.70	33.71	23.27	1.47 (-74.25)	21.88
3-9	Phenylethyl acetate	0.35	2.42	1.89	0.26 (-25.54)	1.63
Total acetate esters		680.83	1037.98	335.87	206.44 (-69.68)	1385.89
4-1	Ethyl3(Methylthio) propanoate	120.05	6.06	0.00	97.63 (-18.68)	12.84
4-2	Methyl butyrate	0.00	0.00	0.00	29.4 (2940)	0.00
4-3	Ethyl butanoate	1452.20	191.86	67.09	980.11 (-32.51)	356.96
4-4	Ethyl(E)2butanoate	1.55	0.00	0.00	1.46 (-5.56)	0.00
4-5	Methyl2methyl butyrate	14.93	4.43	16.86	9.37 (-37.20)	18.23
4-6	Propyl butyrate	104.25	170.16	65.08	12.94 (-87.59)	182.74
4-7	Ethyl2methyl butyrate	927.85	52.55	6.35	1.175.25 (26.66)	143.86
4-8	Butyl butyrate	0.00	0.00	0.00	0 (0)	0.00
4-9	Butyl isobutyrate	0.00	0.00	0.00	0.5 (50)	0.00
4-10	Isobutyl butyrate	4.80	0.00	0.00	1.04 (-78.39)	4.90
4-11	Isoamyl butyrate	0.00	0.00	0.00	0 (0)	0.00
4-12	Ethyl pentanoate	45.30	0.00	0.00	9.94 (-78.06)	2.39
4-13	Methyl hexanoate	15.05	1.20	1.01	1.28 (-91.51)	2.53
4-14	Ethyl hexanoate	450.50	5.71	0.00	84.31 (-81.28)	20.05
4-15	Ethyl heptanoate	15.05	0.00	0.00	0	0.00
4-16	(E,E)2,4Hexadienoic acid, ethyl ester	0.00	0.00	0.00	1.5 (150)	0.00
Total alkyl esters		3151.50	432.00	156.40	2404.74 (-23.70)	744.5
5-1	6methyl5Hepten2one	5.97	0.43	0.72	1.76 (-70.45)	1.26
5-2	Geranylacetone	81.08	0.00	6.34	15.21 (-81.24)	12.29
5-3	Betalonone	8.40	0.16	0.99	3.92 (-53.30)	3.47
5-4	Betaclocytral	3.13	0.00	0.00	1.52 (-51.48)	1.46
Total apocarotenoids		98.60	0.59	8.00	22.41 (-77.27)	18.48
6-1	Eucalyptol	14.31	0.00	2.54	25.01 (74.75)	11.77
7-1	Eugenol	0.00	9.38	0.00	4.92 (492)	1.94
TOTAL		5023.87	1699.56	870.06	3548.13(-29.37)	2718.36

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_2-1		MAK_2-2		MAK_2-3	
	Correlation p-value PAIP	0.93 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.76 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.83 0 UPV
1-1	21.76 (70.24)	24.71	12.00 (-6.08)	18.54	9.15 (-28.39)	18.03
1-2	277.96 (-21.61)	428.47	250.51 (-29.35)	297.31	78.07 (-77.98)	155.66
1-3	1.337.72 (308.28)	1208.30	364.32 (11.19)	265.29	153.10 (-53.27)	216.71
1-4	317.60 (44.62)	524.31	53.61 (-75.59)	157.16	24.36 (-88.91)	86.47
1-5	2.07 (207)	0.00	0 (0)	0.00	2.07 (207)	13.18
1-6	38.92 (78.24)	33.46	63.54 (191.03)	119.28	106.18 (386.31)	97.42
1-7	44.69 (93.29)	25.11	32.53 (40.66)	78.21	45.24 (95.64)	48.44
1-8	22.04 (87.36)	16.68	17.22 (46.40)	39.08	28.41 (141.51)	28.73
1-9	2.54 (-39.49)	6.93	0.73 (-82.53)	2.78	1.07 (-74.45)	2.35
1-10	1.81 (25.05)	2.24	1.22 (-15.85)	1.91	1.42 (-1.98)	1.51
1-11	37.33 (69.99)	58.27	26.46 (20.53)	38.37	28.59 (30.21)	35.18
1-12	11.86 (31.37)	32.33	3.84 (-57.47)	4.98	5.21 (-42.24)	5.87
Total alcohols	2116.30 (109.96)	2360.81	825.98 (-18.05)	1022.91	482.87 (-52.09)	709.55
2-1	5.3 (530)	5.27	4.08 (408)	5.84	4.68 (468)	7.01
2-2	10.87 (-65.12)	16.56	7.27 (-76.68)	16.55	19.83 (-36.36)	15.06
2-3	1.53 (3.03)	0.83	0	1.11	0	0.00
2-4	0 (0)	1.31	0.8 (80)	0.00	0 (0)	1.83
2-5	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	1.92 (-66.72)	2.53	0	0.00	0	0.00
2-7	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-8	0	0.00	0	0.00	0	3.08
2-9	2.58 (-64.69)	0.00	0	3.33	0	0.00
2-10	0	3.60	0	3.59	0	0.00
2-11	1.92 (192)	4.92	0 (0)	1.25	0.21 (21)	0.00
2-12	5.01 (-22.96)	4.59	4.13 (-36.41)	4.90	4.82 (-25.78)	7.34
2-13	2.94 (-69.47)	7.69	8.33 (-13.52)	3.56	3.78 (-60.73)	7.75
2-14	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Total aldehydes	32.08 (-54.60)	47.3	24.63 (-65.14)	40.13	33.32 (-52.84)	42.06
3-1	79.11 (-45.25)	65.43	229.47 (58.80)	89.90	476.63 (229.84)	305.76
3-2	656.49 (201.70)	284.71	579.64 (166.38)	330.99	402.49 (84.97)	201.46
3-3	18.95 (13.61)	35.59	12.26 (-26.51)	46.82	26.94 (61.53)	18.17
3-4	34.45 (-76.31)	66.19	95.94 (-34.01)	386.73	187.39 (28.88)	49.56
3-5	113.39 (-14.13)	202.16	155.98 (18.12)	234.77	194.80 (47.52)	57.15
3-6	0	4.34	2.19 (-28.27)	8.50	5.34 (75.16)	2.54
3-7	8.33 (-46.28)	35.03	6.67 (-56.95)	32.53	13.77 (-11.15)	12.69
3-8	2.84 (-50.24)	6.79	11.87 (108.23)	46.52	103.29 (1.712.07)	4.21
3-9	0.36 (3.52)	1.02	0.92 (162.33)	0.80	3.23 (823.72)	0.34
Total acetate esters	913.92 (34.24)	701.26	1094.94 (60.82)	1177.56	1413.88 (107.67)	651.88
4-1	9.06 (-92.46)	27.42	16.63 (-86.15)	33.59	30.57 (-74.54)	24.32
4-2	19.4 (1940)	40.07	27.5 (2750)	16.22	11.34 (1134)	51.64
4-3	623.04 (-57.10)	420.10	1.207.32 (-16.86)	396.90	594.31 (-59.08)	395.64
4-4	0.61 (-60.77)	1.45	1.95 (25.79)	0.78	0	0.00
4-5	1.22 (-91.84)	5.80	6.67 (-55.31)	1.02	2.98 (-80.00)	17.12
4-6	38.81 (-62.77)	83.65	65.71 (-36.97)	218.18	327.96 (214.59)	43.97
4-7	240.17 (-74.12)	420.60	592.56 (-36.14)	204.70	503.92 (-45.69)	120.39
4-8	2.7 (270)	3.01	0 (0)	1.47	0 (0)	0.00
4-9	0.7 (70)	1.80	0.2 (20)	0.84	0.61 (61)	0.63
4-10	7.13 (48.57)	10.15	2.19 (-54.41)	8.67	3.98 (-17.03)	3.64
4-11	0 (0)	1.11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
4-12	19.14 (-57.76)	29.61	12.47 (-72.47)	20.96	14.60 (-67.77)	6.51
4-13	38.91 (158.56)	30.11	7.27 (-51.69)	13.08	8.93 (-40.66)	4.32
4-14	408.58 (-9.30)	300.13	259.11 (-42.48)	148.43	183.42 (-59.28)	31.17
4-15	2.61 (-82.65)	4.42	1.83 (-87.85)	2.15	2.95 (-80.37)	0.00
4-16	0 (0)	0.00	2.89 (289)	0.00	0 (0)	0.00
Total alkyl esters	1412.00 (-55.20)	1379.43	2204.36 (-30.05)	1066.99	1685.57 (-46.52)	699.35
5-1	0.98 (-83.63)	0.52	1.20 (-79.92)	2.58	2.24 (-62.48)	1.42
5-2	2.33 (-97.12)	1.08	5.41 (-93.32)	33.74	25.40 (-68.67)	20.81
5-3	3.38 (-59.81)	1.64	2.82 (-66.44)	5.41	2.79 (-66.78)	3.54
5-4	0.32 (-89.90)	0.00	1.14 (-63.57)	1.75	0.63 (-79.71)	0.99
Total apocarotenoids	7.01 (-92.89)	3.24	10.57 (-89.28)	43.48	31.06 (-68.49)	26.76
6-1	22.83 (59.48)	22.5	23.45 (63.82)	41.49	46.76 (226.63)	27.37
7-1	0.6 (60)	0	0.46 (460)	0	0 (0)	0.62
TOTAL	4504.71(-10.33)	4511.3	4184.40(-16.71)	3349.08	3693.50(-26.48)	2130.83

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_3-1		MAK_4-1		MAK_4-2	
	Correlation	0.87	Correlation	0.76	Correlation	0.75
	p-value	0	p-value	0	p-value	0
	PAIP	UPV	PAIP	UPV	PAIP	UPV
1-1	8.70 (-31.96)	22.16	9.53 (-25.42)	17.72	8.27 (-35.29)	9.76
1-2	60.50 (-82.94)	144.24	93.65 (-73.59)	157.51	81.52 (-77.01)	96.88
1-3	146.38 (-55.32)	149.73	214.80 (-34.44)	273.79	249.06 (-23.99)	76.03
1-4	22.40 (-89.80)	91.00	81.52 (-62.88)	145.14	59.60 (-72.86)	32.43
1-5	1.43 (143)	2.02	2.2 (220)	4.92	2.12 (212)	5.04
1-6	81.81 (274.68)	46.26	71.47 (227.35)	60.04	57.53 (163.47)	43.72
1-7	118.59 (412.84)	47.40	21.42 (-7.36)	39.15	28.05 (21.30)	44.56
1-8	40.41 (243.51)	24.86	13.92 (18.34)	22.44	17.92 (52.35)	30.72
1-9	0.91 (-78.27)	2.21	1.41 (-66.24)	3.95	0	1.21
1-10	1.40 (-3.45)	1.79	1.32 (-9.06)	1.69	1.50 (3.64)	1.63
1-11	32.30 (47.09)	28.30	16.35 (-25.55)	29.46	30.63 (39.47)	20.57
1-12	8.90 (-1.38)	16.56	7.88 (-12.73)	15.02	4.43 (-50.98)	5.84
Total alcohols	523.74 (-48.04)	576.53	535.45 (-46.88)	770.83	540.63 (-46.36)	368.39
2-1	8.5 (850)	10.02	0 (0)	7.37	4.16	4.53
2-2	12.65 (-59.41)	28.24	23.35 (-25.05)	26.21	0	28.80
2-3	1.80 (21.38)	2.60	0.84 (-43.37)	1.62	0	0.91
2-4	0 (0)	3.54	0 (0)	0.00	0 (0)	1.89
2-5	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	0	2.61	0	2.07	0	0.00
2-7	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-8	1.80 (136.18)	3.41	0	7.47	0	2.69
2-9	6.36 (-13.01)	10.52	0	19.49	0	2.17
2-10	7.20 (-7.47)	9.35	0	11.35	0	6.80
2-11	0.21 (21)	0.00	3.76 (376)	0.00	0.2 (20)	0.00
2-12	7.38 (13.67)	7.57	3.76 (-42.08)	7.55	5.07 (-22.03)	3.96
2-13	6.17 (-35.94)	10.04	4.33 (-55.08)	5.03	8.03 (-16.60)	4.56
2-14	0.78 (189.88)	0.00	0.65 (140.73)	0.52	0	0.00
Total aldehydes	52.85 (-25.20)	87.91	36.78 (-47.95)	88.68	17.46 (-75.29)	56.31
3-1	526.69 (264.49)	378.38	1.060.22 (633.71)	345.08	458.16 (217.07)	388.42
3-2	208.43 (-4.21)	181.09	370.81 (70.41)	463.98	393.12 (80.66)	69.72
3-3	11.23 (-32.69)	23.01	13.17 (-21.08)	41.72	16.27 (-2.45)	7.84
3-4	62.18 (-57.23)	89.36	84.96 (-41.57)	187.53	51.62 (-64.50)	33.84
3-5	74.62 (-43.49)	59.80	119.05 (-9.85)	221.17	111.22 (-15.77)	27.97
3-6	1.51 (-50.58)	3.96	0	7.63	0	0.00
3-7	4.55 (-70.67)	18.57	6.25 (-59.71)	35.77	4.76 (-69.31)	2.21
3-8	62.63 (998.79)	13.52	14.58 (155.71)	22.64	18.60 (226.32)	4.89
3-9	3.83 (995.16)	1.22	1.52 (333.65)	1.23	0.74 (110.59)	0.19
Total acetate esters	955.67 (40.37)	768.91	1670.56 (145.37)	1326.75	1054.49 (54.88)	535.08
4-1	23.10 (-80.76)	61.40	2.07 (-98.27)	7.92	46.57 (-61.21)	1.41
4-2	53.3	34.75	19.51 (1951)	29.49	29.46	35.13
4-3	191.90 (-86.79)	376.73	96.32 (-93.37)	130.37	50.84 (-96.50)	51.45
4-4	0	0.00	0	0.00	0	0.00
4-5	50.37 (237.48)	18.47	63.67 (326.61)	56.59	5.27 (-64.68)	53.02
4-6	113.43 (8.81)	74.52	186.85 (79.23)	195.84	200.44 (92.27)	53.52
4-7	136.86 (-85.25)	122.62	49.12 (-94.71)	84.81	274.79 (-70.38)	19.05
4-8	0 (0)	0.00	0 (0)	3.03	0 (0)	0.00
4-9	0 (0)	0.57	0 (0)	1.33	0 (0)	0.66
4-10	1.59 (-66.84)	2.38	3.16 (-34.10)	15.65	2.20 (-54.11)	4.66
4-11	0 (0)	0.00	0 (0)	1.41	0 (0)	0.00
4-12	2.69 (-94.06)	17.64	0	1.60	7.87 (-82.63)	0.00
4-13	4.22 (-71.98)	7.40	4.86 (-67.71)	16.53	8.18 (-45.68)	2.18
4-14	29.27 (-93.50)	86.28	6.00 (-98.67)	20.30	106.71 (-76.31)	2.41
4-15	0	2.88	0	0.00	0.78 (-94.80)	0.00
4-16	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
Total alkyl esters	606.76 (-80.75)	805.64	431.57 (-86.31)	564.87	733.11 (-76.74)	223.49
5-1	2.09 (-64.95)	5.18	1.78 (-70.21)	3.25	1.20 (-79.87)	1.34
5-2	23.58 (-70.92)	46.55	17.35 (-78.60)	23.87	8.98 (-88.93)	18.91
5-3	3.11 (-62.98)	6.07	3.31 (-60.61)	5.29	3.12 (-62.82)	4.25
5-4	1.07 (-65.67)	1.92	1.37 (-56.19)	2.09	1.33 (-57.38)	1.86
Total apocarotenoids	29.85 (-69.72)	59.72	23.81 (-75.85)	34.5	14.63 (-85.16)	26.36
6-1	25.36 (77.13)	21.98	12.83 (-10.37)	43.19	17.66 (23.40)	21.95
7-1	0 (0)	0	1.05 (105)	0	2.01 (201)	0.71
TOTAL	2194.23(-56.32)	2260.97	2712.05(-46.02)	2794.32	2379.99(-52.63)	1205.93

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_4-3		MAK_5-1		MAK_5-2	
	Correlation p-value PAIP	0.7 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.65 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.78 0 UPV
1-1	32.54 (154.56)	18.57	12.45 (-2.59)	12.59	16.20 (26.78)	15.71
1-2	442.94 (24.92)	248.88	456.00 (28.60)	164.64	154.16 (-56.52)	268.75
1-3	931.46 (184.28)	234.00	758.87 (131.61)	233.17	434.11 (32.49)	574.77
1-4	309.36 (40.87)	143.95	513.21 (133.69)	179.58	331.75 (51.06)	219.29
1-5	4.52 (452)	4.18	1.91 (191)	3.25	2.21 (221)	6.00
1-6	22.11 (1.28)	38.24	111.65 (411.37)	113.76	80.31 (267.82)	65.25
1-7	25.31 (9.46)	33.48	87.89 (280.08)	47.96	34.67 (49.92)	69.28
1-8	14.85 (26.22)	16.59	60.66 (415.70)	30.35	21.90 (86.16)	38.08
1-9	3.60 (-14.01)	2.54	8.42 (101.01)	6.56	3.38 (-19.39)	3.59
1-10	1.39 (-4.15)	1.53	1.22 (-15.71)	1.57	1.30 (-10.28)	1.43
1-11	30.55 (39.15)	37.98	53.39 (143.14)	18.50	16.24 (-26.05)	25.09
1-12	5.41 (-40.04)	14.68	10.33 (14.48)	2.65	3.96 (-56.09)	6.04
Total alcohols	1824.05 (180.96)	794.62	2076.00 (105.96)	814.58	1100.19 (9.13)	1293.28
2-1	7.17	7.26	2.57 (257)	3.73	7.55 (755)	5.52
2-2	35.11 (12.68)	58.04	29.00 (-6.93)	30.01	11.83 (-62.03)	15.48
2-3	3.00 (102.05)	1.42	0	0.95	0	0.00
2-4	4.36 (436)	2.84	0 (0)	0.00	1.13 (113)	0.00
2-5	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	6.53 (13.23)	3.28	3.13 (-45.69)	0.00	0	0.00
2-7	3.36 (336)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-8	6.63 (771.28)	4.37	0	1.60	0 (76)	1.72
2-9	11.10 (51.82)	12.65	1.87 (-74.39)	1.89	3.32 (-54.62)	2.11
2-10	0	7.92	0	0.00	0	0.00
2-11	0.33 (33)	0.00	0.46 (460)	0.00	0.67 (670)	0.00
2-12	5.38 (-17.22)	6.43	3.16 (-51.37)	4.41	3.79 (-41.70)	6.17
2-13	6.84 (-28.96)	9.81	38.51 (299.93)	2.71	4.23 (-56.07)	7.77
2-14	0.41 (51.69)	0.00	0	0.00	0	0.00
Total aldehydes	90.23 (27.70)	114.02	78.73 (11.42)	45.29	32.54 (-74.52)	38.78
3-1	444.23 (207.42)	503.84	162.32 (12.33)	518.29	488.61 (238.14)	44.87
3-2	580.58 (166.81)	573.99	789.14 (262.66)	346.34	480.38 (120.76)	247.59
3-3	10.63 (-36.27)	45.07	17.29 (3.67)	41.60	14.64 (-12.24)	13.94
3-4	33.82 (-76.74)	285.81	98.22 (-32.45)	256.91	78.94 (-45.71)	36.52
3-5	36.35 (-72.47)	243.44	228.16 (72.79)	201.65	205.42 (55.56)	73.96
3-6	0	7.66	4.00 (31.10)	10.76	2.67 (-12.35)	1.38
3-7	6.25 (-59.68)	43.75	35.62 (129.83)	49.12	21.35 (37.75)	12.32
3-8	2.53 (-55.54)	34.38	8.35 (46.52)	33.25	5.12 (-10.19)	2.64
3-9	0.22 (-38.51)	1.30	0.79 (126.66)	1.05	0.53 (50.20)	0.27
Total acetate esters	1114.61 (63.71)	1739.24	1343.89 (97.39)	1458.97	1297.66 (692.64)	433.49
4-1	17.47 (-85.45)	5.30	17.77 (-85.19)	3.47	22.97 (-80.87)	53.16
4-2	46.98 (4698)	19.92	0 (0)	74.65	30.6 (306)	21.66
4-3	805.99 (-44.50)	272.88	603.48 (-58.44)	95.80	1.021.65 (-29.65)	677.59
4-4	0.56 (-64.04)	0.00	0	0.00	0.65 (-57.83)	2.42
4-5	109.07 (630.78)	31.33	3.99 (-73.26)	18.16	50.31 (237.10)	3.28
4-6	24.89 (-76.12)	280.63	128.14 (22.92)	195.05	103.34 (-0.87)	65.68
4-7	486.34 (-47.58)	113.79	285.21 (-69.26)	52.01	350.60 (-62.21)	881.68
4-8	0 (0)	2.84	0 (0)	1.02	0 (0)	0.00
4-9	0.56 (56)	1.58	0.48 (480)	0.98	0.27 (27)	0.79
4-10	3.73 (-22.30)	18.82	2.03 (-57.80)	8.57	1.33 (-72.26)	1.17
4-11	0 (0)	1.51	0.71 (710)	0.00	0 (0)	0.00
4-12	5.53 (-87.80)	3.49	8.05 (-82.22)	0.00	8.59 (-81.03)	30.04
4-13	9.23 (-38.68)	13.55	16.46 (9.40)	5.75	10.36 (-31.14)	16.00
4-14	32.02 (-92.89)	26.39	125.10 (-72.23)	4.44	223.02 (-50.50)	339.42
4-15	0	0.00	0.59 (-96.06)	0.00	1.19 (-92.08)	3.14
4-16	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	2.49
Total alkyl esters	1542.38 (-51.06)	792.03	1192.01 (-62.18)	459.9	1824.90 (3.628.80)	2096.03
5-1	5.37 (-10.13)	3.16	0.77 (-87.05)	2.76	0.90 (-84.89)	1.08
5-2	67.09 (-17.26)	38.64	8.99 (-88.91)	27.60	4.02 (-95.04)	8.16
5-3	8.66 (3.13)	4.70	2.90 (-65.50)	5.95	2.60 (-69.00)	4.91
5-4	3.33 (6.37)	1.72	0.93 (-70.43)	2.01	1.03 (-67.21)	1.69
Total apocarotenoids	84.45 (-14.34)	48.22	13.59 (-86.21)	38.32	8.55 (-90.02)	15.83
6-1	58.43 (308.21)	35.55	24.07 (68.13)	25.92	14.80 (3.42)	23.19
7-1	0.32 (320)	0	0.28 (280)	0	0.83 (83)	0
TOTAL	4714.49(-6.16)	3475.46	4728.62(-5.88)	2804.66	4279.49(-14.82)	3884.77

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_6-1		MAK_6-2		MAK_7-1	
	Correlation p-value PAIP	0.91 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.9 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.76 0 UPV
1-1	7.08 (-44.60)	9.56	7.83 (-38.71)	10.48	11.45 (-10.39)	18.26
1-2	21.92 (-93.82)	40.80	28.84 (-91.87)	86.02	305.86 (-13.74)	331.01
1-3	191.51 (-41.55)	101.99	222.37 (-32.13)	196.72	550.17 (67.91)	377.43
1-4	125.85 (-42.69)	69.12	59.45 (-72.93)	78.18	97.45 (-55.63)	235.41
1-5	2.53 (253)	5.04	0.89 (89)	2.59	7.7 (770)	6.33
1-6	220.12 (908.15)	89.12	102.01 (367.20)	91.36	103.75 (375.17)	80.18
1-7	51.05 (120.78)	39.48	35.42 (53.17)	63.11	155.48 (572.38)	68.66
1-8	32.75 (178.43)	26.66	19.87 (68.97)	42.54	66.52 (465.48)	36.89
1-9	1.24 (-70.37)	2.95	0.88 (-79.03)	1.84	1.28 (-69.34)	6.75
1-10	1.58 (9.25)	1.34	1.58 (9.15)	1.86	1.49 (2.84)	1.63
1-11	26.58 (21.06)	19.11	15.50 (-29.40)	37.75	44.63 (103.26)	39.54
1-12	9.16 (1.46)	3.76	4.09 (-54.70)	5.06	14.45 (60.03)	12.19
Total alcohols	691.37 (-31.41)	408.93	498.74 (-50.52)	617.51	1360.23 (34.95)	1214.28
2-1	4.27 (427)	3.91	3.22 (322)	3.62	3.63 (363)	7.77
2-2	5.22 (-83.23)	15.38	4.79 (-84.62)	0.00	15.39 (-50.60)	26.25
2-3	0	1.24	0	1.70	0	1.14
2-4	0 (0)	1.89	0 (0)	0.00	0 (0)	3.47
2-5	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	0	1.59	0	0.00	0	6.24
2-7	0 (0)	2.99	0 (0)	0.00	0 (0)	5.70
2-8	0	10.07	0	0.00	7.04 (824.47)	38.38
2-9	0	12.11	0	7.24	4.93 (-32.54)	99.57
2-10	0	7.15	0	7.04	0	24.09
2-11	0.46 (46)	0.00	0.2 (20)	0.00	0.38 (38)	0.00
2-12	3.83 (-41.00)	3.64	3.84 (-40.83)	5.00	3.17 (-51.23)	8.17
2-13	2.81 (-70.81)	3.61	3.29 (-65.82)	10.07	8.08 (-16.07)	8.85
2-14	0	0.32	0	0.00	0	1.09
Total aldehydes	16.60 (-76.51)	63.89	15.36 (-78.26)	34.68	42.63 (-39.67)	230.74
3-1	369.59 (155.77)	201.28	371.62 (157.17)	137.81	147.95 (2.38)	117.42
3-2	304.91 (40.12)	107.67	507.57 (133.26)	254.96	600.28 (175.86)	680.98
3-3	12.09 (-27.55)	10.43	17.20 (3.11)	31.55	15.76 (-5.51)	46.46
3-4	17.44 (-88.01)	17.20	37.37 (-74.30)	120.77	39.11 (-73.10)	240.35
3-5	170.95 (29.46)	48.62	235.00 (77.96)	180.64	129.50 (-1.93)	246.43
3-6	2.93 (-3.96)	1.49	2.38 (-21.91)	5.70	0	4.75
3-7	17.17 (10.78)	9.56	9.77 (-36.95)	26.08	3.42 (-77.93)	31.18
3-8	42.75 (649.95)	7.36	38.10 (568.49)	42.17	3.74 (-34.35)	45.62
3-9	3.16 (802.42)	0.34	2.21 (532.60)	0.80	0.87 (147.96)	0.61
Total acetate esters	940.99 (38.21)	403.95	1221.22 (79.37)	800.48	940.63 (38.16)	1413.8
4-1	22.59 (-81.18)	4.27	42.00 (-65.01)	60.35	98.22 (-18.18)	32.97
4-2	22.3 (223)	15.31	19.53 (1953)	22.60	0 (0)	18.49
4-3	319.81 (-77.98)	82.17	923.64 (-36.40)	654.33	812.05 (-44.08)	382.28
4-4	0	0.00	0	0.00	0.62 (-59.70)	0.00
4-5	0	28.79	14.65 (-1.85)	6.26	0.91 (-93.91)	0.81
4-6	133.99 (28.53)	40.87	202.26 (94.01)	137.39	106.52 (2.18)	338.34
4-7	29.52 (-96.82)	42.36	254.51 (-72.57)	468.44	747.87 (-19.40)	143.15
4-8	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	4.09
4-9	0 (0)	0.41	0 (0)	0.00	0.51 (51)	1.10
4-10	1.45 (-69.75)	3.21	0.48 (-90.07)	0.00	2.08 (-56.65)	8.59
4-11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.85
4-12	2.35 (-94.81)	1.08	7.98 (-82.39)	22.02	13.83 (-69.48)	15.98
4-13	4.17 (-72.27)	1.97	5.06 (-66.36)	4.43	8.03 (-46.63)	12.38
4-14	45.93 (-89.80)	7.45	196.35 (-56.41)	214.83	270.90 (-39.87)	152.15
4-15	0.44 (-97.05)	0.00	1.38 (-90.85)	4.81	1.22 (-91.93)	1.35
4-16	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0.92 (92)	0.00
Total alkyl esters	582.56 (-81.51)	227.89	1667.84 (-47.08)	1595.46	2063.68 (-34.52)	1112.53
5-1	1.49 (-75.03)	2.66	1.39 (-76.77)	3.37	1.14 (-80.91)	2.84
5-2	12.99 (-83.98)	34.12	8.93 (-88.98)	31.00	10.86 (-86.61)	32.73
5-3	2.37 (-71.83)	4.54	2.09 (-75.16)	4.76	4.44 (-47.17)	4.69
5-4	0.82 (-73.69)	1.75	0.79 (-74.79)	1.43	1.59 (-49.16)	1.78
Total apocarotenoids	17.67 (-82.08)	43.07	13.20 (-86.61)	40.56	18.03 (-81.71)	42.04
6-1	18.77 (31.14)	28.89	18.25 (27.47)	37.66	61.70 (331.04)	57.01
7-1	0.9 (90)	0	0.7 (70)	0	1.68 (168)	0
TOTAL	2268.88(-54.84)	1133.55	3435.32(-31.62)	3085.79	4488.60(-10.65)	4028.36



Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_7-2		MAK_8-1		MAK_8-2	
	Correlation p-value PAIP	0.83 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.83 0 UPV	Correlation p-value PAIP	0.86 0 UPV
1-1	15.24 (19.26)	12.59	10.93 (-14.47)	24.00	13.82 (8.12)	10.11
1-2	126.51 (-64.32)	82.59	54.30 (-84.69)	166.09	253.96 (-28.38)	252.76
1-3	193.28 (-41.01)	50.69	224.37 (-31.52)	469.85	374.77 (14.38)	288.70
1-4	23.62 (-89.24)	4.68	31.33 (-85.74)	147.56	302.23 (37.62)	322.02
1-5	16.93 (1693)	10.72	1.44 (144)	2.50	2.2 (220)	3.41
1-6	14.62 (-33.04)	53.31	104.64 (379.26)	29.29	169.15 (674.70)	86.63
1-7	17.00 (-26.49)	33.42	52.98 (129.13)	44.49	53.34 (130.68)	41.35
1-8	15.85 (34.73)	33.13	27.89 (137.07)	24.84	29.46 (150.45)	20.26
1-9	5.27 (25.73)	0.00	0	2.64	9.15 (118.39)	23.66
1-10	1.67 (15.15)	1.79	1.01 (-30.52)	1.71	0.98 (-32.41)	1.44
1-11	78.40 (257.03)	16.26	27.44 (24.98)	29.40	36.71 (67.19)	36.69
1-12	11.47 (27.04)	6.31	10.93 (21.11)	17.20	6.89 (-23.66)	4.76
Total alcohols	519.87 (-48.42)	305.49	547.26 (-45.71)	959.57	1252.66 (24.28)	1091.79
2-1	3.9 (390)	74.89	6.59 (659)	11.51	5.89 (589)	3.66
2-2	16.25 (-47.83)	31.84	10.79 (-65.37)	21.14	6.20 (-80.09)	12.10
2-3	0	0.49	0	0.00	0	0.00
2-4	0 (0)	0.00	0 (0)	2.25	1.34 (134)	3.37
2-5	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	0	0.00	0	0.00	2.01 (-65.21)	8.79
2-7	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-8	2.27 (198.25)	1.30	0	0.00	0	2.77
2-9	0	2.19	1.62 (-77.79)	1.61	3.51 (-51.98)	14.32
2-10	0	8.46	0	0.00	0	6.92
2-11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	1.39 (139)	3.28
2-12	3.64 (-43.96)	4.20	7.33 (12.89)	13.44	4.77 (-26.56)	4.04
2-13	21.12 (119.30)	7.69	5.22 (-45.76)	11.48	5.32 (-44.73)	3.97
2-14	0.32 (18.97)	0.00	0	0.00	0	0.37
Total aldehydes	47.51 (-32.76)	131.05	31.56 (-55.33)	61.44	30.45 (-56.91)	63.57
3-1	486.43 (236.63)	169.49	284.37 (96.79)	29.62	520.93 (260.50)	170.54
3-2	227.42 (4.51)	24.16	237.27 (9.04)	214.55	613.59 (181.98)	319.80
3-3	6.12 (-63.32)	4.74	18.56 (11.27)	23.33	11.44 (-31.41)	16.67
3-4	9.15 (-93.71)	29.89	61.38 (-57.79)	40.19	75.04 (-48.39)	120.11
3-5	15.33 (-88.39)	7.62	159.67 (20.92)	85.63	88.42 (-33.04)	64.40
3-6	0	0.00	1.85 (-39.32)	2.47	0	2.27
3-7	1.99 (-87.15)	1.22	5.61 (-63.81)	19.00	12.32 (-20.51)	28.00
3-8	4.42 (-22.39)	4.21	32.39 (468.29)	5.56	7.14 (25.27)	6.18
3-9	0.56 (58.93)	0.13	1.74 (395.85)	1.19	0.43 (21.84)	0.19
Total acetate esters	751.42 (10.37)	241.46	802.84 (17.92)	421.54	1329.31 (95.25)	728.16
4-1	9.38 (-92.18)	30.02	33.99 (-71.69)	52.91	10.77 (-91.03)	4.92
4-2	0 (0)	0.00	27.69 (2769)	72.41	14.8 (148)	18.88
4-3	1.029.26 (-29.12)	179.15	747.89 (-48.50)	456.86	559.76 (-61.45)	158.99
4-4	0	0.00	0.60 (-61.13)	1.09	0	0.00
4-5	73.97 (395.60)	28.05	24.28 (62.69)	0.00	71.39 (378.32)	14.55
4-6	51.21 (-50.87)	45.94	243.23 (133.31)	57.32	51.72 (-50.38)	42.51
4-7	252.01 (-72.84)	28.37	477.84 (-48.50)	427.97	53.65 (-94.22)	130.51
4-8	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	1.99
4-9	0.48 (48)	0.80	0.32 (32)	0.00	0 (0)	0.52
4-10	0.94 (-80.44)	3.89	1.10 (-77.17)	1.39	2.51 (-47.70)	9.14
4-11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.69
4-12	4.60 (-89.85)	4.68	14.77 (-67.40)	21.86	2.77 (-93.89)	1.84
4-13	1.90 (-87.40)	0.84	10.06 (-33.17)	8.76	3.75 (-75.09)	3.62
4-14	34.90 (-92.25)	24.05	344.52 (-23.53)	217.81	34.12 (-92.43)	11.37
4-15	0	0.00	2.33 (-84.49)	2.68	0.35 (-97.69)	0.00
4-16	0 (0)	0.00	1.64 (164)	0.00	0 (0)	0.00
Total alkyl esters	1458.66 (-53.72)	345.79	1930.28 (-38.75)	1321.06	805.60 (-74.44)	399.53
5-1	3.70 (-38.07)	3.93	1.46 (-75.61)	2.27	1.25 (-79.06)	1.15
5-2	51.59 (-36.37)	39.96	13.12 (-83.82)	34.05	7.39 (-90.89)	12.10
5-3	5.25 (-37.56)	2.84	2.69 (-67.96)	5.67	2.90 (-65.53)	2.99
5-4	2.28 (-27.07)	1.15	0.89 (-71.41)	1.75	1.02 (-67.52)	1.05
Total apocarotenoids	62.82 (-36.28)	47.88	18.16 (-81.58)	43.73	12.56 (-87.26)	17.29
6-1	10.93 (-23.63)	4.41	22.34 (56.08)	23.87	5.35 (-62.66)	7.01
7-1	1.86 (186)	0	0.86 (86)	1.49	0.59 (590)	0
TOTAL	2853.07(-43.21)	1028.2	3353.31(-33.25)	2788.97	3436.50(-31.60)	2290.06

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_9-1		MAK_9-2		MAK_10-1	
	Correlation	0.67	Correlation	0.93	Correlation	0.77
	p-value	0	p-value	0	p-value	0
	PAIP	UPV	PAIP	UPV	PAIP	UPV
1-1	10.76 (-15.84)	18.57	17.85 (39.66)	19.24	7.24 (-43.38)	11.52
1-2	239.09 (-32.57)	185.77	187.34 (-47.16)	386.81	47.42 (-86.63)	172.32
1-3	482.54 (47.27)	116.59	975.85 (197.83)	1406.47	205.92 (-37.15)	272.18
1-4	151.55 (-30.99)	30.17	180.59 (-17.77)	593.62	28.82 (-86.88)	64.46
1-5	2.45 (245)	2.25	4.03 (403)	3.93	2.48 (248)	1.74
1-6	169.86 (677.96)	62.46	30.46 (39.49)	63.00	26.07 (19.41)	26.47
1-7	51.82 (124.09)	44.26	26.50 (14.59)	74.60	11.99 (-48.15)	13.05
1-8	29.17 (147.99)	22.00	15.56 (32.32)	30.78	11.31 (-3.83)	13.98
1-9	1.31 (-68.85)	0.00	1.30 (-68.90)	5.75	0.64 (-84.79)	1.42
1-10	1.37 (-5.02)	2.24	1.71 (18.09)	1.60	1.30 (-9.83)	1.70
1-11	53.05 (141.58)	18.67	19.64 (-10.56)	51.25	24.13 (9.91)	48.20
1-12	15.35 (70.03)	12.16	6.68 (-25.99)	12.44	7.25 (-19.73)	11.19
Total alcohols	1208.32 (19.88)	515.14	1467.51 (45.59)	2649.49	374.58 (-62.84)	638.23
2-1	3.77 (377)	7.93	5.54 (554)	3.37	3.33 (333)	4.95
2-2	10.31 (-66.91)	22.25	15.84 (-49.17)	21.81	13.31 (-57.30)	13.22
2-3	0	1.63	0	1.31	0	1.21
2-4	0 (0)	4.14	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-5	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	0	2.55	0	4.73	0	0.00
2-7	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-8	0	10.62	0	0.00	0	0.00
2-9	3.60 (-51.32)	35.12	1.43 (-80.36)	5.05	0	0.00
2-10	0	11.68	0	0.00	0	0.00
2-11	0.21 (21)	0.00	1.22 (122)	0.00	0	0.00
2-12	4.60 (-29.18)	7.15	5.95 (-8.35)	3.54	2.73 (-58.00)	6.38
2-13	7.11 (-26.15)	5.11	4.18 (-56.61)	7.31	33.10 (243.72)	15.56
2-14	0.65 (140.32)	1.93	0	0.00	0	0.00
Total aldehydes	30.26 (-57.17)	110.12	34.16 (-51.66)	47.12	52.47 (-25.74)	41.32
3-1	296.66 (105.30)	253.20	37.76 (-73.87)	45.95	353.36 (144.54)	72.81
3-2	872.02 (300.75)	160.75	243.57 (11.94)	454.42	276.33 (26.99)	82.46
3-3	32.36 (94.01)	10.53	8.84 (-46.99)	29.85	6.44 (-61.37)	18.90
3-4	287.62 (97.81)	65.44	7.91 (-94.56)	69.71	5.63 (-96.13)	135.62
3-5	407.57 (208.65)	33.66	48.42 (-63.33)	260.27	28.02 (-78.78)	107.20
3-6	2.59 (-15.03)	0.00	0	4.96	0	2.23
3-7	13.74 (-11.32)	3.48	5.46 (-64.76)	40.11	1.21 (-92.21)	7.40
3-8	83.78 (1.369.87)	3.70	1.18 (-79.25)	5.82	1.92 (-66.38)	30.31
3-9	2.33 (566.80)	0.42	0.28 (-21.03)	0.42	0.46 (32.59)	0.86
Total acetate esters	1998.67 (193.56)	531.18	353.42 (-48.09)	911.51	673.37 (-1.10)	457.79
4-1	49.98 (-58.37)	3.39	89.78 (-25.22)	31.86	25.07 (-79.12)	76.26
4-2	64.19 (6419)	48.94	31.33 (3133)	20.46	0 (0)	57.39
4-3	734.16 (-49.45)	112.81	860.59 (-40.74)	753.89	541.61 (-62.70)	516.11
4-4	0	0.00	6.63 (327.46)	3.83	0.67 (-56.78)	1.37
4-5	2.04 (-86.34)	65.77	1.66 (-88.87)	1.43	10.36 (-30.61)	1.84
4-6	366.83 (251.87)	24.49	41.88 (-59.83)	218.16	44.37 (-57.44)	112.10
4-7	465.64 (-49.82)	28.78	1.406.34 (51.57)	1153.20	351.55 (-62.11)	671.06
4-8	0 (0)	0.00	0 (0)	3.75	0 (0)	1.16
4-9	0.4 (40)	0.00	0.92 (92)	2.07	0.47 (470)	1.90
4-10	2.79 (-41.87)	1.99	2.46 (-48.85)	13.92	2.07 (-56.91)	6.57
4-11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.86	0 (0)	0.69
4-12	9.27 (-79.54)	0.00	38.59 (-14.82)	44.82	5.49 (-87.89)	26.14
4-13	7.23 (-51.94)	1.54	19.56 (29.94)	30.92	2.33 (-84.51)	17.15
4-14	158.04 (-64.92)	1.46	695.03 (54.28)	804.12	50.02 (-88.90)	336.90
4-15	0.71 (-95.31)	0.00	4.19 (-72.14)	7.79	0.34 (-97.72)	5.10
4-16	0 (0)	0.00	3.34 (334)	6.06	0.67 (670)	2.96
Total alkyl esters	1861.29 (-40.94)	289.17	3202.31 (1.61)	3091.1	1035.02 (-67.16)	1831.7
5-1	1.13 (-81.05)	3.46	0.77 (-87.10)	0.50	0.90 (-84.95)	1.88
5-2	8.18 (-89.91)	34.14	1.12 (-98.62)	0.00	7.68 (-90.52)	26.40
5-3	3.07 (-63.45)	5.80	0.83 (-90.10)	0.73	2.98 (-64.48)	5.29
5-4	1.17 (-62.54)	2.62	-	0.00	1.56 (-50.30)	1.75
Total apocarotenoids	13.55 (-86.26)	46.03	2.72 (-97.24)	1.24	13.12 (-86.69)	35.32
6-1	88.15 (515.77)	31.56	31.24 (118.26)	32.64	6.20 (-56.68)	30.87
7-1	1.07 (107)	0	4.86 (486)	0	1.1 (110)	0.66
TOTAL	5201.28(3.53)	1477.17	5096.24(1.44)	6731.86	2155.87(-57.09)	3000.57

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_10-2		MAK_10-3		MAK_11-1	
	Correlation	0.88	Correlation	0.42	Correlation	0.3
	p-value	0	p-value	0.001	p-value	0.02
	PAIP	UPV	PAIP	UPV	PAIP	UPV
1-1	13.14 (2.85)	10.77	8.51 (-33.39)	18.52	21.01 (64.34)	14.86
1-2	200.91 (-43.34)	302.92	86.22 (-75.68)	454.85	458.61 (29.34)	126.75
1-3	386.84 (18.07)	517.01	259.94 (-20.67)	316.19	318.80 (-2.70)	116.98
1-4	52.83 (-75.94)	192.90	135.75 (-38.18)	125.69	129.02 (-41.25)	59.10
1-5	8.05 (805)	7.69	0 (0)	5.56	5.32 (532)	2.99
1-6	51.79 (137.18)	50.58	23.56 (7.91)	99.11	99.93 (357.68)	65.44
1-7	65.12 (181.62)	67.87	6.99 (-69.76)	60.18	40.94 (77.03)	24.88
1-8	38.75 (229.39)	36.17	4.78 (-59.34)	924.00	25.92 (120.37)	18.03
1-9	1.20 (-71.45)	1.84	0.96 (-77.10)	2.32	2.52 (-39.92)	1.28
1-10	1.55 (7.01)	1.48	1.22 (-15.43)	1.73	1.77 (22.13)	1.58
1-11	28.88 (31.53)	26.00	25.51 (16.16)	28.08	27.94 (27.26)	32.93
1-12	11.88 (31.65)	6.35	8.90 (-1.36)	11.83	7.09 (-21.49)	4.88
Total alcohols	860.94 (-14.59)	1221.58	562.34 (-44.21)	2048.06	1138.87 (12.99)	469.7
2-1	5.2 (520)	3.12	3.83 (383)	7.96	10.62 (1062)	6.72
2-2	13.59 (-56.39)	21.64	10.88 (-65.10)	13.76	24.67 (-20.83)	32.37
2-3	1.05 (-29.02)	0.00	0	1.69	0.88 (-40.64)	1.57
2-4	0 (0)	0.00	0 (0)	2.07	0 (0)	3.17
2-5	0 (0)	0.00	1.53 (153)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	0	2.31	0	0.00	0	0.00
2-7	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-8	5.76 (656.39)	3.10	0	1.59	4.19 (450.34)	2.21
2-9	3.78 (-48.26)	4.99	0	5.21	2.54 (-65.18)	5.24
2-10	0	0.00	0	8.54	0	7.18
2-11	0 (0)	0.00	0.57 (57)	0.00	0.45 (45)	0.00
2-12	6.17 (-5.06)	5.67	3.15 (-51.48)	7.50	9.21 (41.83)	5.63
2-13	15.08 (56.64)	11.00	12.79 (32.81)	11.98	10.28 (6.77)	3.80
2-14	0.24 (-10.80)	0.00	0	0.00	0.25 (-7.08)	0.00
Total aldehydes	50.87 (-28.01)	51.82	32.77 (-53.62)	60.29	63.10 (-10.70)	67.89
3-1	91.77 (-36.49)	86.82	429.46 (197.20)	52.23	49.59 (-65.68)	375.66
3-2	309.31 (42.14)	272.21	426.41 (95.96)	89.02	93.48 (-57.04)	288.98
3-3	11.98 (-28.18)	16.35	24.45 (46.56)	16.80	12.75 (-23.58)	37.12
3-4	32.55 (-77.61)	51.06	164.42 (13.08)	65.72	9.59 (-93.40)	132.99
3-5	47.61 (-63.94)	79.78	381.48 (188.89)	49.04	50.23 (-61.96)	110.64
3-6	0	0.00	6.36 (108.65)	0.00	0	4.39
3-7	2.30 (-85.16)	6.66	24.77 (59.78)	4.90	7.25 (-53.24)	12.17
3-8	2.08 (-63.59)	1.51	77.18 (1.254.12)	2.67	2.22 (-61.01)	38.84
3-9	0.52 (49.94)	0.18	10.65 (2.943.93)	0.37	0.31 (-10.22)	0.67
Total acetate esters	498.12 (-26.84)	514.57	1545.18 (126.96)	280.75	225.42 (-66.89)	1001.46
4-1	76.29 (-36.45)	52.59	86.75(-27.74)	119.24	24.35 (-79.72)	3.95
4-2	98.98 (9898)	29.71	56.32 (5632)	22.88	47.48 (4748)	28.68
4-3	747.10 (-48.55)	629.36	798.16 (-45.04)	456.73	459.26 (-68.37)	144.82
4-4	0.94 (-39.36)	0.91	0	1.83	0.54 (-65.01)	0.00
4-5	3.95 (-73.55)	4.87	17.28 (15.79)	0.00	7.02 (-52.95)	6.53
4-6	68.27 (-34.51)	96.66	220.16 (111.18)	67.85	70.13 (-32.73)	248.29
4-7	1.137.25 (22.57)	485.18	303.54 (-67.29)	1211.67	1.252.04 (34.94)	101.58
4-8	0 (0)	0.83	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
4-9	0.61 (61)	1.02	0.51 (51)	0.76	0 (0)	0.00
4-10	1.06 (-77.97)	2.76	3.57 (-25.6)	1.96	0	1.93
4-11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
4-12	16.72 (-63.10)	20.98	11.56 (-74.47)	45.02	7.77 (-82.85)	1.93
4-13	5.46 (-63.71)	10.31	14.2 (-5.64)	16.54	8.23 (-45.35)	8.39
4-14	173.12 (-61.57)	197.53	242.85 (-46.09)	360.25	363.22 (-19.37)	9.50
4-15	0.93 (-93.81)	1.13	0.91 (-93.98)	6.28	0.65 (-95.70)	0.00
4-16	0 (0)	1.20	0 (0)	2.89	0 (0)	0.00
Total alkyl esters	2270.70 (-27.95)	1533.8	1755.81 (-44.29)	2311	2240.70 (229.11)	555.6
5-1	1.95 (-67.29)	1.12	1.02 (-82.88)	2.75	1.32 (-77.97)	2.50
5-2	19.94 (-75.41)	9.55	8.15 (-89.95)	39.40	16.41 (-79.76)	37.60
5-3	3.66 (-56.45)	3.44	1.66 (-80.23)	7.32	5.08 (-39.55)	5.81
5-4	1.45 (-53.77)	1.16	0.60 (-80.81)	1.99	1.76 (-43.75)	2.06
Total apocarotenoids	27.00 (-72.61)	15.26	11.43 (-88.41)	51.47	24.57 (-75.08)	47.97
6-1	27.30 (90.73)	29.57	28.58 (99.62)	31.45	1.65 (-88.49)	5.04
7-1	1.13 (113)	0	0 (0)	0	2.51 (521)	0
TOTAL	3736.06(-25.63)	3351.34	3936.12(-21.65)	4731.55	3696.82(-26.41)	2099.69

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Code	MAK_11-2		MAK_12-1		MAK_12-2	
	Correlation	0.96	Correlation	0.95	Correlation	0.8
	p-value	0	p-value	0	p-value	0
	PAIP	UPV	PAIP	UPV	PAIP	UPV
1-1	10.49 (-17.92)	10.57	9.15 (-28.38)	29.34	11.32 (-11.44)	21.57
1-2	16.39 (-95.38)	36.68	320.00 (-9.75)	365.27	107.59 (-69.66)	272.19
1-3	156.07 (-52.37)	65.43	451.75 (37.87)	429.91	262.15 (-19.99)	410.25
1-4	12.99 (-94.09)	19.38	307.84 (40.18)	314.16	17.17 (-92.18)	140.01
1-5	1.36 (136)	1.44	1.75 (175)	5.79	3.13 (313)	5.92
1-6	28.30 (29.60)	37.49	64.33 (194.61)	87.76	59.49 (172.47)	112.87
1-7	17.77 (-23.16)	13.85	31.92 (38.02)	57.96	43.58 (88.48)	56.13
1-8	11.26 (-4.23)	10.33	18.55 (57.73)	31.60	27.75 (135.93)	35.53
1-9	0	0.00	4.68 (11.66)	8.25	0.92 (-78.05)	1.30
1-10	0.91 (-37.02)	1.62	1.49 (2.82)	1.35	1.30 (-10.12)	1.41
1-11	14.94 (-31.95)	19.55	33.33 (51.79)	35.00	20.04 (-8.73)	28.18
1-12	1.95 (-78.42)	2.61	8.53 (-5.52)	7.43	5.34 (-40.84)	10.71
Total alcohols	272.43 (-72.97)	218.95	1253.33 (24.34)	1373.82	559.78 (-44.46)	1096.07
2-1	6.29 (629)	4.65	3.71 (371)	13.99	4.48 (448)	9.93
2-2	6.42 (-79.39)	0.00	10.48 (-66.38)	27.17	8.03 (-74.22)	16.61
2-3	0	1.16	0	1.27	0	0.00
2-4	1.12 (112)	0.00	0 (0)	3.70	0 (0)	0.00
2-5	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-6	0	0.00	1.65 (-71.35)	0.00	0	0.00
2-7	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-8	1.40 (84.49)	0.00	0	5.97	2.87 (276.78)	2.59
2-9	1.12 (-84.66)	0.00	0	8.89	1.71 (-76.52)	4.01
2-10	0	0.00	0	10.32	0	0.00
2-11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
2-12	3.80 (-41.52)	4.46	4.18 (-35.59)	14.55	3.83 (-41.06)	9.80
2-13	5.48 (-43.12)	3.68	5.92 (-38.54)	4.76	4.85 (-49.63)	8.16
2-14	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Total aldehydes	25.63 (-63.73)	13.96	25.94 (-63.29)	90.63	25.77 (-63.53)	51.10
3-1	401.33 (177.74)	156.75	213.46 (47.72)	421.54	144.25 (-0.18)	122.75
3-2	182.40 (-16.18)	101.69	530.71 (143.89)	436.38	192.21 (-11.67)	572.45
3-3	5.84 (-64.96)	14.99	11.54 (-30.85)	19.00	3.60 (-78.41)	45.94
3-4	5.11 (-96.48)	35.42	55.03 (-62.15)	111.65	6.58 (-95.47)	205.68
3-5	27.34 (-79.29)	44.27	102.43 (-22.43)	113.01	16.28 (-87.67)	237.15
3-6	0	1.12	0	2.08	0	4.35
3-7	1.93 (-87.54)	4.57	12.95 (-16.47)	20.72	1.59 (-89.76)	15.90
3-8	3.34 (-41.47)	21.60	2.93 (-48.64)	4.70	1.32 (-76.87)	60.53
3-9	0.20 (-43.20)	0.67	0.54 (52.89)	0.36	0.35 (0.05)	2.11
Total acetate esters	627.49 (-7.83)	381.08	929.59 (36.54)	1129.44	366.18 (-46.22)	1266.86
4-1	26.26 (-78.13)	28.55	33.89 (-71.77)	40.92	29.12 (-75.74)	51.51
4-2	9.7 (970)	14.91	0 (0)	44.39	35.08 (3508)	36.07
4-3	560.46 (-61.41)	279.51	586.58 (-59.61)	840.31	691.54 (-52.38)	603.74
4-4	0.48 (-68.89)	0.00	0	0.00	0.54 (-65.13)	0.00
4-5	58.61 (292.72)	32.81	17.01 (14.00)	39.66	32.43 (117.28)	2.29
4-6	50.40 (-51.66)	70.45	83.49 (-19.91)	78.03	14.21 (-86.37)	352.00
4-7	201.93 (-78.24)	77.16	246.88 (-73.39)	240.56	269.05 (-71.00)	560.25
4-8	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	1.15
4-9	0 (0)	0.00	0.36 (36)	0.00	0 (0)	1.15
4-10	0	1.25	1.97 (-59.06)	2.88	0.79 (-83.54)	4.46
4-11	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
4-12	4.06 (-91.04)	6.41	6.56 (-85.51)	5.64	2.91 (-93.58)	18.06
4-13	3.45 (-77.06)	4.14	5.39 (-64.18)	4.33	2.73 (-81.86)	15.91
4-14	69.74 (-84.52)	36.67	102.49 (-77.25)	46.14	32.69 (-92.74)	134.93
4-15	0	0.00	0.74 (-95.08)	0.00	0	1.19
4-16	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00	0 (0)	0.00
Total alkyl esters	985.09 (-68.74)	551.86	1085.36 (-65.56)	1342.86	1111.10 (-64.74)	1782.71
5-1	1.09 (-81.82)	2.61	1.37 (-76.98)	1.71	1.17 (-80.43)	1.58
5-2	9.56 (-88.21)	26.37	11.51 (-85.81)	23.19	9.53 (-88.25)	17.84
5-3	2.76 (-67.20)	4.61	2.84 (-66.20)	4.71	3.78 (-55.01)	5.30
5-4	1.09 (-65.28)	1.41	1.21 (-61.45)	1.64	1.20 (-61.62)	2.30
Total apocarotenoids	14.50 (-85.29)	35	16.93 (-82.83)	31.25	15.68 (-84.09)	27.03
6-1	13.39 (-6.46)	25.34	20.86 (45.72)	25.01	11.48 (-19.82)	25.54
7-1	0.91 (91)	0.91	1.1 (110)	0.6	1.22 (122)	0
TOTAL	1939.45(-61.40)	1192.1	3333.09(-33.66)	3962.36	2091.22(-58.37)	4249.28

**Supplementary table 4. 4 a.** Vector tables of Principal Component and Component Weight of ILs, VED, MAK and F1 of PAIP environment. Table of Principal Component order goes from the greatest to the least vector of Component 1. Table of Component Weight order goes from the greatest to the least vector of each component.

IL	Table of Principal Component		
	Component 1	Component 2	Component 3
MAK_4-3	9.748	2.102	5.626
VED	7.458	-3.097	1.837
MAK_2-1	3.549	-4.105	-3.172
MAK_1-1	3.182	3.654	-3.014
MAK_9-2	2.776	-1.331	-8.244
MAK_11-1	2.412	2.455	-1.522
MAK_10-2	2.158	1.444	-1.775
MAK_7-1	1.984	-0.749	-1.911
MAK_7-2	1.979	3.501	1.380
MAK_5-1	1.130	-4.675	1.524
MAK_12-1	-0.233	-0.066	0.057
MAK_8-2	-0.443	0.662	2.086
MAK_5-2	-0.543	-0.671	0.400
MAK_2-2	-0.648	-0.387	-1.845
MAK_12-2	-1.124	3.321	-0.553
MAK_3-1	-1.195	1.671	2.583
MAK_9-1	-1.310	-5.661	2.094
MAK_10-1	-1.409	2.285	-0.935
MAK_8-1	-1.456	-0.322	-1.138
MAK_4-1	-1.925	1.311	3.043
MAK_11-2	-2.171	3.828	0.223
MAK_2-3	-2.214	-3.571	1.201
MAK_4-2	-2.418	0.776	-0.229
MAK_6-2	-2.988	-0.563	-0.011
MAK_6-1	-3.367	-0.189	0.618
MAK_10-3	-3.393	-5.932	1.057
F1	-3.701	3.877	0.903
MAK	-5.838	0.431	-0.282

Table of Component Weight					
Compound	Component 1	Compound	Component 2	Compound	Component 3
5-3	0.2455	1-5	0.1485	3-1	0.2467
1-1	0.2398	4-5	0.1478	4-5	0.2387
2-3	0.2241	2-8	0.1455	5-2	0.1946
2-2	0.2226	2-1	0.1401	2-14	0.1879
1-2	0.2190	2-7	0.0972	5-1	0.1850
2-6	0.2170	2-12	0.0885	5-4	0.1787
5-1	0.2107	2-4	0.0882	2-6	0.1711
5-4	0.2100	5-4	0.0768	5-3	0.1593
5-2	0.2017	7-1	0.0698	2-4	0.1500
2-9	0.1940	2-14	0.0665	2-9	0.1469
1-3	0.1885	5-3	0.0380	3-4	0.1452
4-7	0.1681	1-1	0.0307	3-8	0.1207
2-8	0.1652	5-2	0.0274	2-3	0.1167
2-7	0.1643	3-1	0.0268	1-9	0.1102
4-3	0.1621	2-9	0.0245	2-2	0.1101
4-12	0.1570	5-1	0.0233	3-7	0.1097
2-4	0.1527	2-3	0.0022	4-6	0.1075
1-10	0.1386	4-16	0.0019	2-10	0.0983
4-15	0.1302	1-9	-0.0074	3-2	0.0904
1-4	0.1296	4-7	-0.0077	3-9	0.0853
4-9	0.1288	2-13	-0.0121	3-5	0.0848
4-10	0.1282	1-8	-0.0124	3-6	0.0834
4-13	0.1158	4-4	-0.0127	1-6	0.0720
4-14	0.1116	1-7	-0.0152	2-7	0.0705
1-12	0.1101	2-10	-0.0278	3-3	0.0680
1-5	0.1091	1-10	-0.0320	1-4	0.0596
4-1	0.1074	1-11	-0.0456	6-1	0.0475
2-12	0.1068	4-2	-0.0544	4-11	0.0474
4-4	0.1063	1-6	-0.0551	1-11	0.0403
1-9	0.0899	2-2	-0.0642	2-5	0.0329
1-11	0.0891	2-6	-0.0665	4-10	0.0317
6-1	0.0830	4-3	-0.0881	1-2	0.0289
2-10	0.0815	1-2	-0.0950	4-2	0.0211
4-5	0.0809	4-1	-0.0981	2-13	0.0159
4-8	0.0608	4-8	-0.0981	1-1	0.0028
2-13	0.0508	4-11	-0.1117	2-1	-0.0137
4-16	0.0385	4-9	-0.1238	1-7	-0.0145
2-11	0.0379	1-3	-0.1332	1-8	-0.0185
4-2	0.0264	4-15	-0.1340	2-8	-0.0250
2-14	0.0254	1-12	-0.1348	1-12	-0.0274
1-7	0.0229	2-11	-0.1377	4-15	-0.0367
4-11	0.0194	2-5	-0.1417	1-5	-0.0615
3-2	0.0139	4-12	-0.1545	4-3	-0.0725
1-8	0.0082	3-9	-0.1580	2-12	-0.0827
2-1	0.0037	4-14	-0.1626	4-8	-0.0987
3-4	-0.0167	1-4	-0.1664	2-11	-0.1155
3-7	-0.0334	6-1	-0.1681	1-3	-0.1230
7-1	-0.0419	3-8	-0.1779	4-13	-0.1275
2-5	-0.0581	4-6	-0.2090	1-10	-0.1362
3-3	-0.0775	3-6	-0.2200	4-1	-0.1483
3-1	-0.0967	4-10	-0.2200	4-9	-0.1524
1-6	-0.0975	4-13	-0.2208	7-1	-0.1774
3-5	-0.1025	3-2	-0.2288	4-12	-0.1835
3-6	-0.1121	3-7	-0.2491	4-7	-0.2307
3-9	-0.1327	3-4	-0.2645	4-14	-0.2576
4-6	-0.1347	3-3	-0.2703	4-16	-0.2740
3-8	-0.1416	3-5	-0.2908	4-4	-0.2868

**Supplementary table 4 b.** Vector tables of Principal Component and Component Weight of ILs of PAIP and UPV environment. Table of Principal Component order goes from the greatest to the least vector of Component 1. Table of Component Weight order goes from the greatest to the least vector of each component.

Environment	Table of Principal Component			
	IL	Component 1	Component 2	Component 3
UPV	MAK_9-2	9.863	-6.131	-0.632
UPV	MAK_2-1	8.319	-2.831	-0.148
UPV	MAK_7-1	7.596	7.601	-1.415
UPV	MAK_4-3	5.496	5.592	1.836
UPV	MAK_4-1	4.250	5.076	1.137
UPV	MAK_2-2	3.607	1.608	2.249
PAIP	MAK_2-1	3.453	-3.104	-0.672
PAIP	MAK_5-1	2.747	-1.412	1.905
UPV	MAK_12-2	2.341	0.460	1.856
UPV	MAK_10-1	2.200	-2.125	-1.422
PAIP	MAK_9-1	2.161	-0.269	4.889
UPV	MAK_10-3	1.988	-2.331	-5.813
UPV	MAK_8-2	1.893	1.970	0.427
PAIP	MAK_9-2	1.433	-8.226	-3.094
UPV	MAK_5-1	1.330	3.684	3.211
PAIP	MAK_4-3	0.769	5.342	-5.963
UPV	MAK_5-2	0.510	-3.523	-1.924
UPV	MAK_3-1	0.390	3.421	-2.758
UPV	MAK_12-1	0.293	2.254	-2.014
PAIP	MAK_7-1	0.281	-2.714	-0.833
PAIP	MAK_10-3	0.276	-1.494	6.321
UPV	MAK_6-2	0.171	0.109	0.603
UPV	MAK_8-1	0.111	-0.389	-2.515
UPV	MAK_10-2	0.075	-2.097	-1.061
PAIP	MAK_2-3	0.042	-0.141	4.340
PAIP	MAK_5-2	-0.990	-1.551	1.538
PAIP	MAK_2-2	-1.053	-3.053	0.833
UPV	MAK_11-1	-1.149	3.571	0.578
PAIP	MAK_12-1	-1.235	-1.421	0.614
PAIP	MAK_11-1	-1.242	-1.354	-2.919
PAIP	MAK_10-2	-1.267	-1.901	-2.187
PAIP	MAK_8-1	-1.333	-2.171	1.674
PAIP	MAK_8-2	-1.855	-0.245	1.446
UPV	MAK_2-3	-1.863	0.349	-0.575
UPV	MAK_9-1	-1.882	5.640	-3.552
PAIP	MAK_1-1	-2.054	-2.552	-4.028
UPV	MAK_1-1	-2.226	0.811	2.390
PAIP	MAK_6-2	-2.253	-1.633	3.182
PAIP	MAK_6-1	-2.436	-0.680	3.466
UPV	MAK_6-1	-2.723	2.997	-1.135
PAIP	MAK_3-1	-2.729	1.436	1.730
PAIP	MAK_4-2	-2.801	-1.197	1.607
UPV	MAK_4-2	-3.326	1.869	-0.804
PAIP	MAK_7-2	-3.336	1.036	-2.741
PAIP	MAK_4-1	-3.517	1.615	2.076
UPV	MAK_11-2	-3.798	0.389	0.066
UPV	MAK_7-2	-3.811	1.757	-2.167
PAIP	MAK_10-1	-3.830	-1.795	0.197
PAIP	MAK_12-2	-4.048	-1.293	-0.300
PAIP	MAK_11-2	-4.836	-0.948	0.502

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

Table of Component Weight					
Compound	Component 1	Compound	Component 2	Compound	Component 3
4-8	0.257	5-2	0.229	3-5	0.278
4-13	0.239	5-1	0.229	3-8	0.272
4-9	0.236	2-10	0.221	4-6	0.249
4-10	0.227	5-4	0.221	3-9	0.237
3-7	0.227	2-4	0.195	3-6	0.199
4-11	0.222	5-3	0.195	3-4	0.189
3-3	0.221	2-9	0.184	3-1	0.169
1-4	0.214	2-8	0.174	3-2	0.169
1-2	0.199	2-2	0.173	1-6	0.152
1-3	0.198	2-14	0.172	3-3	0.145
4-12	0.176	2-3	0.159	3-7	0.141
3-5	0.176	4-5	0.153	2-5	0.113
1-12	0.175	3-4	0.141	4-10	0.060
4-15	0.173	3-1	0.130	2-11	0.028
3-6	0.172	2-7	0.129	4-11	0.024
3-4	0.164	3-3	0.119	6-1	0.022
2-6	0.163	2-6	0.116	4-8	0.015
4-14	0.156	3-6	0.110	1-4	-0.005
1-1	0.149	4-10	0.098	4-13	-0.008
1-11	0.144	3-7	0.085	4-2	-0.010
6-1	0.143	4-11	0.073	1-9	-0.019
3-2	0.133	4-6	0.073	1-11	-0.025
4-6	0.128	3-8	0.066	1-7	-0.027
2-11	0.120	2-12	0.065	4-3	-0.034
2-9	0.117	1-1	0.064	2-13	-0.040
1-9	0.113	4-8	0.058	4-9	-0.045
4-16	0.108	2-1	0.053	1-12	-0.053
2-2	0.101	6-1	0.050	2-14	-0.061
2-3	0.100	1-9	0.047	4-14	-0.062
4-4	0.095	1-10	0.039	4-5	-0.066
1-10	0.091	4-2	0.035	2-2	-0.070
2-10	0.086	1-5	0.022	2-9	-0.074
2-8	0.081	3-2	0.018	4-15	-0.075
4-7	0.075	1-6	0.009	2-1	-0.079
1-7	0.072	3-5	0.008	2-6	-0.080
2-7	0.057	2-5	0.000	2-10	-0.082
3-8	0.049	3-9	-0.008	1-3	-0.083
2-4	0.045	1-12	-0.011	7-1	-0.098
2-12	0.043	1-7	-0.026	4-1	-0.100
4-2	0.041	1-2	-0.026	4-16	-0.109
1-8	0.032	4-9	-0.028	4-12	-0.120
4-1	0.031	1-11	-0.028	2-8	-0.120
4-3	0.016	1-8	-0.038	2-7	-0.126
2-14	0.014	2-13	-0.050	1-10	-0.129
1-6	0.009	1-4	-0.062	1-8	-0.130
3-9	0.001	2-11	-0.062	4-4	-0.140
5-3	-0.001	4-13	-0.124	1-2	-0.145
2-13	-0.001	7-1	-0.150	2-12	-0.146
5-1	-0.013	1-3	-0.158	5-1	-0.148
5-2	-0.017	4-1	-0.165	5-4	-0.157
2-5	-0.025	4-15	-0.175	4-7	-0.164
1-5	-0.036	4-3	-0.181	5-2	-0.165
2-1	-0.045	4-12	-0.196	2-3	-0.173
5-4	-0.055	4-16	-0.198	2-4	-0.177
7-1	-0.088	4-7	-0.219	5-3	-0.189
4-5	-0.108	4-4	-0.222	1-5	-0.192
3-1	-0.114	4-14	-0.242	1-1	-0.214



Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

**Supplementary table 5.** Correlations, and their corresponding P-values, between the contents of each volatile in the Paiporta and Valencia environments. Positive values indicate higher values in Valencia , UPV.

Code	Name	Family	corr_PAIP-UPV	P-Value
1-1	1-pentanol	Alcohol	0.15	0.454
1-2	(Z)-3-hexen-1-ol	Alcohol	0.35	0.0773
1-3	1-hexanol	Alcohol	0.71	0.0001
1-4	1-octanol	Alcohol	0.50	0.0107
1-5	(E,Z)-2,6-nonadien-1-ol	Alcohol	0.32	0.1143
1-6	(Z)-3-nonen-1-ol	Alcohol	0.34	0.0908
1-7	(Z)-6-nonen-1-ol	Alcohol	0.20	0.3254
1-8	1-nonanol	Alcohol	-0.3	0.12
1-9	1-decanol	Alcohol	0.65	0.0003
1-10	Phenol	Alcohol	0.22	0.2734
1-11	Benzyl Alcohol	Alcohol	-0.26	0.19
1-12	2-phenylethanol	Alcohol	0.39	0.06
2-1	(E)2methyl2butenal	Aldehyde	-0.10	0.61
2-2	Hexanal	Aldehyde	0.68	0.0002
2-3	(E,E)-2,4-heptadienal	Aldehyde	0.31	0.11
2-4	Heptanal	Aldehyde	0.078	0.71
2-5	(E)-2-octenal	Aldehyde	-0.04	0.8432
2-6	Octanal	Aldehyde	0.26	0.2
2-7	(E)-2-nonenal	Aldehyde	-0.08	0.69
2-8	(E,Z)-2,6-nonadienal	Aldehyde	0.35	0.0852
2-9	(Z)-6-nonenal	Aldehyde	0.31	0.11
2-10	Nonanal	Aldehyde	0.13	0.52
2-11	(E,E)-2,4-decadienal	Aldehyde	0.76	0.0001
2-12	Decanal	Aldehyde	0.09	0.65
2-13	Benzaldehyde	Aldehyde	0.2	0.3
2-14	Phenylacetaldehyde	Aldehyde	0.36	0.07
3-1	2-methyl propyl acetate	Acetate esters	0.06	0.77
3-2	Butyl acetate	Acetate esters	0.16	0.42
3-3	Amyl acetate	Acetate esters	-0.11	0.58
3-4	(Z)-3-hexen-1-ol, acetate	Acetate esters	-0.01	0.92
3-5	Hexyl acetate	Acetate esters	-0.20	0.31
3-6	Heptyl acetate	Acetate esters	-0.01	0.96
3-7	Octyl acetate	Acetate esters	0.21	0.29
3-8	Benzyl acetate	Acetate esters	-0.33	0.1
3-9	Phenethyl acetate	Acetate esters	-0.15	0.46
4-1	Ethyl-3-(methylthio) propanoate	Alkyl esters	0.28	0.17
4-2	Methyl butyrate	Alkyl esters	-0.08	0.68
4-3	Ethyl butanoate	Alkyl esters	0.43	0.02
4-4	Ethyl-(E)-2-butanoate	Alkyl esters	0.73	0.001
4-5	Methyl-2-methylbutyrate	Alkyl esters	0.22	0.27
4-6	Propyl butyrate	Alkyl esters	-0.43	0.02
4-7	Ethyl-2-methyl butyrate	Alkyl esters	0.24	0.24
4-8	Butyl butyrate	Alkyl esters	0.31	0.12
4-9	Butyl isobutyrate	Alkyl esters	0.51	0.009
4-10	Isobutyl butyrate	Alkyl esters	0.52	0.0074
4-11	Isoamyl butyrate	Alkyl esters	-0.12	0.56
4-12	Ethyl pentanoate	Alkyl esters	0.61	0.011
4-13	Methyl hexanoate	Alkyl esters	0.66	0.0003
4-14	Ethyl hexanoate	Alkyl esters	0.74	0.0003
4-15	Ethyl heptanoate	Alkyl esters	0.55	0.004
4-16	(E,E)-2,4-hexadienoic acid, ethyl ester	Alkyl esters	0.46	0.01
5-1	6-methyl-5-Hepten-2-one	Apocarotenoids	0.36	0.07
5-2	Geranylacetone	Apocarotenoids	0.43	0.02
5-3	$\beta$ -ionone	Apocarotenoids	0.04	0.83
5-4	$\beta$ -ciclocytral	Aldehyde	0.36	0.07
6-1	Eucalyptol	Cyclic ether	0.49	0.0129
7-1	Eugenol	Phenylpropanoid	0.36	0.07

**Supplementary table 6.** Genes related with aroma volatile biosynthesis in melon fruits that are affected by the Makuwa, MAK, introgressions in certain lines. Gene codes as described in www.melonomics.net. The physical position (v3.6.1) and description of each gene and the introgression lines with MAK alleles are indicated. Italicized ILs represent that the location of the gene is between the last SNP of the introgression and the next SNP. Bold ILs represent that the location of the gene is between a heterozygous and a homozygous allele.

Gene name	Gene number	Chr	Loc start	Loc end	Homozygous introgression	Heterozygous introgression	Description	Reference
	MELO3C018492	chr01	614.743	617.080	MAK2-2 MAK3-1	MAK2-1	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	
	MELO3C024190	chr01	4.373.411	4.377.643			Acetyl-CoA acetyltransferase	
	MELO3C024187	chr01	4.401.370	4.406.558			Long chain acyl-CoA synthetase	
	MELO3C023687	chr01	6.869.117	6.872.557	MAK1-1		alcohol dehydrogenase-like	
<i>CmADH1</i>	MELO3C023685	chr01	6.928.411	6.930.701	MAK1-1		alcohol dehydrogenase-like	Manriquez et al., 2006
	MELO3C024090	chr01	9.256.193	9.273.401	MAK1-1		D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	
<i>CmFPPS1</i>	MELO3C024967	chr01	10.314.385	10.318.697	MAK1-1		Farnesyl pyrophosphate synthase	Saladie et al., 2015
	MELO3C024886	chr01	11.806.353	11.810.755	MAK1-1		4-coumarate:CoA ligase	
<i>CmGPPS1</i>	MELO3C013157	chr01	13.549.351	13.550.285	MAK1-1	MAK6-1	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	Saladie et al., 2015
	MELO3C013241	chr01	15.484.222	15.485.364	MAK1-1	MAK6-1	Carotenoid cleavage dioxygenase	
<i>CmGGPPS4</i>	MELO3C013320	chr01	16.281.231	16.283.743	MAK1-1 MAK6-1		Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	Saladie et al., 2015
<i>CmLOX17</i>	MELO3C015715	chr01	28.794.572	28.800.445	<i>MAK1-1</i>		linoleate 9S-lipoxygenase-like	Zhang et al., 2014
	MELO3C015917	chr01	31.760.247	31.763.829			beta-carotene isomerase D27, chloroplastic	
	MELO3C015944	chr01	31.949.806	31.956.507			LOW QUALITY PROTEIN: methionine aminotransferase-like	

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

<i>CmCCD1</i>	MELO3C023555	chr01	33.650.150	33.657.132			Carotenoid cleavage dioxygenase	Ibdah et al., 2006
	MELO3C023494	chr01	34.056.569	34.058.273		<i>MAK6-1</i>	4-coumarate:CoA ligase	
	MELO3C028965	chr01	34.063.545	34.065.678		<i>MAK6-1</i>	4-coumarate:CoA ligase	
	MELO3C023493	chr01	34.071.519	34.073.322		<i>MAK6-1</i>	4-coumarate:CoA ligase	
	MELO3C029261	chr01	35.541.998	35.546.219		<i>MAK6-1</i>	Malonate--CoA ligase-like protein	
	MELO3C024307	chr01	35.880.601	35.887.362		<i>MAK6-1</i>	Alanine aminotransferase 2	
<i>CmLOX18</i>	MELO3C024348	chr01	36.244.644	36.249.009		<i>MAK6-1</i>	Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
	MELO3C015503	chr02	2.371.493	2.373.784	MAK2-1		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C015518	chr02	2.498.181	2.500.482	MAK2-1		Acyl-CoA N-acyltransferase (NAT) superfamily protein	
	MELO3C029531	chr02	7.805.038	7.806.554	MAK2-1 MAK2-2		zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2	
	MELO3C024674	chr02	21.011.864	21.027.035	<i>MAK2-1</i> <i>MAK2-2</i> <b>MAK2-3</b>		Zeta-carotene desaturase	
	MELO3C017473	chr02	22.730.536	22.733.808	<i>MAK2-1</i> <i>MAK2-2</i> <b>MAK2-3</b>		4-coumarate--CoA ligase 1-like	
	MELO3C017271	chr02	24.751.922	24.759.891	<i>MAK2-1</i> <i>MAK2-2</i> <b>MAK2-3</b>		Acetyl-coenzyme A synthetase	
	MELO3C017266	chr02	24.786.297	24.793.129	<i>MAK2-1</i> <i>MAK2-2</i> <b>MAK2-3</b>		phenylalanine--tRNA ligase beta subunit, cytoplasmic	
<i>CmGGH</i>	MELO3C017176	chr02	25.441.230	25.443.347	<b>MAK2-3</b>		Geranylgeranyl reductase family protein	Saladie et al., 2015
<i>CmFPPS2</i>	MELO3C024982	chr03	18.786.669	18.790.673		MAK3-1	Farnesyl diphosphate synthase	Saladie et al., 2015

	MELO3C019809	chr03	23.510.028	23.513.493	MAK3-1		Phenylalanine ammonia-lyase	
	MELO3C026552	chr03	24.842.190	24.850.465	MAK3-1		Alcohol dehydrogenase, putative	
	MELO3C026553	chr03	24.852.658	24.856.344	MAK3-1		alcohol dehydrogenase-like 7	
	MELO3C026554	chr03	24.865.113	24.868.989	MAK3-1		alcohol dehydrogenase-like 7	
	MELO3C011142	chr03	28.383.115	28.386.694	<i>MAK3-1</i>		Carotenoid cleavage dioxygenase 8	
<i>CmHD-Zip</i>	MELO3C011116	chr03	28.570.508	28.571.805	<i>MAK3-1</i>		transcription factor HBP-1b(C38)	Saladie et al., 2015
	MELO3C011043	chr03	29.163.363	29.166.171	<i>MAK3-1</i>		Alcohol dehydrogenase, putative	
	MELO3C010948	chr03	29.870.695	29.872.987	<i>MAK3-1</i>		4-coumarate--coa ligase-like	
<i>CmBCAT1</i>	MELO3C010776	chr03	30.937.275	30.942.119			Branched-chain-amino-acid aminotransferase	Gonda et al., 2010
	MELO3C010686	chr03	31.468.671	31.472.617			Alanine aminotransferase 2	
	MELO3C003373	chr04	665.354	665.653	<i>MAK4-1</i>		Allyl alcohol dehydrogenase-like protein	
	MELO3C003454	chr04	1.361.276	1.364.284	<i>MAK4-1</i>		Branched-chain-amino-acid aminotransferase-like protein	
	MELO3C003462	chr04	1.417.853	1.422.210	<i>MAK4-1</i>		carotenoid 9,10(9',10')-cleavage dioxygenase 1-like isoform X1	
	MELO3C003735	chr04	3.683.708	3.686.743	<i>MAK4-1</i> <i>MAK4-2</i>	<i>MAK3-1</i>	Alcohol dehydrogenase, putative	
<i>CmBAMT</i>	MELO3C003803	chr04	4.801.220	4.803.110	<i>MAK4-1</i> <i>MAK4-2</i>	<i>MAK3-1</i>	jasmonate O-methyltransferase	Gonda et al., 2018
	MELO3C012928	chr04	14.654.580	14.659.699	MAK4-2	<i>MAK3-1</i>	long chain acyl-CoA synthetase 1	
	MELO3C022699	chr04	20.059.583	20.065.475	<i>MAK4-2</i>		Alanine aminotransferase 2	

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

	MELO3C022770	chr04	21.328.807	21.342.051	MAK4-2		4-coumarate--CoA ligase-like 6	
	MELO3C030975	chr04	28.830.018	28.838.794	MAK4-3		Branched-chain-amino-acid aminotransferase	
<i>CmCRTISO1</i>	MELO3C009571	chr04	31.107.278	31.114.107	MAK4-3		Carotenoid isomerase	Saladie et al., 2015
	MELO3C009362	chr04	32.616.194	32.620.235	MAK4-3		4-coumarate--CoA ligase-like 7	
	MELO3C014683	chr05	428.697	434.374	MAK11-1 MAK11-2		Acetyl-coenzyme A synthetase	
	MELO3C000769	chr05	435.263	436.422	MAK11-1 MAK11-2		Acetyl-coenzyme A synthetase	
	MELO3C031046	chr05	438.273	446.214	MAK11-1 MAK11-2		Acetyl-coenzyme A synthetase	
	MELO3C014682	chr05	449.418	455.854	MAK11-1 MAK11-2		Acetyl-coenzyme A synthetase	
<i>CmPSY2</i>	MELO3C014677	chr05	486.697	489.505	MAK11-1 MAK11-2		Phytoene synthase	Saladie et al., 2015
	MELO3C031065	chr05	729.507	730.647	MAK11-1 MAK11-2		lipoxygenase 7, chloroplastic-like	
<i>CmLOX16</i>	MELO3C014638	chr05	731.352	734.467	MAK11-1 MAK11-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
	MELO3C014637	chr05	740.246	744.956	MAK11-1 MAK11-2		linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic-like	
	MELO3C014635	chr05	750.598	753.975	MAK11-1 MAK11-2		Lipoxygenase	
	MELO3C014634	chr05	766.011	770.766	MAK11-1 MAK11-2		linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic-like	
	MELO3C031069	chr05	779.617	780.285	MAK11-1 MAK11-2		lipoxygenase 2, chloroplastic-like	
<i>CmLOX15</i>	MELO3C014632	chr05	781.860	784.436	MAK11-1 MAK11-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
	MELO3C031048	chr05	792.468	796.360	MAK11-1 MAK11-2		lipoxygenase 2, chloroplastic-like	

<i>CmLOX14</i>	MELO3C014631	chr05	800.572	804.911	<i>MAK11-1</i> <i>MAK11-2</i>		lipoxygenase 2, chloroplastic-like	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX13</i>	MELO3C014630	chr05	820.469	823.680	<i>MAK11-1</i> <i>MAK11-2</i>		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX12</i>	MELO3C014629	chr05	831.010	835.054	<i>MAK11-1</i> <i>MAK11-2</i>		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX11</i>	MELO3C014628	chr05	838.808	844.130	<i>MAK11-1</i> <i>MAK11-2</i>		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX10</i>	MELO3C014627	chr05	855.377	862.085	<i>MAK11-1</i> <i>MAK11-2</i>		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX09</i>	MELO3C014482	chr05	2.075.856	2.081.354	MAK5-1		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
	MELO3C014318	chr05	3.883.995	3.888.648	MAK5-1		beta-carotene isomerase D27, chloroplastic-like	
	MELO3C014273	chr05	4.412.367	4.421.658	<i>MAK5-1</i> <i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Pentatricopeptide repeat- containing protein family	
	MELO3C023086	chr05	7.293.775	7.295.481	MAK5-1		9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase	
	MELO3C020372	chr05	10.431.872	10.445.255	MAK5-1		4-coumarate CoA ligase	
	MELO3C004246	chr05	16.316.424	16.316.841	MAK5-1		Lipoxygenase	
<i>CmVDE2</i>	MELO3C008677	chr05	16.969.405	16.976.458	MAK5-1		Violaxanthin de- epoxidase	Saladie et al., 2015
<i>CmIPI1</i>	MELO3C008717	chr05	17.805.809	17.812.580	MAK5-1		Isopentenyl diphosphate isomerase	Saladie et al., 2015
	MELO3C003932	chr05	20.731.596	20.733.576	MAK5-1 MAK5-2		Cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase	
	MELO3C031255	chr05	20.737.855	20.739.845	MAK5-1 MAK5-2		Cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase	
	MELO3C003933	chr05	20.750.089	20.751.934	MAK5-1 MAK5-2		Cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase	
	MELO3C003934	chr05	20.754.435	20.756.393	MAK5-1 MAK5-2		Cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase	
	MELO3C004092	chr05	23.943.533	23.948.804	MAK5-1 MAK5-2		4-coumarate--CoA ligase 2-like	

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

	MELO3C004242	chr05	25.504.129	25.518.948	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	
<i>CmLOX02</i>	MELO3C004244	chr05	25.541.214	25.549.324	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
	MELO3C031317	chr05	25.549.738	25.550.242	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	
	MELO3C004245	chr05	25.587.419	25.587.925	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	
	MELO3C031318	chr05	25.614.150	25.618.428	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	
<i>CmLOX03</i>	MELO3C004247	chr05	25.623.246	25.627.497	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX04</i>	MELO3C004249	chr05	25.655.467	25.660.570	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX05</i>	MELO3C004250	chr05	25.669.452	25.675.315	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX06</i>	MELO3C004252	chr05	25.689.379	25.695.826	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
<i>CmLOX07</i>	MELO3C004253	chr05	25.700.194	25.715.369	MAK5-2 MAK9-2		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
	MELO3C004297	chr05	26.193.895	26.210.413	MAK5-2 MAK9-2		Branched-chain-amino- acid aminotransferase- like protein	
<i>CmLCYE</i>	MELO3C004633	chr05	29.093.674	29.098.629	MAK5-2		Lycopene epsilon cyclase	Saladie et al., 2015
	MELO3C006545	chr06	4.040.429	4.055.853	MAK6-1		Long-chain acyl-CoA synthetase	
	MELO3C006703	chr06	5.190.527	5.193.590	MAK6-1		CoA ligase	
<i>CmCHYB1</i>	MELO3C006938	chr06	7.527.408	7.530.438	MAK6-2 MAK7-1 MAK9-1		Beta-carotene hydroxylase	Saladie et al., 2015
	MELO3C019503	chr06	11.874.522	11.892.149	MAK6-2 MAK7-1 MAK9-1		zinc-binding alcohol dehydrogenase domain- containing protein 2	
	MELO3C019548	chr06	12.928.441	12.930.407	MAK6-2 MAK7-1 MAK9-1		Cinnamyl alcohol dehydrogenase	

	MELO3C032095	chr06	19.847.100	19.850.019	MAK6-2		Lipoxygenase	
	MELO3C032097	chr06	19.921.772	19.926.442	MAK6-2		Carotenoid cleavage dioxygenase	
<i>CmADH2</i>	MELO3C014897	chr06	21.578.440	21.582.640	MAK6-2	<i>MAK11-1</i>	Short-chain dehydrogenase/reductase family protein	Manriquez et al., 2006
	MELO3C014749	chr06	25.052.960	25.066.701	MAK6-2		Acetyl-coenzyme A synthetase	
<i>CmTPSDul</i>	MELO3C016595	chr06	26.614.236	26.620.952	MAK6-2		alpha-farnesene synthase	Portnoy et al., 2008
	MELO3C016594	chr06	26.644.561	26.646.419	MAK6-2		Sesquiterpene synthase Tps1	
	MELO3C016593	chr06	26.645.674	26.648.904	MAK6-2		Sesquiterpene synthase Tps1	
<i>CmTPSNY</i>	MELO3C016588	chr06	26.819.796	26.823.382	MAK6-2		(+)-gamma-cadinene synthase	Portnoy et al., 2008
	MELO3C016587	chr06	26.887.896	26.890.107	MAK6-2		Sesquiterpene synthase Tps1	
	MELO3C016586	chr06	26.890.508	26.891.068	MAK6-2		Sesquiterpene synthase Tps1	
	MELO3C016565	chr06	27.311.694	27.319.572	MAK6-2		malonate--CoA ligase isoform X1	
<i>CmCRTISO2</i>	MELO3C016495	chr06	28.732.238	28.737.545	MAK6-2		prolycopene isomerase, chloroplastic isoform X1	Saladie et al., 2015
	MELO3C025423	chr06	32.117.946	32.118.552	MAK6-2		Unknown protein	
	MELO3C013735	chr06	33.064.976	33.070.008	<i>MAK6-2</i>		CoA ligase	
	MELO3C013771	chr06	33.311.879	33.315.459	MAK3-2 <i>MAK6-2</i>		beta-carotene isomerase D27, chloroplastic	
<i>CmMGL</i>	MELO3C013774	chr06	33.344.396	33.347.215	MAK3-2 <i>MAK6-2</i>		Cystathionine gamma-synthase	Gonda et al., 2013
	MELO3C013873	chr06	34.239.080	34.247.994	<i>MAK3-2</i> <i>MAK6-2</i>		Phenylalanine--tRNA ligase	
	MELO3C017018	chr07	402.879	405.007	<b>MAK7-1</b> <b>MAK9-1</b>		CoA ligase	
	MELO3C017017	chr07	406.521	408.977	<b>MAK7-1</b> <b>MAK9-1</b>		CoA ligase	



Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

	MELO3C017009	chr07	449.944	452.991	MAK7-1 MAK9-1		4-coumarate--CoA ligase family protein	
	MELO3C025614	chr07	5.068.667	5.071.324	MAK7-2		Branched-chain-amino-acid aminotransferase-like protein	
<i>CmArATI</i>	MELO3C025613	chr07	5.071.692	5.075.274	MAK7-2		Tyrosine aminotransferase	Gonda et al., 2010
	MELO3C010479	chr07	9.006.917	9.013.141	MAK7-2		Long-Chain Acyl-CoA Synthetase	
	MELO3C032487	chr07	14.815.311	14.819.214	MAK7-2		Alanine aminotransferase 2	
<i>CmPSY3</i>	MELO3C016185	chr07	21.849.416	21.852.838	MAK7-2		Phytoene synthase	Saladie et al., 2015
	MELO3C016224	chr07	22.480.061	22.482.158	MAK7-2		9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative	
	MELO3C016290	chr07	23.215.253	23.221.671	MAK7-2		Long-Chain Acyl-CoA Synthetase	
<i>CmAAT4</i>	MELO3C017688	chr07	26.408.004	26.409.442	MAK7-2		LOW QUALITY PROTEIN: salutaridinol 7-O-acetyltransferase-like	El-Sharkawy et al., 2005 Lucchetta et al., 2007
	MELO3C017690	chr07	26.423.350	26.424.780	MAK7-2		salutaridinol 7-O-acetyltransferase-like	
	MELO3C032843	chr07	26.426.934	26.428.268	MAK7-2		salutaridinol 7-O-acetyltransferase-like	
	MELO3C017709	chr07	26.522.044	26.525.060	MAK7-2		15-cis-zeta-carotene isomerase	
<i>CmPDS</i>	MELO3C017772	chr07	27.001.123	27.011.565	MAK7-2		Phytoene desaturase	Saladie et al., 2015
	MELO3C017809	chr07	27.312.256	27.314.607	MAK7-2		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C017810	chr07	27.317.836	27.320.203	MAK7-2		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C017811	chr07	27.322.473	27.324.829	MAK7-2		phenylalanine ammonia-lyase-like	
<i>CmEREBPF/RAP2-3</i>	MELO3C017940	chr07	28.210.612	28.212.099			Ethylene-responsive transcription factor	Saladie et al., 2015
	MELO3C017957	chr07	28.307.918	28.309.736			Terpene synthase like-22	

<i>CmLCY-B2</i>	MELO3C017963	chr07	28.335.918	28.337.642			Lycopene beta-cyclase	Saladie et al., 2015
	MELO3C007024	chr08	284.599	290.433	MAK8-1		Phenylalanine--tRNA ligase	
	MELO3C007073	chr08	569.642	579.079	MAK8-1		2-succinylbenzoate--CoA ligase, chloroplastic/peroxisomal isoform X2	
<i>CmGGPPS2</i>	MELO3C007109	chr08	873.144	881.479	MAK8-1		Geranyl diphosphate synthase	Saladie et al., 2015
	MELO3C007127	chr08	991.369	993.401	MAK8-1		9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	
<i>CmGGPPS3</i>	MELO3C007490	chr08	3.120.336	3.121.469	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	Saladie et al., 2015
	MELO3C007664	chr08	4.499.044	4.506.790	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Branched-chain-amino-acid aminotransferase	
	MELO3C007702	chr08	4.776.903	4.779.741	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Alcohol dehydrogenase, putative	
	MELO3C007767	chr08	5.225.328	5.226.756	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Lipoxygenase y domain-containing protein 1	
	MELO3C032900	chr08	5.227.635	5.228.688	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Lipoxygenase y domain-containing protein 1	
	MELO3C007966	chr08	6.505.011	6.508.525	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		endochitinase-like	
	MELO3C007967	chr08	6.507.455	6.510.196	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		CoA ligase	
<i>CmORG</i>	MELO3C024554	chr08	9.365.082	9.370.250	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Chaperone dnaJ-like protein	Tzuri et al., 2015

<i>CmCHYE/Lut1</i>	MELO3C024495	chr08	9.935.294	9.942.280	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Cytochrome P450	Saladie et al., 2015
	MELO3C020744	chr08	10.546.911	10.549.315	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Lycopene beta cyclase	
	MELO3C008788	chr08	26.671.705	26.672.751	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Alcohol dehydrogenase-like 6	
	MELO3C033120	chr08	26.821.531	26.822.562	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		Alcohol dehydrogenase-like 6	
	MELO3C014222	chr08	31.293.521	31.295.902	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C014223	chr08	31.297.700	31.300.366	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C014224	chr08	31.301.722	31.304.120	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C014225	chr08	31.307.177	31.308.064	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C014226	chr08	31.308.392	31.309.318	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C014227	chr08	31.311.335	31.313.683	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase	
	MELO3C014228	chr08	31.321.276	31.323.768	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase-like	
	MELO3C014229	chr08	31.328.250	31.331.523	<i>MAK6-1</i> <i>MAK8-2</i> <i>MAK12-1</i>		phenylalanine ammonia-lyase	

<i>CmPPRI</i>	MELO3C003069	chr08	31.800.854	31.807.421	MAK6-1 MAK8-2 MAK12-1		Pentatricopeptide repeat-containing family protein	Galpaz et al., 2018
<i>CmPPRI</i>	MELO3C003097	chr08	32.003.211	32.007.029	MAK6-1 MAK8-2 MAK12-1		Protein SLOW GREEN 1, chloroplastic	Zhao et al., 2019
	MELO3C003251	chr08	33.744.925	33.773.581	MAK2-3 MAK8-2 MAK12-1		alcohol dehydrogenase	
<i>CmEREBPF</i>	MELO3C022181	chr09	441.114	442.329	MAK9-2		ethylene-responsive transcription factor ERF021	Saladie et al., 2015
	MELO3C025111	chr09	14.376.525	14.378.778	MAK9-2		CoA ligase	
<i>CmCNL</i>	MELO3C025110	chr09	14.413.845	14.417.579	MAK9-2		CoA ligase	Gonda et al., 2018
	MELO3C025105	chr09	14.510.286	14.512.501	MAK9-2		CoA ligase	
<i>CmPSYI</i>	MELO3C025102	chr09	14.553.133	14.556.862	MAK9-2		Phytoene synthase	Saladie et al., 2015
	MELO3C005081	chr09	16.824.652	16.829.927	MAK9-2		Acetyl-coenzyme A synthetase	
<i>CmOR</i>	MELO3C005449	chr09	21.683.406	21.690.712	MAK2-1 MAK9-2		Protein ORANGE-ORANGE, chloroplastic	Tzuri et al., 2015
	MELO3C005498	chr09	21.986.353	21.988.764	MAK9-2	MAK2-1	4-coumarate:CoA ligase-like protein	
<i>CmSGR</i>	MELO3C005616	chr09	22.969.464	22.971.943	MAK9-2	MAK2-1	Protein STAY-GREEN, chloroplastic	Saladie et al., 2015
	MELO3C005663	chr09	23.293.296	23.295.731	MAK9-2	MAK2-1	4-coumarate:CoA ligase-like protein	
	MELO3C005703	chr09	23.616.054	23.617.566	MAK9-2	MAK2-1	Beta-carotene 3-hydroxylase	
<i>CmCHYB2</i>	MELO3C005704	chr09	23.618.670	23.621.969	MAK9-2	MAK2-1	Beta-carotene hydroxylase	Saladie et al., 2015
	MELO3C005749	chr09	23.929.037	23.935.339	MAK9-2	MAK2-1	long chain acyl-CoA synthetase 4-like	
	MELO3C005792	chr09	24.302.565	24.308.683	MAK2-1 MAK9-2		alcohol dehydrogenase-like 4	

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

	MELO3C005809	chr09	24.444.681	24.451.030	MAK2-1 MAK9-2		Cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	
	MELO3C012391	chr10	778.194	783.403	MAK10-1		NAC domain-containing protein 16	
	MELO3C012390	chr10	784.963	788.767	MAK10-1		NAC domain-containing protein 53-like	
	MELO3C012388	chr10	796.735	799.158	MAK10-1		4-coumarate:CoA ligase 4	
	MELO3C012332	chr10	1.187.065	1.194.234	MAK7-2 MAK10-1		Basic-leucine zipper transcription factor family protein	
	MELO3C012215	chr10	1.933.739	1.938.444	MAK7-2 MAK10-1		NAC domain-containing protein	
	MELO3C012114	chr10	2.566.463	2.568.193	MAK7-2		NAC domain-containing protein, putative	
	MELO3C011959	chr10	3.609.412	3.613.545	MAK10-2		Alanine aminotransferase 2	
	MELO3C000284	chr10	3.973.645	3.976.730	MAK10-2		Alanine aminotransferase 2	
<i>CmLOX08</i>	MELO3C011885	chr10	4.116.286	4.121.512	MAK10-2 MAK10-3		Lipoxygenase	Zhang et al., 2014
	MELO3C011858	chr10	4.329.328	4.332.151	MAK10-2 MAK10-3		4-coumarate--CoA ligase-like 1	
	MELO3C034560	chr11	696.270	698.590	MAK11-1		Alcohol dehydrogenase, putative	
	MELO3C023272	chr11	726.844	730.075	MAK11-1		Alcohol dehydrogenase, putative	
	MELO3C023275	chr11	744.663	749.556	MAK11-1		terpene synthase 10-like isoform X1	
	MELO3C023276	chr11	757.540	761.124	MAK11-1		terpene synthase 10-like	
	MELO3C023278	chr11	765.655	769.142	MAK11-1		terpene synthase 10-like	
	MELO3C034557	chr11	791.753	797.843	MAK11-1		terpene synthase 10-like	
	MELO3C023282	chr11	816.918	822.631	MAK11-1		terpene synthase 10-like	
	MELO3C023283	chr11	831.813	845.051	MAK11-1		terpene synthase 10-like	
	MELO3C023284	chr11	850.384	855.616	MAK11-1		terpene synthase 10-like	

	MELO3C023286	chr11	866.234	870.942	MAK11-1		terpene synthase 10-like	
	MELO3C023287	chr11	877.666	878.735	MAK11-1		terpene synthase 10-like	
	MELO3C023288	chr11	900.919	906.642	MAK11-1		terpene synthase 10-like isoform X1	
<i>CmVDE1</i>	MELO3C020965	chr11	2.457.822	2.460.393	MAK11-1		Violaxanthin de-epoxidase, chloroplastic	Saladie et al., 2015
<i>CmGGPS1</i>	MELO3C020952	chr11	2.582.998	2.584.798	MAK11-1		Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	Saladie et al., 2015
<i>CmZEP</i>	MELO3C020872	chr11	3.391.883	3.397.466	MAK11-1		Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic	Saladie et al., 2015
	MELO3C021941	chr11	4.779.193	4.787.843	MAK4-3 MAK6-2 MAK11-1 MAK11-2	MAK4-2	long chain acyl-CoA synthetase 2	
	MELO3C024724	chr11	7.324.425	7.329.629	MAK4-3 MAK6-2 MAK11-1 MAK11-2	MAK4-2	4-coumarate--CoA ligase 2	
<i>CmAAT3</i>	MELO3C024762	chr11	7.933.534	7.935.291	MAK4-3 MAK6-2 MAK11-1 MAK11-2	MAK4-2	benzyl alcohol O-benzoyltransferase-like	El-Sharkawy et al., 2005 Lucchetta et al., 2007
	MELO3C024764	chr11	7.963.408	7965077	MAK4-3 MAK6-2 MAK11-1 MAK11-2	MAK4-2	benzyl alcohol O-benzoyltransferase-like	
<i>CmAAT2</i>	MELO3C024766	chr11	8.060.892	8.063.565	MAK4-3 MAK11-1 MAK11-2	MAK4-2	benzyl alcohol O-benzoyltransferase	Yahyaoui et al., 2002 El-Sharkawy et al., 2005 Lucchetta et al., 2007
	MELO3C024769	chr11	8.138.528	8.140.343	MAK4-3 MAK11-1 MAK11-2	MAK4-2	benzyl alcohol O-benzoyltransferase-like	
<i>CmAAT1</i>	MELO3C024771	chr11	8.184.873	8.187.698	MAK4-3 MAK11-1 MAK11-2	MAK4-2	benzyl alcohol O-benzoyltransferase	Yahyaoui et al., 2002 El-Sharkawy et al., 2005 Lucchetta et al., 2007
	MELO3C013583	chr11	18.248.787	18.252.561	MAK11-1 MAK11-2		Tyrosine aminotransferase	

Capítulo 4. Analysis of aroma volatile compounds

	MELO3C035046	chr11	18.267.067	18.269.670	MAK11-1 MAK11-2		Tyrosine aminotransferase	
	MELO3C019585	chr11	26.085.854	26.089.162	MAK11-1 MAK11-2		Cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase	
	MELO3C019579	chr11	26.189.388	26.217.264	MAK11-1 MAK11-2		MBOAT (Membrane bound O-acyl transferase) family protein	
	MELO3C025786	chr11	28.388.462	28.392.551	MAK11-1 MAK11-2		phenylalanine ammonia- lyase-like	
	MELO3C021358	chr11	30.073.385	30.074.251	<i>MAK11-1</i> MAK11-2		carotenoid cleavage dioxygenase 7, chloroplastic isoform X1	
	MELO3C021161	chr11	31.660.702	31.672.258	MAK2-1 MAK2-2 MAK11-2		Long-chain acyl-CoA synthetase	
	MELO3C022291	chr11	32.532.564	32.539.629	<i>MAK2-2</i> <i>MAK7-1</i> MAK11-2	<i>MAK2-1</i> <i>MAK9-1</i>	Carotenoid cleavage dioxygenase	
	MELO3C022382	chr11	33.292.355	33.299.085	<i>MAK2-2</i> <i>MAK7-1</i> MAK11-2	<i>MAK2-1</i> <i>MAK9-1</i>	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	
	MELO3C022399	chr11	33.409.565	33.416.981	<i>MAK2-2</i> <i>MAK7-1</i> MAK11-2	<i>MAK2-1</i> <i>MAK9-1</i>	alcohol dehydrogenase- like	
	MELO3C020483	chr12	138.190	140.064			Cytochrome P450 family cinnamate 4-hydroxylase	
<i>CmHSP</i>	MELO3C020588	chr12	1.264.778	1.265.721	<i>MAK12-1</i>		17.5 kDa class I heat shock protein	Saladie et al., 2015
	MELO3C026850	chr12	3.494.952	3.504.051	<i>MAK12-1</i>		Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	
	MELO3C004955	chr12	5.767.458	5.771.746	MAK12-1		4-coumarate:CoA ligase- like protein	
	MELO3C026065	chr12	15.084.363	15.105.505	MAK3-1 MAK4-1 MAK12-1		Acetyl-CoA acetyltransferase	

	MELO3C002744	chr12	21.375.227	21.377.259	MAK3-1 MAK4-1		9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	
	MELO3C035535	chr12	24.696.813	24.700.045	MAK12-2		4-coumarate-CoA ligase	
	MELO3C002346	chr12	24.701.481	24.705.189	MAK12-2		4-coumarate-CoA ligase	
	MELO3C002167	chr12	25.867.931	25.872.728	MAK12-2		Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	
	MELO3C002189	chr12	25.708.847	25.712.824	MAK12-2		Alcohol dehydrogenase family protein	





## **CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL**



## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL.

La amplia variabilidad genética y la compatibilidad intraespecífica de la especie *Cucumis melo* L. permite el estudio de un amplio abanico de caracteres, tanto agronómicos como de calidad del fruto, para su disección genética y futura explotación en programas de mejora. En esta tesis doctoral, el objetivo principal es estudiar la variabilidad genética incluida en el cultivar de origen japonés ‘Ginsen makuwa’ (MAK), bien para profundizar en el conocimiento del control genético de aspectos de calidad del fruto, bien para su explotación en programas de mejora de variedades de élite occidentales. Para el estudio de estos caracteres, se requiere el empleo de poblaciones segregantes, como la colección de líneas de introgresión (ILs) empleada en esta tesis. Mediante la utilización de este tipo de poblaciones, el mejorador dispone de recursos para detectar la región o regiones genómicas involucradas en determinados caracteres objetivo, que posteriormente pueden acotarse mediante mapeo fino y/o clonaje posicional para la identificación del gen responsable, y a su vez permitir mediante selección asistida por marcadores la introducción de los alelos de interés en los cultivares de élite carentes de éstos, en respuesta a la demanda del consumidor (aspectos de calidad del fruto) o a la del agricultor (resistencia a enfermedades, producción). Muchos de los genes de interés se encuentran en variedades exóticas o silvestres, que siendo portadoras de estos alelos suelen ser fenotípicamente desfavorables en su conjunto. La utilización de variedades exóticas como MAK en el desarrollo de líneas de introgresión es, por tanto, una herramienta muy valiosa, no sólo desde el punto de vista del conocimiento de la diversidad genética de estos materiales, sino también desde el punto de vista aplicado. Además de estos recursos genéticos mencionados, cabe destacar la enorme importancia en esta especie de la disponibilidad y el empleo de nuevas herramientas moleculares que permiten acelerar los programas de mejora, cumpliendo los objetivos en un menor tiempo y de forma más eficiente. Estos objetivos de mejora en la actualidad tienen una tendencia creciente hacia aspectos de calidad del fruto, tanto sensorial como nutricional, aunque sin obviar que el producto final del programa de mejora debe tener una buena productividad y determinadas resistencias a los patógenos más comunes.

Previamente a esta tesis ya se había desarrollado una colección de líneas de introgresión en melón (Eduardo et al., 2005) utilizando el parental recurrente ‘Piel de Sapo’ (PS), tipo varietal de gran importancia económica en España. Éste fue uno de los motivos por que el grupo de Mejora genética de Cucurbitáceas del COMAV decidió generar una población de líneas de introgresión empleando otro de los tipos varietales con mayor importancia económica en Europa como genotipo de élite, el parental ‘Vedrantais’ (VED) perteneciente al grupo

## Capítulo 5: Discusión general

Cantalupensis. Posteriormente, durante el desarrollo de esta tesis se han publicado otras tres colecciones de líneas de introgresión, una utilizando ‘Piel de Sapo’ como parental recurrente y un tipo Dudaim como donante (Castro et al., 2019), y dos recíprocas entre ‘Piel de Sapo’ y ‘Vedrantais’ (Pereira, 2018).

### **Desarrollo de la colección de ILs en fondo genético cantalupo para la disección de caracteres.**

Con el objetivo de analizar la variabilidad genética incluida en la variedad ‘Ginsen makuwa’ PI 420176 (*Cucumis melo* subsp. *agrestis* grupo Makuwa, subgrupo ‘Yuki’), el grupo del COMAV generó una colección de líneas de introgresión con el cultivar ‘Vedrantais’ como parental recurrente. En el capítulo 2 de la presente tesis se describe el proceso seguido, con una selección temprana (BC2 y BC3), empleando diversas plataformas de genotipado, seleccionando aquellos individuos con introgresiones diana, con un menor número de introgresiones no-diana y con un mayor porcentaje de fondo genético VED por individuo, de forma que la totalidad de los individuos seleccionados cubrieran el genoma MAK por completo. Con esta estrategia, la mayoría de ILs se obtuvieron en la quinta generación. Actualmente existen tres colecciones de ILs en melón que también han necesitado entre cinco y seis generaciones para la finalización de la ILs (Eduardo et al., 2005; Pereira, 2018). En otros cultivos el número promedio de generaciones para la obtención de ILs fue de tres en melocotón (Serra et al., 2016), seis en tomate y fresa (Barrantes et al., 2014; Urrutia et al., 2015) y siete en berenjena (Gramazio et al., 2017).

El porcentaje promedio de genoma recurrente en la colección final fue de 95,4 %, similar al de las otras ILs anteriormente mencionadas. El promedio de ILs/cromosoma fue de 2,3, el cual es algo inferior al descrito recientemente por Pereira (2018) en sus ILs recíprocas PS y VED (3-3,2 ILs/cromosoma) y para otras especies como tomate o fresa (4,6 y 6, respectivamente; Barrantes et al., 2014; Urrutia et al., 2015). Sin embargo, estas diferencias no se deben al mayor tamaño promedio de las introgresiones obtenidas con la colección de ILs presentada en esta tesis, pues el tamaño medio de éstas fue de 30 cM (10,5 Mpb) frente a los 58 cM (15,6-16,2 Mpb) de Pereira (2018) o 51 cM (25 Mpb) de Barrantes et al. (2014), sino probablemente a la selección de un mayor número de líneas totales solapantes y en parte redundantes. La resolución genética obtenida se puede incrementar fácilmente, ya que se pueden generar rápidamente nuevas ILs recombinantes para el mapeo de genes o QTLs localizados en introgresiones concretas (Paterson et al., 1988).

Con el objetivo de incrementar la densidad de marcadores en las ILs, éstas se genotiparon por secuenciación (GBS), obteniéndose 2,146 SNPs útiles (capítulo 4 de esta tesis). Comparando los resultados obtenidos con el genotipado de densidad media (Agena Bioscience) y el genotipado de alta densidad (GBS) se observó que el porcentaje de genoma recurrente disminuyó de un 95,4 a un 94 %, debido a que el número de introgresiones no-diana por IL es en realidad mayor al inicialmente detectado con un menor número de marcadores (0,37 vs 1,7 introgresiones no-diana/IL). Del mismo modo, el promedio del número de introgresiones totales por IL también fue mayor empleando GBS (1,3 vs 2,7 introgresiones/IL). Estos resultados eran esperados, pues trabajos previos con especies como el tomate obtuvieron resultados similares en sus ILs al comparar el genotipado de baja densidad mediante HRM con el de alta densidad de un chip Illumina Infinium (Barrantes et al., 2014). Así pues, estos autores observaron también un ligero descenso en el porcentaje de genoma recurrente recuperado (96 % vs 95.7 %) y un aumento en el promedio de introgresiones presentes en las ILs detectadas al emplear mayor número de marcadores (1 vs 1,9 introgresiones/IL). Aunque la tendencia general ha sido la detección de nuevas introgresiones menores previamente no observadas con la plataforma Agena Bioscience, en el caso excepcional de la IL MAK\_9-1 la introgresión del cromosoma 9 inicial no se ha detectado por GBS. En cuanto al tamaño promedio de las introgresiones, se observó un ligero incremento en la población genotipada por GBS para las introgresiones diana (10,5 Mpb con Agena Bioscience vs 10,9 Mpb con GBS), aunque el promedio con todas las introgresiones detectadas con este sistema de alto rendimiento fue de 6,2 Mpb, por la aparición de pequeñas introgresiones no-diana. De forma similar, el número total de *bins* (fragmentos cromosómicos comprendidos entre los puntos de recombinación definidos por las introgresiones o entre éstos y un telómero), que es un concepto muy importante a tener en cuenta para obtener una buena precisión en el mapeo de QTLs, aumentó en la población genotipada por GBS (76 *bins*) respecto a la población genotipada por Agena Bioscience (37 *bins*), con un promedio de 6,3 *bins*/cromosoma vs 2,8 para GBS y Agena BioScience, respectivamente. Estos resultados son coherentes con la mayor densidad de SNPs, como se ha puesto de manifiesto en trabajos previos (58 vs 71 *bins* para genotipado de baja densidad y de alta densidad en ILs de tomate; Barrantes, 2014).

El siguiente objetivo detallado en el capítulo 2 fue la identificación del efecto de las regiones genómicas de MAK en fondo genético VED evaluando en tres ambientes 21 caracteres relacionados con la floración y la calidad del fruto. El aumento en la densidad de marcadores gracias a la tecnología GBS, ha permitido, posteriormente a la publicación de este paper, revisar la información del mismo e identificar: : 1) nuevos QTLs que previamente no se habían podido

## Capítulo 5: Discusión general

observar por la falta de información genotípica; 2) solapamiento de QTLs con regiones no-diana sin efecto para determinados QTLs, lo cual conllevaba la división del QTL previamente detectado; 3) estrechamiento de la región candidata debido al solapamiento de regiones no-diana y ausentes de efecto para determinados QTLs (Anexo 1).

La colección de ILs caracterizada en esta tesis permitió identificar un total de 86 QTLs mediante tecnología GBS frente a los 56 detectados previamente mediante la tecnología Agena Bioscience, validados en al menos dos ambientes (Anexo 1). Muchos de ellos han confirmado los ya detectados con anterioridad en otros trabajos y con otras poblaciones, mientras que otros QTLs se han detectado por primera vez gracias al empleo de esta colección de ILs y suponen una novedad interesante en la mejora de esta especie. Aunque el efecto de la mayoría de QTLs fue el esperado según el fenotipo del parental donante, también se detectaron QTLs con una segregación transgresiva para caracteres como precocidad de formación del fruto, peso y diámetro del fruto, firmeza de la pulpa y sólidos solubles. Los caracteres de mayor interés en estas ILs están relacionados con la floración, la morfología y el peso del fruto, la maduración y el color de la pulpa.

En cuanto a los caracteres relacionados con la floración, se detectaron varios QTLs no descritos hasta la fecha: el QTL *nmaf30.5*, que aumentó la floración masculina en la IL MAK\_5-2, y dos QTLs *fef30.6.1* y *fef30.6.2* que aumentaron la floración femenina en la IL MAK\_6-2, respecto al parental VED.

Numerosos QTLs se han detectado en relación al tamaño y la morfología del fruto, caracteres muy interesantes para el consumidor. En las ILs MAK\_2-1, MAK\_11-1 y MAK\_11-2 se detectaron QTLs en los cromosomas 2 y 11 (*fw.2.1-fw.2.2*; *fl.2.1-fl.2.2*; *fd.2.1-fd.2.2*; *fw.11*; *fl.11.1-fl.11.2*; *fd.11*) que aumentaban el peso, la longitud y el diámetro del fruto respecto a VED. Estos QTLs podrían corresponder con los metaQTLs relacionados con el peso del fruto *FWQM2* y *FWQM11* descritos por Monforte et al. (2014), con genes candidatos pertenecientes a las familias génicas *CNR/FW2* (implicada en la regulación del número de células) y *SIKLUH/FW3.2* (subfamilia del citocromo P450 A78). Aunque el efecto de *FWQM2* se ha asociado a efectos pleiotrópicos del gen de andromonoecia *a* (*CmACS7*) (Gonzalo y Monforte, 2017; Pan et al., 2019), en el cruce VED x MAK no segrega este carácter y, por tanto, se trataría de un QTL de peso independiente de la expresión del sexo. Recientemente, Pan et al. (2019) han publicado un estudio comparativo y un análisis de asociación a nivel genómico en las cucurbitáceas de mayor importancia económica (pepino, melón, sandía). Además de detectar 150 QTLs consenso relacionados con la forma y peso/tamaño del fruto para estas especies, con los que se apoya la existencia de mecanismos y genes involucrados pertenecientes a las familias

génicas *CNR*, *CSR*, *CYP78A*, *SUN*, *OVATE*, *TRM*, *YABBY* y *WOX*; este estudio pone de manifiesto los efectos pleiotrópicos de genes relacionados con la expresión sexual (genes *ACS* de la ruta de biosíntesis de etileno) para estos caracteres. Sin embargo, como en las ILs marco de esta tesis, Castro et al. (2019) también detectaron un QTL de peso en esta región del cromosoma 2 en una población no segregante para el gen *a*, lo que refuerza que además de éste hay otros genes implicados que se localizan cerca. Por otro lado, las ILs MAK\_1-1 y MAK\_6-2 presentaron frutos significativamente más pequeños que VED, fenotipo que puede tener gran interés en el mercado dada la demanda de frutas de consumo individual actual. Para estos frutos se detectaron QTLs en los cromosomas 1 y 6 (*fw.1.1-fw.1.2*; *fl.1.1-fl.1.2*; *fd.1.1-fd.1.2*; *fw.6.1-fw.6.2*; *fl.6.1-fl.6.2*; *fd.6.1-fd.6.2*) que disminuían el peso, la longitud y el diámetro del fruto respecto a VED, y donde se localizan los genes MELO3C016564 (*CmCNR-6*), MELO3C013751 (*CmCNR-4*), MELO3C013727 (*CmWOX-6*) y MELO3C013970 (*CmYABBY-2*), ya relacionados con el peso del fruto por Monforte et al. (2014) y Pan et al. (2019). La línea MAK\_11-1 (*fw.11*), en cambio, aumentó el peso del fruto, y su introgresión en el cromosoma 11 contiene otro gen de la familia *CYP78A* (citocromo 450, *CmCYP78A-4*, MELO3C020975) (Pan et al., 2019). Respecto a la forma del fruto, ésta está asociada a la longitud en coherencia con estudios previos (Eduardo et al., 2007; Fernández-Silva et al., 2010). Las ILs MAK\_7-2 y MAK\_11-2 presentaron frutos significativamente más alargados que VED, lo que permitió la identificación de un QTL en el cromosoma 7 para longitud y forma del fruto (*fs.7-fl.7*), donde se localizan los genes MELO3C017554 (*CmOFP-8*) y MELO3C017768 (*CmSUN-16*) y varios QTLs consenso de forma y peso (Pan et al., 2019); y otro en el cromosoma 11 para la longitud del fruto, que se solapa en parte con el metaQTL *FSQM11* descrito previamente (Monforte et al., 2014; Pan et al., 2019). Por tanto, esta población de ILs ha aportado variabilidad interesante respecto al tamaño y morfología del fruto, tanto para detección de genes candidatos, como para su explotación como material de pre-mejora, con el fin de ofrecer al consumidor un abanico más amplio de tamaños y formas.

Otro carácter de gran importancia es el número de días hasta la maduración del fruto. Este carácter resulta muy interesante desde el punto de vista del agricultor, pues reduce el tiempo del fruto en planta y por tanto del cultivo. Las ILs MAK\_1-2 y MAK\_6-2 presentaron en este sentido precocidad en la maduración, poniendo de manifiesto algunas regiones genómicas en los cromosomas 1 y 6 (*dmat.1*, *dmat.6.1*, *dmat.6.2* y *dmat.6.3*) no descritas previamente. Aunque esta región del cromosoma 1 es cercana a la descrita por Castro et al. (2019), relacionada con climaterio (formación de capa de abscisión, aroma externo) no existe solape. Resulta interesante que ambas ILs comparten el QTL *dmat.6.2*, por lo que podría ser una región candidata que habría que estudiar con más detalle. En el mismo cromosoma, Ríos et al. (2017)



## Capítulo 5: Discusión general

detectaron, en una población de ILs formada por el parental recurrente PS y el parental donante ‘Songwan Charmi’ (SC), el QTL *ETHQV6.3* el cual era el responsable de formar frutos climatéricos en fondo genético no climatérico. Este QTL, cuyo gen responsable es MELO3C016540 (*CmNAC-NOR*, factor de transcripción de la familia NAC), no solapa con el QTL *dmata.6.2* localizado en MAK\_1-2 y MAK\_6-2, pero sí con *dmata.6.3* (MAK\_6-2), lo que sugiere que alelos procedentes de un parental exótico cercano a MAK como SC pueden acelerar el proceso de maduración y por tanto acortar los días de maduración, aun en un fondo genético ya climatérico como VED.

Respecto a la maduración cabe destacar que, aunque los dos parentales de la población tienen diferentes perfiles de maduración (VED con comportamiento típico de maduración climatérica y MAK sólo con cierto grado de maduración climatérica), la gran mayoría de ILs presentaron el mismo comportamiento que el parental recurrente VED, no así con el perfil aromático que se detalla en el capítulo 4. Sin embargo, conviene subrayar que las ILs MAK\_7-2 y MAK\_10-1 mostraron un comportamiento en la maduración distinto a VED e incluso a MAK. Sus frutos presentaron ausencia de aroma externo y de climaterio, y un aumento de la firmeza de la pulpa. Todos estos caracteres son etileno dependientes (Pech et al., 2008), lo cual nos hace pensar que el perfil de etileno de estas líneas es el responsable de alterar estos caracteres. Estas dos ILs mostraron regiones genómicas que colocalizaban para estos tres caracteres (*ff.7-al.7-ar.7*; *ff.10-al.10-ar.10*), destacando la introgresión en común que comparten y que se localiza en el cromosoma 10, donde Moreno et al. (2008) ya detectaron un QTL en el que los alelos de la entrada SC incrementaban la firmeza de la pulpa en el fondo PS. Esto sugiere que los alelos de tipos asiáticos bastante cercanos genéticamente como MAK y SC aumentan la firmeza de la pulpa tanto en fondos climatéricos como VED, como en fondos no climatéricos como PS. Recientemente, Pereira (2018) ha detectado dos QTLs en el cromosoma 10 donde los alelos VED incrementan la firmeza de la pulpa, *FIRQV10.1* y *FIRQV10.2* (colocalizan con el QTL de MAK\_10-1 y MAK\_7-2, respectivamente), pero en nuestro caso son los alelos MAK los que aumentan la firmeza. Además, en este mismo trabajo Pereira (2018) detectó en sus ILs dos QTLs (*CDQV7.1* y *ABSQV11.1*) relacionados con la degradación de clorofila y la formación de la capa de abscisión. En cuanto a *CDQV7.1*, en la región de la introgresión de MAK\_7-2, se observó que los alelos PS conducían a la no degradación de clorofila y a la falta de aroma externo, características asociadas a un bloqueo del climaterio del fruto, lo que concuerda con las características observadas en esta IL (falta de aroma y corteza verde con moteado). Además, MAK\_7-2 por ser portadora de la introgresión del cromosoma 10 como MAK\_10-1 también presentó ausencia de capa de abscisión, aunque no tan acentuada como MAK\_10-1. Respecto a este carácter, Pereira (2018) observó que los frutos con los alelos VED en la introgresión del

cromosoma 11 (*ABSQV11.1*) conducían a la formación de una ligera capa de abscisión en fondo no climatérico y que los alelos PS en esta región sobre fondo climatérico VED no la presentaban. En cambio, en nuestra población las líneas portadoras de alelos MAK en esta posición sí mostraron una clara capa de abscisión, lo que se puede explicar porque nuestro parental donante es considerado climatérico, aunque en menor grado que VED. En otros trabajos previos se han descrito más QTLs o genes mayores relacionados con climaterio (capa de abscisión, producción de etileno, firmeza, etc.) que no se han detectado en la colección de ILs presentada en esta tesis (Périn et al., 2002b, Moreno et al., 2008; Vegas et al., 2013; Leida et al., 2015; Pereira, 2018), lo que refuerza la idea de la complejidad del proceso de maduración y su carácter poligénico. De hecho, se habla de un continuo en la variación respecto al climaterio en esta especie (Pereira, 2018). Los estudios más recientes y con mayor relevancia se refieren a los QTLs de los cromosomas 3 y 6, *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*, detectados en la población de ILs derivada de PS y SC (Vegas et al., 2013), y al QTL *ETHQV8.1* del cromosoma 8 detectado en la población de RILs derivada de VED y PS (Pereira, 2018). La estrategia de mapeo fino ha dado lugar a la identificación de genes responsables en estas regiones genómicas implicadas en la producción de etileno: el previamente mencionado *CmNAC-NOR* (Ríos et al., 2017) para *ETHQV6.3*, los candidatos MELO3C011421 (función de regulación) y MELO3C011413 (citocromo P450 78A5 KLUH) para el sub-QTL *ETHQB3.5.1* (Pereira, 2018), y MELO3C024518 (serina/treonina kinasa tipo CTR1) para *ETHQV8.1* (Pereira, 2018). Por esta razón, el mapeo fino de la región del cromosoma 10 detectada en esta tesis resulta de gran interés.

Por otra parte, nuestra colección de ILs ha permitido confirmar la genética del color de la pulpa de melón. Estudios previos establecían un control genético con dos loci implicados, uno en el cromosoma 9 (*CmOr*) y otro en el cromosoma 8 (con los principales candidatos *CmPPR1*, MELO3C003069 y MELO3C003097, Tzuri et al., 2015; Galpaz et al., 2018; Zhao et al., 2019). El gen *CmOr* (MELO3C005449, cromosoma 9) tiene dos alelos, uno dominante *CmOr*<sup>+</sup> y otro recesivo *CmOr*. La presencia del alelo dominante (como ocurre en nuestro parental VED) confiere pulpa naranja independientemente de la constitución genética del locus del cromosoma 8, ya que es epistático de este. Cuando el alelo recesivo del gen *CmOr* está presente (como ocurre en MAK), el color de la pulpa depende del locus del cromosoma 8. En este hay también dos alelos, el dominante *Chr8*<sup>+</sup> confiere color blanco a la pulpa (como ocurre en MAK) y el recesivo *Chr8Chr8* color verde.

En nuestra colección, las ILs MAK\_2-1 y MAK9-2, con introgresión de MAK en el cromosoma 9 y fondo VED en el 8, presentaron color de pulpa verde. En estudios adicionales realizados al

### Capítulo 5: Discusión general

margen de esta tesis, mediante el cruce y posterior autofecundación de MAK\_9-2 con la IL de pulpa naranja MAK\_8-2 (fondo VED en el cromosoma 9 e introgresión MAK en cromosoma 8) se pudieron obtener individuos de pulpa blanca con los alelos MAK en los cromosomas 8 y 9. El color de la pulpa de estas ILs se ha visto en el análisis de aromas que afecta al patrón de metabolitos derivados de carotenoides.

En relación con el color interno de la corteza, destacaron las ILs MAK\_6-1, MAK\_8-2 y MAK\_12-1 por presentar un color amarillo diferente al resto. Una de las principales proteínas responsables de esta coloración en la corteza es el flavonoide naringenin chalcona (Tadmor et al., 2010; Feder et al., 2015), cuya acumulación se ve regulada por la proteína F-Box con dominio Kelch que codifica el gen *CmKFB* (MELO3C011980, cromosoma 10). Ninguno de los genes descritos por Feder et al. (2015) se sitúan en las introgresiones comunes de estas ILs que se corresponden con regiones en los cromosomas 5 y 8 (*cir5.1* y *cir8*). En estudios realizados al margen de la presente tesis se ha determinado que estas ILs no tienen nangerine chalcona y que si cambian en su patrón de carotenos. De hecho, según el GBS estas ILs presentan genotipo VED en el cromosoma 9, pero genotipo MAK en el cromosoma 8 y esto es posiblemente el origen del color amarillo, en lugar de verde (como se encuentra en VED) de la capa interna de la corteza. Será necesario estudiar con más detalle como se ve alterado el patrón de carotenoides en pulpa de estas líneas. Lo que está claro es que proporcionan un nuevo fenotipo de color interno distinto al de VED.

Por último, y más relacionado con la calidad organoléptica, también se han detectado QTLs para azúcares y sólidos solubles. En este sentido, la IL MAK\_10-1, además de presentar un bloqueo en el climaterio, también mostró un QTL único en el cromosoma 10 (*ssc.10*) donde los alelos MAK aumentaban el contenido en sólidos solubles. Esto resulta novedoso porque hasta ahora no se había observado en ninguna población segregante un aumento de azúcares por parte del parental donante, normalmente tipos exóticos. En nuestro caso, el parental MAK es un genotipo que presenta un alto contenido en azúcares dentro de la subespecie *agrestis*. Una de las líneas más interesantes que se describen en este capítulo de la tesis es precisamente esta IL, MAK\_10-1, por lo que decidimos profundizar más en ella realizando los ensayos expuestos en el capítulo 3.

**‘MAK\_10’: una línea de mejora tipo Charentais de larga vida.**

Como se ha comentado en párrafos anteriores, la IL MAK\_10-1 presentó, junto con la línea MAK\_7-2, una característica potencialmente interesante como es el bloqueo de climaterio, lo que se puede traducir en una mayor vida postcosecha. Esta característica resulta de gran interés para el mercado, y por este motivo se decidió llevar a cabo una caracterización más completa de una de estas líneas con el fin de analizar con mayor precisión las diferencias en este proceso de maduración respecto al parental VED, principalmente en relación a tiempos de maduración, la evolución de parámetros de calidad, como el contenido de azúcares y ácidos en la pulpa, y la evolución de ciertas características en postcosecha. El bloqueo del climaterio mencionado conlleva la ausencia de la producción de etileno autocatalítico durante la maduración (Burger et al., 2010) y, por tanto, también afecta a caracteres etileno dependientes implicados en la calidad del fruto como son la producción de aroma, la dureza de la pulpa y la degradación de clorofila (Pech et al., 2008). De hecho, tanto MAK\_10-1 como MAK\_7-2 presentaron frutos con ausencia de aroma y mayor dureza de la pulpa, además de la ausencia de la capa de abscisión. Por otra parte, en relación a un carácter etileno independiente, la IL MAK\_10-1 también presentó una característica importante para el mercado como es un alto contenido en sólidos solubles, mayor que ‘Vedrantais’ (ya mostrado en el capítulo 2).

La comparación de la evolución temporal entre los frutos de MAK\_10-1 y VED (tomados cada 5 días desde los 30 días postpolinización) desde el punto de vista de la maduración, morfología y calidad del fruto (capítulo 3) aportó resultados interesantes. En primer lugar, la firmeza de la pulpa de MAK\_10-1 se mantuvo constante durante todo el proceso de maduración, a diferencia de VED que presentó un perfil de firmeza típico de frutos climatéricos (Rose et al., 1998). Esto es debido a que MAK\_10-1 presenta un retraso en la maduración del fruto, lo cual permite que además de no reblandecerse la pulpa, el fruto pueda permanecer más tiempo en la planta y por tanto pueda a su vez acumular más azúcares. Por lo tanto, se sugiere que podría deberse a un efecto pleiotrópico del aumento del tiempo de maduración en planta. MAK\_10-1 tiene la ventaja de mantener constante la firmeza de la pulpa durante la maduración en planta y permite la posibilidad de decidir aumentar el contenido en sólidos solubles manteniendo el fruto en planta durante más tiempo, ya que en el momento óptimo de recolección de VED (cuando comienza a aparecer la capa de abscisión) MAK\_10-1 presenta unos valores de sólidos solubles algo inferiores. Por otra parte, el perfil de los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa resultó similar en MAK\_10-1 y VED, con la diferencia que el contenido máximo de estos azúcares apareció a los 5-10 días después en MAK\_10-1, apoyando la hipótesis del efecto pleiotrópico que tiene la maduración tardía en planta.

## Capítulo 5: Discusión general

En cuanto al comportamiento de maduración postcosecha, se pudo observar como el descenso de la firmeza de la pulpa fue mucho más rápido en VED que en MAK\_10-1. De forma que frutos MAK\_10-1 cosechados al mismo tiempo presentaban una mayor firmeza de la pulpa que VED 10 días después de su almacenamiento. En postcosecha, el descenso de azúcares de frutos MAK\_10-1 fue mucho más lento que para los frutos VED, independientemente del momento de cosecha y los días postcosecha. Zhang et al. (2015), describieron un aumento de sólidos solubles al inicio de la postcosecha hasta alcanzar su máximo a los siete días postcosecha en frutos tipo ‘Makuwa’. El análisis detallado de azúcares realizado en esta tesis mostró un descenso de hexosas y un aumento de más del doble del contenido en sacarosa de MAK\_10-1 respecto a VED, lo que resultó en un mayor contenido en equivalentes de sacarosa que determinan el dulzor. Del mismo modo, Liu et al. (2012) mostró un descenso del contenido en hexosas y un aumento de sacarosa durante el almacenamiento de frutos tipo ‘Makuwa’. En general, el contenido diferencial de azúcares en el fruto de melón puede deberse a diferencias en la acumulación de azúcares o a diferencias en el metabolismo de éstos. Mientras VED estabiliza sus niveles de sacarosa después de la síntesis autocatalítica de etileno, MAK\_10-1 al carecer de síntesis autocatalítica de etileno continúa incrementando el contenido en este azúcar, que es el más relacionado con el dulzor. En este sentido, la IL MAK\_10-1 puede considerarse como un ejemplo de variación enmascarada, ya que los alelos MAK conducen a un contenido en azúcares mucho mayor cuando están en otro fondo genético como VED (12,76 vs 15,68 °Brix, en VED y MAK\_10-1 respectivamente).

Esta descripción más profunda de MAK\_10-1, no sólo se realizó respecto del comportamiento durante la maduración y sus características de fruto, sino que también conllevó un análisis más detallado de las regiones genómicas implicadas y de posibles genes candidatos a la luz de estos fenotipados. El genotipado GBS acotó mejor la región solapante entre la introgresión del cromosoma 10 de MAK\_10-1 y la de la IL con fenotipo similar MAK\_7-2 (1,335,417–2,206,788 pb). En esta región compartida por ambas ILs, se localiza el gen MELO3C012215 (*NAC domain-containing protein*) relacionado con la regulación transcripcional de etileno. La funcionalidad biológica de las proteínas *NAC* es muy variable, afectando al crecimiento de la planta y desarrollo de diversas estructuras vegetales (Duval et al., 2002; Hibara et al., 2003), al metabolismo de la pared celular (Zhong et al., 2006), la respuesta a estrés bióticos y abióticos y a la senescencia (Guo y Gan, 2006; Ríos et al., 2017). Sin embargo, y aunque de este gen concreto MELO3C012215 no se tiene mucha información, estudios previos en melón han relacionado la inducción del climaterio con un factor de transcripción de dominio *NAC* (*CmNAC-NOR*, MELO3C016540; Ríos et al., 2017), lo que hace pensar que este gen puede ser un buen gen candidato que explique el bloqueo del climaterio. La base de datos Melonet-DB

para el estudio de la genómica funcional en melón (<https://melonet-db.dna.affrc.go.jp/ap/mvw>; Yano et al., 2018), localiza el mayor nivel de expresión de este gen en ápices, ovario y fruto, principalmente en los primeros estadios, lo que en principio es coherente con nuestra hipótesis.

Además del gen MELO3C012215, detectamos dos genes más relacionados con el proceso de producción de etileno, ambos se localizan en una región genómica única de MAK\_10-1 en el cromosoma 10. Por un lado, detectamos el gen MELO3C012390 el cual se trata de otro gen con dominio *NAC* (*NAC domain-containing protein 53-like*), que como hemos visto anteriormente podría estar relacionado con la senescencia del fruto y el gen MELO3C012332 (*Basic-leucine zipper transcription factor family protein*) perteneciente a la familia de factores de transcripción *HD-Zip* relacionados con la regulación del etileno y la señalización durante la maduración del fruto. La detección de estos dos genes, MELO3C012332 (expresión alta en ápices, estigma y ovario de acuerdo con el atlas de expresión de la base de datos Melonet-DB) y MELO3C012390 (expresión alta en pétalos, anteras, estigma, ovario y fruto; Melonet-DB), en MAK\_10-1 y del gen MELO3C012215 en MAK\_10-1 y MAK-7-2, nos hace pensar en la diferencia de gradación de climaterio entre ambas ILs debido al carácter poligénico de la producción de etileno en frutos climatéricos, de forma que estos tres genes podrían estar relacionados en el proceso, especialmente MELO3C012215 y MELO3C012390 que se expresan en fruto. Sería interesante en un futuro realizar un mapeo fino en de la región y estudiar la existencia del polimorfismo real en estos genes en los parentales, así como su expresión.

Por otra parte, en la región de la introgresión de MAK\_10-1 también se localiza el gen *CmSPP2* (*Sucrose-P phosphatase 2*, MELO3C012320) implicado en el metabolismo de azúcares (Leida et al., 2015; Saladié et al., 2015), el cual puede ser un gen candidato que explique el QTL detectado *ssc.10* en esta IL. La base de datos Melonet-DB localiza el mayor nivel de expresión de este gen en hojas principalmente. Esta región solapa con el QTL *SSCQUI0.1* detectado por Pereira et al (2018), en el que contrariamente a nuestros resultados, los alelos VED incrementaban el contenido en sólidos solubles frente a los alelos PS.

Estos ensayos han confirmado ciertas ventajas de esta línea respecto a VED, especialmente para el transporte y comercialización internacional como son la mayor vida postcosecha y la mayor firmeza de la pulpa debida al bloqueo del climaterio, y el incremento en sólidos solubles debido principalmente al mayor contenido en sacarosa. En contraposición, presenta la posible desventaja de la ausencia de aroma tan característica de este tipo de melones, como se ha determinado en el capítulo 4, por lo que probablemente podría ser una línea muy interesante para mercados donde no se aprecie tanto esa característica de los tipos ‘Vedrantais’.

**Estudio de los compuestos orgánicos volátiles de la colección de ILs en distintos ambientes.**

Además del estudio más detallado del climaterio y la acumulación de azúcares gracias a la IL MAK\_10-1, la colección de ILs desarrollada en esta tesis nos permitió estudiar otro aspecto fundamental relacionado con la calidad como es el perfil aromático del fruto, estudio que se describe en el capítulo 4. En este trabajo se realizó un análisis preliminar de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) presentes en 25 de las ILs, y en dos ambientes, con el fin de estudiar los efectos de las introgresiones respecto al perfil aromático de los parentales, principalmente de VED. El objetivo último de este estudio es la detección de regiones genómicas involucradas en la producción de VOCs, no sólo con el fin de investigar posibles nuevos perfiles aromáticos de interés en fondo ‘Vedrantais’ sino con el fin de poder desarrollar líneas premejora en las que no se vea especialmente afectado el aroma tan característico de este genotipo cuando se introgresan ciertas regiones con otros fines de mejora. Este puede ser el caso de la incorporación del gen *cmv1* de resistencia a CMV (*Cucumber mosaic virus*) procedente de MAK que se localiza en el cromosoma 12 (*CmVPS41*, MELO3C004827: 9.310.816 – 9.339.767 pb; Pascual et al., 2019). La IL MAK\_12-1 contiene una introgresión MAK en esta región (3,9 -15,8 Mpb), además de dos introgresiones adicionales de acuerdo con el genotipado GBS, por lo que sería interesante por su resistencia al virus. Sin embargo, sí ve afectado su perfil aromático respecto a VED, con menor contenido en alquil ésteres (los mayoritarios en VED) y apocarotenoides, y mayor contenido en alcoholes y acetato ésteres, así como en compuestos típicos de MAK como el eugenol, por lo que resulta interesante conocer estos efectos por las implicaciones para la obtención de una variedad final en un futuro programa de mejora. Por tanto, cabe destacar la importancia de este ensayo presentado en el capítulo 4, pues, además, aunque existen muchos trabajos de detección de compuestos volátiles, tanto en melón como en otras especies, sólo unos pocos se han centrado en el estudio de las regiones genómicas involucradas empleando una población de mejora, como los trabajos de Freilich et al. (2015) en melón, Rambla et al. (2017) en tomate o Sánchez et al. (2014) en melocotón. El conocimiento de los genes y las enzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos aromáticos es un foco de interés en los últimos años precisamente por sus implicaciones en la calidad del fruto (Gonda et al., 2016; Gonda et al 2018; Tuan et al., 2019).

El estudio cualitativo y cuantitativo de compuestos volátiles presenta una complejidad importante que hay que tener en cuenta. Los factores que influyen en el perfil aromático de un fruto son diversos: desde el propio cultivar (Gonda et al., 2016), la maduración del fruto (Dos-Santos et al., 2013), el efecto ambiental (Beaulieu et al., 2006; Chaparro-Torres et al., 2016), a la propia toma de muestras y los métodos de detección utilizados (El Hadi et al., 2013). Por

esto, se trata de datos difíciles de extrapolar para otros genotipos e incluso dentro del mismo genotipo para diferentes ambientes o bajo diferentes tratamientos o condiciones.

La colección de ILs desarrollada en esta tesis parte de dos parentales con perfiles aromáticos distintos, que previamente se habían caracterizado como parte de una colección nuclear (Esteras et al., 2018). En términos generales, VED, como la mayoría de frutos climatéricos, presenta un alto contenido en ésteres, seguido de alcoholes y aldehídos (Beaulieu y Grimm 2001; Aubert y Bourger 2004; Esteras et al., 2018); y MAK, presenta un perfil aromático intermedio entre tipos climatéricos y no climatéricos, con un alto contenido en ésteres teniendo en cuenta que pertenece a la subsp. *agrestis*, aunque menor que VED (Li et al., 2016; Esteras et al., 2018). Nuestros resultados confirmaron esta reducción en volátiles en MAK, principalmente para alquil ésteres y apocarotenoides. A su vez, la evaluación del híbrido F1 sugiere la dominancia genética de los alelos MAK frente a los VED, lo que también se reflejó en los frutos de las ILs donde las introgresiones MAK tuvieron un efecto negativo en la producción de VOCs. Este efecto, esperado al tratarse de un cruce entre una variedad aromática y una no tan aromática, podría explicarse por un control genético poligénico con genes implicados en diferentes regiones del genoma. Sólo un pequeño grupo de ILs resultó más similar a VED que al parental donante MAK de acuerdo a su perfil aromático. Por otra parte, para determinados compuestos se observó una segregación transgresiva, ya que en algunas ILs y/o en la F1 se detectaron compuestos no presentes en los parentales o fuera del rango de éstos. Freilich et al. (2015), evaluando una población de RILs derivada del genotipo ‘Dulce’, grupo *Cantalupensis*, y PI 414723, grupo *Momordica*, observó también este hecho para algunos metabolitos. En otros cultivos como tomate o melocotón también se ha descrito este efecto (Eduardo et al., 2013; Rambla et al., 2017). Como en este trabajo de Eduardo et al. (2013), en nuestro ensayo se evidenció una influencia ambiental notable para algunos VOCs. Aun así, la tendencia de determinadas ILs fue similar en ambos ambientes y permitió el análisis de las introgresiones en relación con el perfil de VOCs.

En las ILs con un perfil aromático más parecido a MAK, se han localizado en sus introgresiones genes relacionados con la producción de aldehídos (lipooxigenasas), alcoholes (alcohol deshidrogenasas, ADH), y ésteres (alcohol acil transferasas, AAT), sugiriendo un bloqueo de la producción y síntesis de determinados compuestos que las asemeja al parental donante. MAK\_6-1 es la IL con mayor número de introgresiones (7), lo que se postula como la causa de que sea la línea con una composición en VOCs más parecida a MAK. Sin embargo, otras líneas con alto porcentaje de genoma recurrente también han mostrado tendencia a perfiles aromáticos similares a MAK.



## Capítulo 5: Discusión general

Entre las ILs más interesantes, cabe mencionar MAK\_1-1, por su mayor contenido en eugenol, y en cuya principal introgresión en el cromosoma 1 se encuentran genes candidatos como MELO3C024967 (farnesil pirofosfato sintasa, *CmFPPSI*), enzima implicada en la síntesis de terpenoides, o MELO3C024886 (*4-coumarate:CoA ligase*, *4CL*), enzima relacionada con la síntesis de eugenol (Rastogi et al., 2013). En base a la información del transcriptoma del tipo aromático japonés Harukei (Melonet-DB; Yano et al., 2018), estos genes se expresan principalmente en semilla, aunque también en ovario y fruto (MELO3C024967), y en raíz, pétalos y anteras (MELO3C024886). Además, Atkinson et al. (2016) mencionan la importancia del eugenol en tomate relacionada con la defensa a TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) y la actividad antifúngica y antimicrobiana contra patógenos humanos. Por estos motivos, sería de enorme importancia profundizar en el estudio de los genes implicados en la acumulación de eugenol de MAK\_1-1 para aumentar el valor nutricional de los frutos. En cambio, MAK\_4-1 se caracterizó, como MAK\_6-1, por una gran reducción en alquil ésteres, aunque con altos niveles de ésteres acetato. En su introgresión del cromosoma 4 también se han localizado genes candidatos implicados en la síntesis de aldehídos (MELO3C003373, MELO3C003454) o en la síntesis de ésteres vía L-fenilalanina (MELO3C003803, *CmBAMT*). Estos genes se expresan en ovario, fruto y en postcosecha, por lo que pueden ser buenos candidatos (Melonet-DB). La IL MAK\_4-3 destacó por su alto contenido en aldehídos, que proporcionan olor a verde, a la vez que en apocarotenoides, típicos de VED. Esta IL presenta pulpa naranja, como la mayoría de la colección a excepción de MAK\_2-1 y MAK\_9-2. El hecho de haber encontrado que estas dos ILs son las que presentan menos apocarotenoides sugiere que el contenido en estos volátiles depende de la presencia de carotenoides, sustratos de las enzimas CCD implicadas en la degradación de éstos (Gonda et al., 2016), aunque la diferencia observada entre las diversas líneas de pulpa naranja requiere de mayor estudio. Este hecho puede considerarse como un efecto pleiotrópico de la expresión del alelo MAK del gen *CmOr* en la producción de volátiles apocarotenoides.

En lo que respecta al otro gen implicado en la coloración de la pulpa, el del locus del cromosoma 8, se estudiaron con más detalle las ILs MAK\_6-1, MAK\_8-2, y MAK\_12-1 por presentar el alelo *CmOr\_VED* y genotipo MAK en el cromosoma 8, lo que les confiere pulpa naranja, pero corteza interna amarilla como se ha descrito anteriormente. Aunque para estas líneas el contenido en apocarotenoides haya sido mayor que en las ILs de pulpa verde pero significativamente menor que en el resto, la existencia de unas pocas ILs con valores similares hace descartar un efecto claro de este gen, por lo que en esta tesis se propone la existencia de otros genes implicados. En este sentido, la introgresión de la línea MAK\_7-2 presenta varios

genes candidatos relacionados con la síntesis de carotenoides como genes *PSY* (fitoeno sintasas) y *PDS* (fitoeno desaturasas) entre otros (Tuan et al., 2019).

Otro posible efecto pleiotrópico afecta a las ILs previamente descritas en los capítulos 2 y 3 como no climatéricas o con el climaterio bloqueado o parcialmente bloqueado (MAK\_10-1 y MAK\_7-2). Estas líneas presentaron niveles bajos de los VOCs más importantes en VED (ésteres, principalmente alquil ésteres, y apocarotenoides; Spadafora et al., 2019), aunque su perfil aromático tampoco es similar al de melones de tipo no climatérico como los del grupo *Ibericus*. Este último grupo se caracteriza por tener una alta presencia de alcoholes y aldehídos (Gonda et al., 2016), aunque en nuestro caso estos compuestos tienen poca influencia en el perfil aromático de estas dos ILs. Estos resultados nos indican que el climaterio intermedio de MAK no es suficiente para bloquear completamente la síntesis de volátiles como en melones no climatéricos, pero de acuerdo con Ayub et al. (1998), el etileno controla la síntesis de muchos de los aromas más perceptibles, ya que nuestras ILs no presentan aroma externo en la maduración en comparación con VED. Este cambio en el perfil de volátiles de MAK\_7-2 y MAK\_10-1 puede deberse al retraso en la maduración de estos frutos, aunque también se sugieren algunos genes candidatos que se encuentran en la introgresión de MAK\_7-2 en el cromosoma 7, como las aminotransferasas MELO3C025614, MELO3C025613 (*CmArATI*) y MELO3C017688 (*CmAAT4*). De éstas, MELO3C025613 se expresa principalmente en corteza en postcosecha, además de anteras y estigma, y MELO3C017688 en fruto en postcosecha (Melonet-DB), por lo que potencialmente son más interesantes.

En general, este análisis de compuestos aromáticos ha demostrado que las introgresiones MAK tienen un efecto negativo en la producción de volátiles y que hay numerosas regiones genómicas posiblemente implicadas por lo que se pone de manifiesto la necesidad de estudiar con mayor profundidad estas regiones candidatas para superar la dificultad en la recuperación de determinados perfiles aromáticos en los programas de mejora.

Los trabajos presentados en esta tesis suponen un paso más en el aprovechamiento de la variabilidad intraespecífica del melón y en el conocimiento de las regiones genómicas y genes implicados en caracteres de importancia comercial como son la morfología de fruto, el tipo de maduración y el perfil aromático. Además, se describen algunas líneas con características interesantes para el mercado.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

- 1) Se ha caracterizado la primera colección de 27 líneas de introgresión de melón desarrollada partir del cultivar ‘Ginsen makuwa’ (subsp. *melo*, grupo Makuwa, PI 420176) en el fondo genético del cultivar ‘Vedrantais’ tipo ‘Charentais’ (subsp. *melo*, grupo Cantalupensis). Mediante el genotipado de alta densidad (GBS), se han validado las introgresiones detectadas mediante la tecnología Agena BioScience, reduciéndose su tamaño en algún caso, y se han detectado nuevas introgresiones no-diana, que se pretenden eliminar en un futuro. La colección presenta una media de 2,7 introgresiones/IL y 2,25 ILs/cromosoma, con un promedio de recuperación del fondo genético ‘Vedrantais’ del 94 %. El genoma donante ‘Ginsen makuwa’ representa una cobertura del 96,8 %.
- 2) Con el genotipado de Agena BioScience y GBS y los datos de fenotipado se han identificado 74 QTLs consistentes en al menos 2 localidades. De éstos, 3 QTLs están relacionados con aspectos de floración, 4 con la precocidad de maduración del fruto, 33 con aspectos morfológicos (forma del fruto, reticulado y espesor de la corteza), 12 con el proceso de maduración (presencia de aroma, capa de abscisión, firmeza de la pulpa), 16 con el color de la pulpa, 5 con el color interno de la corteza y 1 con el contenido en sólidos solubles.
- 3) Se han obtenido ILs con características interesantes desde el punto de vista de la calidad del fruto, relacionadas con la morfología del fruto, el color de la pulpa y de la parte interna de la corteza y el proceso de maduración. Entre otras, destacan las ILs MAK\_2-1, MAK\_11-1 y MAK\_11-2, y las ILs MAK\_1-1 y MAK\_6-2 que desarrollan frutos de mayor o menor tamaño, respectivamente. Así mismo, son de interés las ILs MAK\_2-1, MAK\_9-2 que producen frutos tipo ‘Charentais’, pero de pulpa verde, y MAK\_6-1, MAK\_8-2 y MAK\_12-1 que presentan color amarillo de la parte interna de la corteza, lo que le da un aspecto diferente al fruto. En relación con el proceso de maduración del fruto, las ILs MAK\_7-2 y MAK\_10-1 tienen alterado el proceso de maduración climatérica, produciendo frutos que no forman capa de abscisión, de pulpa más firme y sin aroma externo.
- 4) El estudio en profundidad de la IL MAK\_10-1 confirmó su interés para ser empleada en programas de mejora. El bloqueo del climaterio en esta línea, posiblemente causado por el alelo MAK en el gen MELO3C012215 (*NAC domain-containing protein*), va asociado a un aumento en la firmeza de la pulpa y del contenido en sólidos solubles, tanto en el punto de

## *Conclusiones*

madurez como en postcosecha. Estas características permiten una mejor adaptación a mercados internacionales, que requieren de transportes a largas distancias.

- 5) El análisis de compuestos volátiles en la colección de ILs ha demostrado que las introgresiones MAK, en general, disminuyen la producción de volátiles. Esto pone de manifiesto la dificultad de recuperación de determinados perfiles aromáticos en los programas de mejora cuando se emplean estas fuentes exóticas para la mejora del melón de tipo 'Charentais'. La asociación genotipo-perfil aromático en cada una de las ILs ha permitido la identificación preliminar de genes candidatos relacionados con el perfil de volátiles en esta población. Entre los principales candidatos destacan, el gen MELO3C024886 (*4-coumarate:CoA ligase*), relacionado con la producción de eugenol, el gen MELO3C030975 (*Branched-chain-amino-acid aminotransferase*), relacionado con la producción de aldehídos, y el gen *CmCRTISO1* (MELO3C009571, *carotenoid isomerase*), relacionado con la acumulación de carotenoides. Además, hemos comprobado como el perfil aromático de la IL MAK\_7-2, con retraso de la maduración del fruto, es distinto, no solo del perfil del parental climaterico del que se derivó, sino también del perfil típico de los melones no climatéricos, mostrando una acumulación intermedia de alquil ésteres, principales compuestos del perfil aromático de los melones climatéricos.

# **ANEXO**





**Anexo 1.** Listado de todos los QTLs detectados con el test Dunnet después de utilizar el genotipado de alta densidad GBS. Carácter, nombre del QTL, cromosoma, posición inicial y final del QTL (v3.6.1) e IL portadora del QTL. Codificación de los caracteres: NMaF30 y NFeF30 (número flores masculinas y femeninas 30 días después de la apertura de la primera flor), Dmat (días hasta la madurez), FW (peso del fruto), FL (longitud del fruto), FD (diámetro del fruto), Fs (forma del fruto), FF (firmeza de la pulpa), AL (capa de abscisión), AR (aroma), Rth (espesor de la corteza), Net (reticulado), FCHI, FCa, FCb (parámetros de color de la pulpa), CIR (color interno de la corteza), SSC (contenido de sólidos solubles), SUC, GLUC y FRUC (contenido de sacarosa, glucosa y fructosa).

Trait	QTL_Name	Chr	Start position	End position	IL
<b>NMaF30</b>	<i>nmaf30.5</i>	<b>5</b>	26,609,894	29,173,008	MAK_5-2
<b>NFeF30</b>	<i>nfef30.6.1</i>	<b>6</b>	6,259,917	33,562,398	MAK_6-2
	<i>nfef30.6.2</i>	<b>6</b>	14,432,968	33,562,398	
<b>Dmat</b>	<i>dmat.1</i>	<b>1</b>	30,909,230	33,782,220	MAK_1-2
	<i>dmat.6.1</i>	<b>6</b>	6,259,919	6,486,554	MAK_6-2
	<i>dmat.6.2</i>	<b>6</b>	6,795,308	6,795,308	MAK_1-2;MAK_6-2
	<i>dmat.6.3</i>	<b>6</b>	14,432,968	33,562,398	MAK_6-2
<b>FW</b>	<i>fw.1.1</i>	<b>1</b>	6,788,002	12,811,365	MAK_1-1
	<i>fw.1.2</i>	<b>1</b>	17,028,733	28,575,759	
	<i>fw.2.1</i>	<b>2</b>	1,279,456	1,421,480	MAK_2-1
	<i>fw.2.2</i>	<b>2</b>	2,304,328	2,618,468	
	<i>fw.6.1</i>	<b>6</b>	6,259,919	6,486,554	MAK_6-2
	<i>fw.6.2</i>	<b>6</b>	14,432,968	33,562,398	
	<i>fw.11</i>	<b>11</b>	35,032	4,758,755	MAK_11-1
<b>FL</b>	<i>fl.1.1</i>	<b>1</b>	6,788,002	12,811,365	MAK_1-1
	<i>fl.1.2</i>	<b>1</b>	17,028,733	28,575,759	
	<i>fl.2.1</i>	<b>2</b>	1,279,456	1,421,480	MAK_2-1
	<i>fl.2.2</i>	<b>2</b>	2,304,328	2,618,468	MAK_2-1
	<i>fl.5</i>	<b>5</b>	27,346	718,027	MAK_11-1; MAK_11-2
	<i>fl.6.1</i>	<b>6</b>	6,259,919	6,486,554	MAK_6-2
	<i>fl.6.2</i>	<b>6</b>	14,432,968	33,562,398	
	<i>fl.7</i>	<b>7</b>	2,701,809	27,623,981	MAK_7-2
	<i>fl.11.1</i>	<b>11</b>	35,032	4,758,755	MAK_11-1
	<i>fl.11.2</i>	<b>11</b>	13,759,029	30,531,404	MAK_11-1 MAK_11-2
<b>FD</b>	<i>fd.1.1</i>	<b>1</b>	6,788,002	12,811,365	MAK_1-1
	<i>fd.1.2</i>	<b>1</b>	17,028,733	28,575,759	
	<i>fd.2.1</i>	<b>2</b>	1,279,456	1,421,480	MAK_2-1
	<i>fd.2.2</i>	<b>2</b>	2,304,328	2,618,468	MAK_2-1
	<i>fd.5</i>	<b>5</b>	26,609,896	29,173,010	MAK_5-2
	<i>fd.6.1</i>	<b>6</b>	6,259,919	6,486,554	MAK_6-2
	<i>fd.6.2</i>	<b>6</b>	14,432,968	33,562,398	
	<i>fd.11</i>	<b>11</b>	35,032	4,758,755	MAK_11-1
<b>FS</b>	<i>fs.7</i>	<b>7</b>	2,701,809	27,623,981	MAK_7-2
<b>FF</b>	<i>ff.7</i>	<b>7</b>	2,701,809	27,623,981	MAK_7-2
	<i>ff.10.1</i>	<b>10</b>	424,009	1,278,243	MAK_10-1

Anexo

	<i>ff.10.2</i>	10	1,335,418	2,206,789	MAK_7-2;MAK_10-1
	<i>ff.10.3</i>	10	2,241,044	3,196,156	MAK_7-2
<b>AL</b>	<i>al.7</i>	7	2,701,809	27,623,981	MAK_7-2
	<i>al.10.1</i>	10	424,009	1,278,243	MAK_10-1
	<i>al.10.2</i>	10	1,335,418	2,206,789	MAK_7-2;MAK_10-1
	<i>al.10.3</i>	10	2,241,044	3,196,156	MAK_7-2
<b>AR</b>	<i>ar.7</i>	7	2,701,809	27,623,981	MAK_7-2
	<i>ar.10.1</i>	10	424,009	1,278,243	MAK_10-1
	<i>ar.10.2</i>	10	1,335,418	2,206,789	MAK_7-2;MAK_10-1
	<i>ar.10.3</i>	10	2,241,044	3,196,156	MAK_7-2
<b>RTh</b>	<i>rth.2</i>	2	25,247,417	26,521,668	MAK_2-3
	<i>rth.6.1</i>	6	6,259,919	6,486,554	MAK_6-2
	<i>rth.6.2</i>	6	14,432,968	33,562,398	
<b>Net</b>	<i>net.5</i>	5	26,609,896	29,173,010	MAK_5-2
	<i>net.6.1</i>	6	6,259,919	6,486,554	MAK_6-2
	<i>net.6.2</i>	6	14,432,968	33,562,398	
	<i>net.7</i>	7	2,701,441	27,623,981	MAK_7-2
<b>FCHI</b>	<i>fchl.2.1</i>	2	1,279,456	1,421,480	MAK_2-1
	<i>fchl.2.2</i>	2	2,304,328	2,618,468	
	<i>fchl.6</i>	6	2,177,862	5,247,161	MAK_6-1
	<i>fchl.8</i>	8	21,279,832	21,279,832	MAK_8-2
	<i>fchl.9.1</i>	9	1,732,613	16,861,024	MAK_9-2
	<i>fchl.9.2</i>	9	17,229,960	21,387,824	
	<i>fchl.9.3</i>	9	21,547,872	25,241,435	MAK_2-1;MAK_9-2
<b>FCa</b>	<i>fca.2.1</i>	2	1,279,456	1,421,480	MAK_2-1
	<i>fca.2.2</i>	2	2,304,328	2,618,468	
	<i>fca.9.1</i>	9	1,732,613	16,861,024	MAK_9-2
	<i>fca.9.2</i>	9	17,229,960	21,387,824	
	<i>fca.9.3</i>	9	21,547,872	25,241,435	MAK_2-1;MAK_9-2
<b>FCb</b>	<i>fcb.2</i>	2	25,247,417	26,521,668	MAK_2-3
	<i>fcb.9.1</i>	9	1,732,613	16,861,024	MAK_9-2
	<i>fcb.9.2</i>	9	17,229,960	21,387,824	
	<i>fcb.9.3</i>	9	21,547,872	25,241,435	MAK_2-1;MAK_9-2
<b>CIR</b>	<i>cir.5.1</i>	5	4,729,568	4,762,899	MAK_6-1; MAK_8-2; MAK_12-1
	<i>cir.5.2</i>	5	4,868,183	4,868,183	MAK_6-1; MAK_8-2
	<i>cir.6</i>	6	2,177,862	5,247,161	MAK_6-1
	<i>cir.8</i>	8	21,279,832	21,279,832	MAK_8-2
	<i>cir.12</i>	12	3,998,400	13,933,620	MAK_12-1
<b>SSC</b>	<i>ssc.10</i>	10	424,009	1,011,683	MAK_10-1
<b>SUC</b>	<i>suc.1</i>	1	30,909,230	33,782,220	MAK_1-2
	<i>suc.5.1</i>	5	26,609,896	29,173,010	MAK_5-2
	<i>suc.5.2</i>	5	26,856	717,332	MAK_11-1
	<i>suc.10</i>	10	424,009	1,011,683	MAK_10-1
<b>GLUC</b>	<i>gluc.1</i>	1	30,909,230	33,782,220	MAK_1-2
	<i>gluc.5.1</i>	5	26,609,896	29,173,010	MAK_5-2
	<i>gluc.5.2</i>	5	26,856	717,332	MAK_11-1
	<i>gluc.11.1</i>	11	35,032	4,758,755	MAK_11-1
	<i>gluc.11.2</i>	11	13,759,029	30,531,404	MAK_11-1
<b>FRUC</b>	<i>fruc.5.1</i>	5	26,609,896	29,173,010	MAK_5-2

	<i>fruc.5.2</i>	5	26,856	717,332	MAK_11-1
					MAK_11-2
	<i>fruc.10</i>	10	424,009	1,011,683	MAK_10-1



## **REFERENCIAS**



## REFERENCIAS

- Akashi, Y., Fukuda, N., Wako, T., Masuda, M., & Kato, K. (2002). Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melons, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes. *Euphytica*, *125*(3), 385-396.
- Akashi, Y., Tanaka, K., Cho, T. T., Khaing, M. T., Yoshino, H., Nishida, H., ... & Kato, K. (2009). Molecular analysis of genetic diversity in melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Myanmar and their relationship with melon germplasm from East and South Asia. *Genetic resources and crop evolution*, *56*(8), 1149.
- Alioto, T., Alexiou, K., Bardil, A., Barteri, F., Castanera, R., Cruz, F., ... & Galán, B. (2019). Transposons played a major role in the diversification between the closely related almond (*Prunus dulcis*) and peach (*P. persica*) genomes: Results from the almond genome sequence. *bioRxiv*, 662676.
- Allwood, J. W., Cheung, W., Xu, Y., Mumm, R., De Vos, R. C., Deborde, C., ... & Rolin, D. (2014). Metabolomics in melon: A new opportunity for aroma analysis. *Phytochemistry*, *99*, 61-72.
- Amann, A. B. (1989). *The etiology of Pythium sudden wilt of cantaloupe in the Imperial Valley of California*. U. of Calif., Davis.
- Amaro, A. L., Fundo, J. F., Oliveira, A., Beaulieu, J. C., Fernández-Trujillo, J. P., & Almeida, D. P. (2013). 1-Methylcyclopropene effects on temporal changes of aroma volatiles and phytochemicals of fresh-cut cantaloupe. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(4), 828-837.
- Atkinson, R. G. (2016). Phenylpropenes: Occurrence, distribution, and biosynthesis in fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(10), 2259-2272.
- Ayub, R., Guis, M., Amor, M. B., Gillot, L., Roustan, J. P., Latché, A., ... & Pech, J. C. (1996). Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature biotechnology*, *14*(7), 862.
- Argyris, J. M., Ruiz-Herrera, A., Madriz-Masis, P., Sanseverino, W., Morata, J., Pujol, M., ... Garcia-Mas, J. (2015a). Use of targeted SNP selection for an improved anchoring of the melon (*Cucumis melo* L.) scaffold genome assembly. *BMC Genomics*, *16*(1), 4.
- Argyris, J. M., Pujol, M., Martín-Hernández, A. M., & Garcia-Mas, J. (2015b). Combined use of genetic and genomics resources to understand virus resistance and fruit quality traits



## Referencias

- in melon. *Physiologia plantarum*, 155(1), 4-11.
- Argyris, J. M., Díaz, A., Ruggieri, V., Fernández, M., Jahrman, T., Gibon, Y., ... & Garcia-Mas, J. (2017). 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.). *Frontiers in plant science*, 8, 1679.
- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter*, 9(3), 208-218.
- Aubert, C., & Bourger, N. (2004). Investigation of volatiles in Charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(14), 4522–4528.
- Aubert, C., & Pitrat, M. (2006). Volatile compounds in the skin and pulp of Queen Anne's pocket melon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8177-8182.
- Bai, X. H., Teng, L. H., Lü, D. Q., & Qi, H. Y. (2014). Co-treatment of EFF and 1-MCP for enhancing the shelf-life and aroma volatile compounds of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Journal of Integrative Agriculture*, 13(1), 217-227.
- Barrantes, W. (2014). Desarrollo de una genoteca de líneas de introgresión entre *Solanum lycopersicum* y *Solanum pimpinellifolium* utilizando herramientas genómicas de alto rendimiento y detección de QTLs implicados en calidad del fruto. Valencia (Doctoral Thesis). Universitat Politècnica de València. Valencia, España. Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39102/BARRANTES%20-%20Desarrollo%20de%20una%20genoteca%20de%20I%20C3%ADneas%20de%20introgres%20entre%20Solanum%20lycopersicum%20y%20Sol...pdf?sequence=1>
- Barrantes, W., Fernández-del-Carmen, A., López-Casado, G., González-Sánchez, M. Á., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., & Monforte, A. J. (2014). Highly efficient genomics-assisted development of a library of introgression lines of *Solanum pimpinellifolium*. *Molecular breeding*, 34(4), 1817-1831.
- Barkan, A., & Small, I. (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annual review of plant biology*, 65, 415-442.
- Bates, D. M., & Robinson R.W. (1995). Cucumber, melons and watermelons. *Evolution of crop plants*, 89-96.
- Baudracco-Arnas, S., & Pitrat, M. (1996). A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theoretical and*

- Applied Genetics*, 93(1-2), 57-64.
- Beaulieu, J. C., & Grimm, C. C. (2001). Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1345-1352.
- Beaulieu, J. C. (2006). Volatile changes in cantaloupe during growth, maturation, and in stored fresh-cuts prepared from fruit harvested at various maturities. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(1), 127-139.
- Beaulieu, J. C., & Lea, J. M. (2006). Characterization and semiquantitative analysis of volatiles in seedless watermelon varieties using solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7789-7793.
- Ben Salem, I., Correia, K. C., Boughalleb, N., Michereff, S. J., León, M., Abad-Campos, P., ... Armengol, J. (2013). *Monosporascus eutypoides*, a cause of root rot and vine decline in Tunisia, and evidence that *M. cannonballus* and *M. eutypoides* are distinct species. *Plant Disease*, 97, 737-743.
- Beltran, J., Serrano, E., López, F. J., Peruga, A., Valcarcel, M., & Rosello, S. (2006). Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(7), 1255.
- Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., ... & Jonker, H. (2013). Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment. *Metabolomics*, 9(1), 57-77.
- Blanca, J., Cañizares, J., Ziarsolo, P., Esteras, C., Mir, G., Nuez, F., ... Picó, M. B. (2011). Melon transcriptome characterization: Simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms discovery for high throughput genotyping across the species. *The Plant Genome Journal*, 4(2), 118-131.
- Blanca, J., Esteras, C., Ziarsolo, P., Pérez, D., Fernández-pedrosa, V., Collado, C., ... Picó, B. (2012). Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. *BMC Genomics*, 13(1), 280.
- Boissot, N., Mistral, P., Chareyron, V., Dogimont, C., & Pitrat, M. (2008). A new view on aphid resistance in melon: the role of *Aphis gossypii* variability. Cucurbitaceae 2008: Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae.

## Referencias

163-171.

- Boualem, A., Troadec, C., Camps, C., Lemhemdi, A., Morin, H., Sari, M. A., ... & Bendahmane, A. (2015). A cucurbit androecy gene reveals how unisexual flowers develop and dioecy emerges. *Science*, *350*(6261), 688-691.
- Bauchot, A. D., Mottram, D. S., Dodson, A. T., & John, P. (1998). Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe Charentais melon (cv. Vedrandais). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(11), 4787-4792.
- Brotman, Y., Silberstein, L., Kovalski, I., Klingler, J., Thompson, G., Katzir, N., & Perl-Treves, R. (2000). Linkage groups of *Cucumis melo*, including resistance gene homologues and known genes. In *VII Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding 510* (pp. 441-448).
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, *23*(19), 2633-2635
- Bruton, B. D., Garcia-Jimenez, J., Armengol, J., & Popham, T. W. (2000). Assessment of virulence of *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on *Cucumis melo*. *Plant Disease*, *84*(8), 907-913.
- Burger, Y., Saar, U., Katzir, N., Paris, H. S., Yeselson, Y., Levin, I., & Schaffer, A. A. (2002). A single recessive gene for sucrose accumulation in *Cucumis melo* fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *127*(6), 938-943.
- Burger, Y., Sa'ar, U., Distelfeld, A., Katzir, N., Yeselson, Y., Shen, S., & Schaffer, A. A. (2003). Development of sweet melon (*Cucumis melo*) genotypes combining high sucrose and organic acid content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *128*(4), 537-540.
- Burger, Y., Sa'ar, U., Paris, H. S., Lewinsohn, E., Katzir, N., Tadmor, Y., & Schaffer, A. A. (2006). Genetic variability for valuable fruit quality traits in *Cucumis melo*. *Israel Journal of Plant Sciences*, *54*(3), 233-242.
- Burger, Y., & Schaffer, A. A. (2007). The contribution of sucrose metabolism enzymes to sucrose accumulation in *Cucumis melo*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *132*(5), 704-712.

- Burger, Y., Paris, H. S., Cohen, R., Katzir, N., Tadmor, Y., Lewinsohn, E., & Schaffer, A. A. (2010). 3 Genetic Diversity of Cucumis Melo. *Horticultural reviews*, 36(1).
- Cáceres, A., Perpiñá, G., Ferriol, M., Picó, B., & Gisbert, C. (2017). New Cucumis rootstocks for melon: 'UPV-FA' and 'UPV-FMy'. *HortScience*, 52(5), 792-797.
- Castro, G., Perpiñá, G., Monforte, A. J., Picó, B., & Esteras, C. (2019). New melon introgression lines in a Piel de Sapo genetic background with desirable agronomical traits from dudaim melons. *Euphytica*, 215(10), 169.
- Cao, S., Chen, H., Zhang, C., Tang, Y., Liu, J., & Qi, H. (2016). Heterologous expression and biochemical characterization of two lipoxygenases in oriental melon, Cucumis melo var. makuwa Makino. *PloS one*, 11(4), e0153801.
- Cebolla-Cornejo, J., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J. M., Roselló, S., & Nuez, F. (2012). High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis*, 33(15), 2416-2423.
- Chaparro-Torres, L. A., Bueso, M. C., & Fernández-Trujillo, J. P. (2016). Aroma volatiles obtained at harvest by HS-SPME/GC-MS and INDEX/MS-E-nose fingerprint discriminate climacteric behaviour in melon fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2352-2365.
- Chen, H., Cao, S., Jin, Y., Tang, Y., & Qi, H. (2016). The relationship between CmADHs and the diversity of volatile organic compounds of three aroma types of melon (Cucumis melo). *Frontiers in physiology*, 7, 254.
- Chetelat, R. T., & Meglic, V. (2000). Molecular mapping of chromosome segments introgressed from Solanum lycopersicoides into cultivated tomato (Lycopersicon esculentum). *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2), 232-241.
- Cheng, S., Gutmann, B., Zhong, X., Ye, Y., Fisher, M. F., Bai, F., ... & Liu, X. (2016). Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *The Plant Journal*, 85(4), 532-547.
- Cizik, B. (1952). Ozar ha-Zemahim [Treasury of plants]. *Herzliyya: B. Cizik*, 10-16.
- Clayberg, C. D. (1992). Interaction and linkage test of flesh colour genes in Cucumis melo L. *Cucurbit Genet. Coop*, 15, 53.
- Cohen, S., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Itkin, M., Portnoy, V., Sa'ar, U., ... Aharoni, A. (2012). Co-mapping studies of QTLs for fruit acidity and candidate genes of organic acid

## Referencias

- metabolism and proton transport in sweet melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and applied genetics*, 125(2), 343–353.
- Cohen, S., Itkin, M., Yeselson, Y., Tzuri, G., Portnoy, V., Harel-Baja, R., ... Bar, E. (2014). The PH gene determines fruit acidity and contributes to the evolution of sweet melons. *Nature communications*, 5, 4026.
- Cohen, H., Dong, Y., Szymanski, J., Lashbrooke, J., Meir, S., Almekias-Siegl, E., ... & Aharoni, A. (2019). A Multilevel Study of Melon Fruit Reticulation Provides Insight into Skin Ligno-Suberization Hallmarks. *Plant physiology*, 179(4), 1486-1501.
- Colla, G., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Massa, D., Salerno, A., & Rea, E. (2006). Yield, fruit quality and mineral composition of grafted melon plants grown under saline conditions. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(1), 146-152.
- Cuevas, H. E., Staub, J. E., Simon, P. W., Zalapa, J. E., & McCreight, J. D. (2008). Mapping of genetic loci that regulate quantity of beta-carotene in fruit of US Western Shipping melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and applied genetics*, 117(8), 1345–1359.
- Dahmani-Mardas, F., Troadec, C., Boualem, A., Leve<sup>^</sup>que, S., Alsadon, A. A., Aldoss, A. A., ... & Bendahmane, A. (2010). Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PloS one*, 5(12), e15776.
- Dai, N., Cohen, S., Portnoy, V., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Pompan-Lotan, M., ... & Karchi, H. (2011). Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant molecular biology*, 76(1-2), 1-18.
- Danin-Poleg, Y., Reis, N., Tzuri, G., & Katzir, N. (2001). Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), 61-72.
- Danin-Poleg, Y., Tadmor, Y., Tzuri, G., Reis, N., Hirschberg, J., & Katzir, N. (2002). Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. *Euphytica*, 125(3), 373–384.
- Davey WJ, Hohenlohe PA, Etter PD (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 12:499-510.
- Deleu, W., Esteras, C., Roig, C., González-To, M., Fernández-Silva, I., González-Ibeas, D., ... Garcia-Mas, J. (2009). A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. *BMC Plant Biology*, 9(1), 90.

- Deschamps, S., & Campbell, M. A. (2010). Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Molecular breeding*, 25(4), 553-570.
- Díaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., ... Monforte, A. J. (2011). A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, 11(1), 111.
- Díaz, A., Zarouri, B., Fergany, M., Eduardo, I., Álvarez, J. M., Picó, B., & Monforte, A. J. (2014). Mapping and introgression of QTL involved in fruit shape transgressive segregation into 'Piel de Sapo' melon (*Cucumis melo* L.). *PLoS One*, 9(8), e104188.
- Díaz, A., Forment, J., Argyris, J. M., Fukino, N., Tzuri, G., Harel-Beja, R., ... Monforte, A. J. (2015). Anchoring the consensus ICuGI genetic map to the melon (*Cucumis melo* L.) genome. *Molecular Breeding*, 35(10), 188.
- Díaz, A., Martín-Hernández, A. M., Dolcet-Sanjuan, R., Garcés-Claver, A., Álvarez, J. M., Garcia-Mas, J., ... Monforte, A. J. (2017). Quantitative trait loci analysis of melon (*Cucumis melo* L.) domestication-related traits. *Theoretical and applied genetics*, 130(9), 1837–1856.
- Dogimont, C. (2011). 2011 Gene List for Melon. *Cucurbit Genetics Cooperative Report 33-34*, 104–133.
- Dos-Santos, N., Bueso, M. C., & Fernández-Trujillo, J. P. (2013). Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. *Food research international*, 54(2), 1801-1812.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39-40.
- Dubey, V. S., Bhalla, R., & Luthra, R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of biosciences*, 28(5), 637-646.
- Duval, M., Hsieh, T. F., Kim, S. Y., & Thomas, T. L. (2002). Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant molecular biology*, 50(2), 237-248.
- Eduardo, I., Arús, P., & Monforte, A. J. (2005). Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theoretical and applied genetics*, 112(1), 139-148.

## Referencias

- Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A. J., Obando, J., Fernández-Trujillo, J. P., Martínez, J. A., ... van der Knaap, E. (2007). Estimating the genetic architecture of fruit quality traits in melon using a genomic library of near isogenic lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(1), 80–89.
- Eduardo, I., Chietera, G., Pirona, R., Pacheco, I., Troglio, M., Banchi, E., ... & Pozzi, C. (2013). Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genetics & Genomes*, 9(1), 189-204.
- El Hadi, M. A. M., Zhang, F. J., Wu, F. F., Zhou, C. H., & Tao, J. (2013). Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*, 18(7), 8200-8229.
- El-Sharkawy, I., Manríquez, D., Flores, F.B., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A. and Pech, J.C. (2005) Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, 59, 345–362.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Pol, J. A., Kawamoto, K., Buckler E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6, e19379.
- Endl, J., Achigan-Dako, E. G., Pandey, A. K., Monforte, A. J., Pico, B., & Schaefer, H. (2018). Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. *American Journal of Botany*, 105(10), 1662–1671.
- Eshed, Y., & Zamir, D. (1994). Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble-solids yield of tomato hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(6-7), 891-897.
- Essafi, A., Díaz-Pendón, J. A., Moriones, E., Monforte, A. J., Garcia-Mas, J., & Martín-Hernández, A. M. (2009). Dissection of the oligogenic resistance to Cucumber mosaic virus in the melon accession PI 161375. *Theoretical and applied genetics*, 118(2), 275-284.
- Esquinas-Alcázar J. (1981) Genetic resources of tomatoes and wild relatives. A global report. IBPGR, Rome, Italy.
- Esteras, C., Lunn, J., Sulpice, R., Blanca, J., Garcia-Mas, J., Pitrat, M., ... & Picó, B. (2009). Phenotyping a highly diverse core melon collection to be screened using Ecotilling. *Plant Genomics Eur Meet (Plant Gem), Lisbon (Portugal), 2009*, 214.

- Esteras, C., Nuez, F., Picó, B., YiHong, W., Behera, T. K., & Kole, C. (2011). Genetic diversity studies in Cucurbits using molecular tools. *Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits*, 2(1), 140-198.
- Esteras, C., Formisano, G., Roig, C., Díaz, A., Blanca, J., Garcia-Mas, J., ... Picó, B. (2013). SNP genotyping in melons: Genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(5), 1285–1303.
- Esteras, C., Rambla, J. L., Sánchez, G., López-Gresa, M. P., González-Mas, M. C., Fernández-Trujillo, J. P., ... Picó, M. B. (2018). Fruit flesh volatile and carotenoid profile analysis within the *Cucumis melo* L. species reveals unexploited variability for future genetic breeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), 3915–3925.
- Ezura, H., & Owino, W. O. (2008). Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. *Plant Science*, 175(1-2), 121-129.
- Fallik, E., Alkali-Tuvia, S., Horev, B., Copel, A., Rodov, V., Aharoni, Y., ... & Schulz, H. (2001). Characterisation of ‘Galia’ melon aroma by GC and mass spectrometric sensor measurements after prolonged storage. *Postharvest biology and technology*, 22(1), 85-91.
- Fan, J. B., Chee, M. S., & Gunderson, K. L. (2006). Highly parallel genomic assays. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 632.
- FAOSTAT. (2015). *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database*. Retrieve from <http://faostat.fao.org/>. [Access 30 March 2016].
- FAOSTAT. (2017). *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database*. Retrieve from <http://faostat3.fao.org/> [Access on 14 April 2019].
- Farr, D. F., Miller, M. E., & Bruton, B. D. (1998). *Rhizopycnis vagum* gen. et sp. nov., a new coelomycetous fungus from roots of melons and sugarcane. *Mycologia*, 90(2), 290-296.
- Feder, A., Burger, J., Gao, S., Lewinsohn, E., Katzir, N., Schaffer, A. A., ... & Fei, Z. (2015). A Kelch domain-containing F-Box coding gene negatively regulates flavonoid accumulation in muskmelon. *Plant physiology*, 169(3), 1714–1726.
- Fernández-Silva, I., Eduardo, I., Blanca, J., Esteras, C., Picó, B., Nuez, F., ... Monforte, A. J. (2008a). Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(1), 139–150.
- Fernández-Silva, I., Moreno, E., Eduardo, I., Arús, P., Álvarez, J. M., & Monforte, A. J. (2008b). On the genetic control of heterosis for fruit shape in melon (*Cucumis melo* L.).



## Referencias

- Journal of heredity*, 100(2), 229-235.
- Fernández-Silva, I., Moreno, E., Essafi, A., Fergany, M., Garcia-Mas, J., Martín-Hernandez, A. M., ... & Monforte, A. J. (2010). Shaping melons: agronomic and genetic characterization of QTLs that modify melon fruit morphology. *Theoretical and applied genetics*, 121(5), 931-940.
- Fernández-Trujillo, J. P., Obando, J., Martínez, J. A., Alarcón, A. L., Eduardo, I., Arús, P., & Monforte, A. J. (2007). Mapping fruit susceptibility to postharvest physiological disorders and decay using a collection of near-isogenic lines of melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(5), 739-748.
- Fernández-Trujillo, J. P., Picò, M. B., Garcia-Mas, J., Alvarez, J. M., & Monforte, A. J. (2011). Breeding for fruit quality in melon. In: M. A. Jenks & P. J. Bebeli (Eds.), *Breeding for Fruit Quality* (pp. 261-278). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Fita, A., Picó, B., Monforte, A. J., & Nuez, F. (2008). Genetics of root system architecture using near-isogenic lines of melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(3), 448-458.
- Flores, F., Martínez-Madrid, M. C., Sánchez-Hidalgo, F. J., & Romojaro, F. (2001a). Differential rind and pulp ripening of transgenic antisenseACC oxidase melon. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(1), 37-43.
- Flores, F., Romojaro, F., Ben Amor, M., Pech, J. C., & Latché, A. (2001b). Differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways of ethylene-suppressed cantaloupe melons. *Acta Horticulturae*, 553, 151-153.
- Flores, F., El Yahyaoui, F., De Billerbeck, G., Romojaro, F., Latche, A., Bouzayen, M., ... & Ambid, C. (2002). Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *Journal of experimental botany*, 53(367), 201-206.
- Fredes, A., Sales, C., Barreda, M., Valcárcel, M., Roselló, S., & Beltrán, J. (2016). Quantification of prominent volatile compounds responsible for muskmelon and watermelon aroma by purge and trap extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry determination. *Food chemistry*, 190, 689-700.
- Freilich, S., Lev, S., Gonda, I., Reuveni, E., Portnoy, V., Oren, E., ... & Wissotsky, G. (2015). Systems approach for exploring the intricate associations between sweetness, color and aroma in melon fruits. *BMC plant biology*, 15(1), 71.

- Fukino, N., Ohara, T., Monforte, A. J., Sugiyama, M., Sakata, Y., Kuniyama, M., & Matsumoto, S. (2008). Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(1), 165–175.
- Gabriel, S., Ziaugra, L., Tabbaa, D. (2009). SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Current Protocols in Human Genetics*, 2(1), 2–12.
- Galpaz, N., Burger, Y., Lavee, T., Tzuri, G., Sherman, A., Melamed, T., ... & Shimoni-Shor, E. (2013). Genetic and chemical characterization of an EMS induced mutation in Cucumis melo CRTISO gene. *Archives of biochemistry and biophysics*, 539(2), 117-125.
- Galpaz, N., Gonda, I., Shem-Tov, D., Barad, O., Tzuri, G., Lev, S., ... & Harel-Beja, R. (2018). Deciphering genetic factors that determine melon fruit-quality traits using RNA-Seq-based high-resolution QTL and eQTL mapping. *The Plant Journal*, 94(1), 169-191.
- García, E., Jamilena, M., Alvarez, J. I., Arnedo, T., Oliver, J. L., & Lozano, R. (1998). Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6-7), 878-885.
- García-Mas, J., Oliver, M., Gomez-Paniagua, H., & De Vicente, M. C. (2000). Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5-6), 860-864.
- García-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., ... Alioto, T. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11872-11877.
- Garzo, E., Soria, C., Gomez-Guillamon, M. L., & Fereres, A. (2002). Feeding behavior of *Aphis gossypii* on resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). *Phytoparasitica*, 30(2), 129-140.
- Giner, A., Pascual, L., Bourgeois, M., Gyetvai, G., Rios, P., Picó, B., ... & Martín-Hernández, A. M. (2017). A mutation in the melon Vacuolar Protein Sorting 41 prevents systemic infection of Cucumber mosaic virus. *Scientific reports*, 7(1), 10471.
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The plant cell*, 16(suppl 1), S170-S180.
- Giovannoni, J. J. (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current opinion in plant biology*, 10(3), 283-289.

## Referencias

- Gómez-Guillamon, M & Álvarez, J. (2016). Melón. En: J. Ruiz de Galarreta, J. Prohens, & R. Tierno. *Las variedades locales en la mejora genética de plantas* (pp. 427-439). Vitoria, Gobierno Vasco: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco.
- Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A. A., ... & Lewinsohn, E. (2010). Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *Journal of experimental botany*, 61(4), 1111-1123.
- Gonda, I., Lev, S., Bar, E., Sikron, N., Portnoy, V., Davidovich-Rikanati, R., ... Huang, M. (2013). Catabolism of l-methionine in the formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *The Plant Journal*, 74(3), 458-472.
- Gonda, I., Burger, Y., Schaffer, A. A., Ibdah, M., Tadmor, Y. A., Katzir, N., ... & Lewinsohn, E. (2016). Biosynthesis and perception of melon aroma. *Biotechnology in Flavor Production*, 281-305.
- Gonda, I., Davidovich-Rikanati, R., Bar, E., Lev, S., Jhirad, P., Meshulam, Y., ... & Tadmor, Y. (2018). Differential metabolism of L-phenylalanine in the formation of aromatic volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Phytochemistry*, 148, 122-131.
- González, M., Xu, M., Esteras, C., Roig, C., Monforte, A. J., Troadec, C., ... & Picó, B. (2011). Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de Sapo melons. *BMC Research Notes*, 4(1), 289.
- González-Ibeas, D., Blanca, J., Roig, C., González-To, M., Picó, B., Truniger, V., ... & Nuez, F. (2007). MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC genomics*, 8(1), 306.
- González-Ibeas, D., Cañizares, J., & Aranda, M. A. (2012). Microarray analysis shows that recessive resistance to Watermelon mosaic virus in melon is associated with the induction of defense response genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 107-118.
- Gonzalo, M. J., Oliver, M., Garcia-Mas, J., Monfort, A., Dolcet-Sanjuan, R., Katzir, N., ... Monforte, A. J. (2005). Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 802-811.
- Gonzalo, M. R., & Monforte, A. J. (2017). Genetic mapping of complex traits in cucurbits. In: R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas. (Eds.), *Genetics and genomics of cucurbitaceae* (Vol. 20, pp. 269-290). Cham, Switzerland: Springer Nature.
- Gonzalo, M. J., Díaz, A., Dhillon, N. P. S., Reddy, U. K., Picó, M. B., & Monforte, A. J. (2019).

- Re-evaluation of the role of Indian germplasm as center of melon diversification based on genotyping-by-sequencing analysis. *BMC Genomics*, 20(1), 448.
- Goulet, C., Kamiyoshihara, Y., Lam, N. B., Richard, T., Taylor, M. G., Tieman, D. M., & Klee, H. J. (2015). Divergence in the enzymatic activities of a tomato and *Solanum pennellii* alcohol acyltransferase impacts fruit volatile ester composition. *Molecular plant*, 8(1), 153-162.
- Gramazio, P., Prohens, J., Plazas, M., Mangino, G., Herraiz, F. J., & Vilanova, S. (2017). Development and genetic characterization of advanced backcross materials and an introgression line population of *Solanum incanum* in a *S. melongena* background. *Frontiers in plant science*, 8, 1477.
- Grant, M. (2007). *Anthimus: on the observance of foods. Totnes: Prospect Books*, 68-71.
- Gubler, W. D., & Grogan, R. G. (1982). Factors affecting sudden wilt of melon in California. In *Phytopathology* (Vol. 72, No. 7, pp. 986-986). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC.
- Guiu-Aragónés, C., Monforte, A. J., Saladié, M., Corrêa, R. X., Garcia-Mas, J., & Martín-Hernández, A. M. (2014). The complex resistance to cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in the melon accession PI161375 is governed by one gene and at least two quantitative trait loci. *Molecular breeding*, 34(2), 351-362.
- Guo, Y., & Gan, S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46(4), 601-612.
- Guo, X., Xu, J., Cui, X., Chen, H., & Qi, H. (2017). iTRAQ-based protein profiling and fruit quality changes at different development stages of oriental melon. *BMC plant biology*, 17(1), 28.
- Gur, A., Gonda, I., Portnoy, V., Tzuri, G., Chayut, N., Cohen, S., ... KatziR, N. (2017). Genomic aspects of melon fruit quality. In: R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas. (Eds.), *Genetics and genomics of cucurbitaceae* (Vol. 20, pp. 377-408). Cham, Switzerland: Springer Nature.
- Hadfield KA, Bennett AB. (1998). Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiol*, 117(2):337–343
- Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Lotan-Pompan, M., Lev, S., Cohen, S., ... Katzir, N. (2010). A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theoretical and Applied Genetics*,

## Referencias

121(3), 511–533.

- Hendriks, J. H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., & Geigenberger, P. (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology*, 133(2), 838-849.
- Hibara, K. I., Takada, S., & Tasaka, M. (2003). CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *The Plant Journal*, 36(5), 687-696.
- Hughes, M. B. (1948). The inheritance of two characters of *Cucumis melo* and their interrelationship. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 52, 399-402.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., ... & Tadmor, Y. (2006). Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry*, 67(15), 1579-1589.
- Iman, M. K., Abo-Bakr, M. A., & Hanna, H. Y. (1972). Inheritance of some economic characters in crosses between sweet melon and snake cucumber. In *Inheritance of qualitative characters. Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 3, 363-380.
- INE. (2019). *Instituto Nacional de Estadística*. Buscado en <http://www.ine.es/> [Acceso el 9 de Septiembre de 2019]
- Jang, Y., Huh, Y. C., Park, D. K., Mun, B., Lee, S., & Um, Y. (2014). Greenhouse Evaluation of Melon Rootstock Resistance to *Monosporascus* Root Rot and Vine Decline as Well as of Yield and Fruit Quality in Grafted ‘Inodorus’ Melons. *원예과학기술지*, 32(5), 614-622.
- Janick, J., Paris, H. S., & Parrish, D. C. (2007). The cucurbits of Mediterranean antiquity: Identification of taxa from ancient images and descriptions. *Annals of Botany*, 100(7), 1441–1457.
- Jeffrey, C. (1980). A review of the Cucurbitaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*, 81(3), 233–247.
- Jelitto, T., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Hajirezeai, M., & Stitt, M. (1992). Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol. *Planta*, 188(2), 238-244.

- Jeuken MJW & Lindhout P. (2004). The development of lettuce backcrossing inbred lines (BILs) for exploitation of the *Lactuca saligna* (wild lettuce) germoplasm. *Theor Appl Genet* 109:394-401.
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U., & Cregan, P. B. (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(8), 1282-1290.
- Kerje, T., & Grum, M. (2000). The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. *Acta Horticulturae*, 510, 37–44.
- Kim, H. A., Shin, A. Y., Lee, M. S., Lee, H. J., Lee, H. R., Ahn, J., ... & Kwon, S. Y. (2016). De novo transcriptome analysis of *Cucumis melo* L. var. *makuwa*. *Molecules and cells*, 39(2), 141.
- Kirkbride, J. H. (1993). *Biosystematic monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae)*. Boone, USA: Parkway.
- Kocyan, A., Zhang, L. B., Schaefer, H., Renner, S. S. (2007). A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(2), 553–577.
- Koehler, P. E., & Kays, S. J. (1991). Sweet potato flavor: Quantitative and qualitative assessment of optimum sweetness. *Journal of food quality*, 14(3), 241-249.
- Kong, Q., Xiang, C., Yu, Z., Zhang, C., Liu, F., Peng, C., & Peng, X. (2007). Mining and charactering microsatellites in *Cucumis melo* expressed sequence tags from sequence database. *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 281-283.
- Korff MV, Wang H, Leon J, Pillen K (2004) Development of candidate introgression using exotic barley accession (*Hordeum vulgare* ssp. *Spontaneum*) as donor. *Theor Appl Genet* 109:1736-1745.
- Kourkoutas, D., Elmore, J. S., & Mottram, D. S. (2006). Comparison of the volatile compositions and flavour properties of cantaloupe, Galia and honeydew muskmelons. *Food Chemistry*, 97(1), 95-102.
- Kovats, V. E. (1958). Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41(7), 1915-1932.

## Referencias

- Kubicki, B. (1962). Polyploidy in muskmelons (*Cucumis melo* L.) and cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Genetica Polonica*, 3, 161-179.
- Lázaro, A., Fernández, I. C., Borrero, M. J., Cabello, F., López-Sesé, A. I., Gómez-Guillamón, M. L., & Picó, B. (2017). Agromorphological genetic diversity of Spanish traditional melons. *Genetic resources and crop evolution*, 64(7), 1687-1706.
- Lebeda, A., & Sedláková, B. (2006). Identification and survey of cucurbit powdery mildew races in Czech populations. *Cucurbitaceae 2006, Asheville, North Carolina, USA, 17-21 September 2006*, 444-452.
- Leida, C., Moser, C., Esteras, C., Sulpice, R., Lunn, J. E., de Langen, F., ... Picó, B. (2015). Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genetics*, 16(1), 28.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Meir, A., Zamir, D., & Tadmor, Y. (2005). Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3142-3148.
- Li, Y., Qi, H., Jin, Y., Tian, X., Sui, L., & Qiu, Y. (2016). Role of ethylene in biosynthetic pathway of related-aroma volatiles derived from amino acids in oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Scientia horticulturae*, 201, 24-35.
- Liao, X., Zhao, Y., Kong, X., Khan, A., Zhou, B., Liu, D., ... & Zhou, R. (2018). Complete sequence of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) mitochondrial genome and comparative analysis with the mitochondrial genomes of other plants. *Scientific reports*, 8(1), 12714.
- Lignou, S., Parker, J. K., Baxter, C., & Mottram, D. S. (2014). Sensory and instrumental analysis of medium and long shelf-life Charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* L.) harvested at different maturities. *Food chemistry*, 148, 218-229.
- Lin, Z., Hong, Y., Yin, M., Li, C., Zhang, K., & Grierson, D. (2008). A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *The Plant Journal*, 55(2), 301-310.
- Lira-Saade, R. (1995). *Estudios taxonomicos ecogeograficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de importancia económica* (No. SB351. C8. L57 1995.). Roma, Italia: International Plant Genetic Resources Institute.

- Liu, S., Zhou, R., Dong, Y., Li, P., & Jia, J. (2006). Development, utilization of introgression lines using a synthetic wheat as donor. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(7), 1360-1373.
- Liu, W. W., Qi, H. Y., Xu, B. H., Li, Y., Tian, X. B., Jiang, Y. Y., & Xu, X. F. (2012). Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Postharvest Biology and Technology*, 67, 75-83.
- Liu, B., Ren, J., Zhang, Y., An, J., Chen, M., Chen, H., ... & Ren, H. (2015). A new grafted rootstock against root-knot nematode for cucumber, melon, and watermelon. *Agronomy for sustainable development*, 35(1), 251-259.
- Liu, X. Y., Wang, P. P., Wu, Y. F., Cheng, A. X., & Lou, H. X. (2018). Cloning and Functional Characterization of Two 4-Coumarate: CoA Ligase Genes from *Selaginella moellendorffii*. *Molecules*, 23(3), 595.
- López De Heredia Larrea, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64, 7–31.
- Lucchetta, L., Manriquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F. B., Sanchez-Bel, P., Zouine, M., ... & Latché, A. (2007). Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 5213-5220.
- Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F. B., El-Yahyaoui, F., Regad, F., Bouzayen, M., ... & Pech, J. C. (2006). Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant molecular biology*, 61(4-5), 675.
- Marco-Sola, S., Sammeth, M., Guigó, R., & Ribeca, P. (2012). The GEM mapper: fast, accurate and versatile alignment by filtration. *Nature methods*, 9(12), 1185.
- Mascarell-Creus, A., Cañizares, J., Vilarrasa-Blasi, J., Mora-García, S., Blanca, J., Gonzalez-Ibeas, D., ... & López-Bigas, N. (2009). An oligo-based microarray offers novel transcriptomic approaches for the analysis of pathogen resistance and fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC genomics*, 10(1), 467.
- Matus I, Corey A, Filichkin T (2003) Development and characterization of recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a



## Referencias

- source of donor allele in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Genome* 46:1010-1023.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., ... & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research*, 20(9), 1297-1303.
- Mazzini, I. (Ed.). (1984). *De observantia ciborum* (pp. 42-43). Rome: Giorgio Bretschneider.
- Melogene. <https://melogene.upv.es/>. Accessed March 2016.
- Melonomics. <https://melonomics.net/>. Accessed March 2016.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31.
- Miki, T., Yamamoto, M., Nakagawa, H., Ogura, N., Mori, H., Imaseki, H., & Sato, T. (1995). Nucleotide sequence of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from melon fruits. *Plant physiology*, 107(1), 297.
- Mliki, A., Staub, J. E., Zhangyong, S., & Ghorbel, A. (2001). Genetic diversity in melon (*Cucumis melo* L.): an evaluation of African germplasm. *Genetic resources and crop evolution*, 48(6), 587-597.
- Monforte, A. J., & Tanksley, S. D. (2000). Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome*, 43(5), 803-813.
- Monforte, A. J., Garcia-Mas, J., & Arus, P. (2003). Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant breeding*, 122(2), 153-157.
- Monforte, A. J., Oliver, M., Gonzalo, M. J., Alvarez, J. M., Dolcet-Sanjuan, R., & Arús, P. (2004). Identification of quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 108(4), 750–758.
- Monforte, A. J., Díaz, A., Caño-Delgado, A., & van der Knaap, E. (2014). The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: lessons from tomato and melon. *Journal of experimental botany*, 65(16), 4625-4637.
- Morales, M., Roig, E., Monforte, A. J., Arus, P., & Garcia-Mas, J. (2004). Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.). *Genome*, 47(2), 352-360.

- Moreno, E., Obando, J. M., Dos-Santos, N., Fernández-Trujillo, J. P., Monforte, A. J., & Garcia-Mas, J. (2008). Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(4), 589-602.
- Nam, N. N., Kwon, Y., Park, J., & Sim, S. (2019). Development of a core set of SSR markers for cultivar identification and seed purity tests in oriental melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa*). *Horticultural Science and Technology*, 37(1), 119-129.
- Namiki, F., Shiomi, T., Nishi, K., Kayamura, T., & Tsuge, T. (1998). Pathogenic and genetic variation in the Japanese strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology*, 88(8), 804-810.
- Naudin, C. (1859). Essais d'une monographie des espèces et des variétés du genre *Cucumis*. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique*, 11, 5-87.
- Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., ... & Garcia-Mas, J. (2006). An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal*, 48(3), 452-462.
- Nieto, C., Piron, F., Dalmais, M., Marco, C. F., Moriones, E., Gómez-Guillamón, M. L., ... & Bendahmane, A. (2007). EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC plant biology*, 7(1), 34.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J. K., Kubo, Y., Bennett, K. A., Wangjin, L., ... & Bouzayen, M. (2007). Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1281-1290.
- Nuez F, Carrillo JM, Ron AM (2000) Introducción. In: Nuez F, Carrillo JM (ed) Los marcadores genéticos en la mejora vegetal, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España pp 23-89.
- Obando, J., Fernández-Trujillo, J. P., Martínez, J. A., Alarcón, A. L., Eduardo, I., Arús, P., & Monforte, A. J. (2008). Identification of melon fruit quality quantitative trait loci using near-isogenic lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1), 139-151.
- Obando-Ulloa, J. M., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A. J., & Fernández-Trujillo, J. P. (2008). Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit: 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 27-37.
- Obando-Ulloa, J. M., Eduardo, I., Monforte, A. J., & Fernández-Trujillo, J. P. (2009).

## Referencias

- Identification of QTLs related to sugar and organic acid composition in melon using near-isogenic lines. *Scientia horticulturae*, 121(4), 425-433.
- Obando-Ulloa, J. M., Ruiz, J., Monforte, A. J., & Fernández-Trujillo, J. P. (2010). Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.). *Food chemistry*, 118(3), 815-822.
- Oliver, M., Garcia-Mas, J., Cardús, M., Pueyo, N., López-Sesé, A. I., Arroyo, M., ... de Vicente, M. C. (2001). Construction of a reference linkage map for melon. *Genome*, 44(5), 836–845.
- Pan, Y., Wang, Y., McGregor, C., Liu, S., Luan, F., Gao, M., & Weng, Y. (2019). Genetic architecture of fruit size and shape variation in cucurbits: a comparative perspective. *Theoretical and Applied Genetics*, 1-21.
- Pangalo, K. I. (1958). Melons [Dyini]. *Kishinev (MD): State publisher [Gosudarstvennoe izdatel'stvo]*, 350-433.
- Paris, M. K., Zalapa, J. E., McCreight, J. D., & Staub, J. E. (2008). Genetic dissection of fruit quality components in melon (*Cucumis melo* L.) using a RIL population derived from exotic×elite US Western Shipping germplasm. *Molecular Breeding*, 22(3), 405-419.
- Paris, H. S., Amar, Z., Lev, E. (2012). Medieval history of the duda'im melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 66(3), 276–284.
- Park, S. O., Hwang, H. Y., & Crosby, K. M. (2009). A genetic linkage map including loci for male sterility, sugars, and ascorbic acid in melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1), 67-76.
- Pascual, L., Yan, J., Pujol, M., Monforte, A. J., Picó, B., & Martín-Hernández, A. M. (2019). *CmVPS41* Is a General Gatekeeper for Resistance to *Cucumber Mosaic Virus* Phloem Entry in Melon. *Frontiers in plant science*, 10, 1219. doi:10.3389/fpls.2019.01219
- Paterson, A. H., Lander, E. S., Hewitt, J. D., Peterson, S., Lincoln, S. E., & Tanksley, S. D. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335(6192), 721.
- Payne, R., & Blunt, W. (1966). Hortulus, Walahfrid Strabo. *Pittsburgh: Hunt Botanical Library*, 38-41.
- Pech, J. C., Bouzayen, M., & Latché, A. (2008). Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science*, 175(1-2),

114-120.

- Perchepped, L., & Pitrat, M. (2004). Polygenic inheritance of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in melon. *Phytopathology*, *94*(12), 1331-1336.
- Perchepped, L., Dogimont, C., & Pitrat, M. (2005). Strain-specific and recessive QTLs involved in the control of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in a recombinant inbred line population of melon. *Theoretical and applied genetics*, *111*(1), 65-74.
- Pereira, L., Ruggieri, V., Pérez, S., Alexiou, K. G., Fernández, M., Jahrmann, T., ... Garcia-Mas, J. (2018). QTL mapping of melon fruit quality traits using a high-density GBS-based genetic map. *BMC plant biology*, *18*(1), 324.
- Pereira L. (2018). Genetic dissection of fruit quality and ripening traits in melon. Barcelona (Doctoral Thesis). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. Retrieved from <https://ddd.uab.cat/record/201529>
- Périn, C., Hagen, L., De Conto, V., Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Portnoy, V., ... Pitrat, M. (2002a). A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theoretical and Applied Genetics*, *104*(6-7), 1017-1034.
- Périn, C., Gomez-Jimenez, M., Hagen, L., Dogimont, C., Pech, J. C., Latché, A., ... & Lelièvre, J. M. (2002b). Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiology*, *129*(1), 300-309.
- Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A. J., & Picó, B. (2016). A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits. *BMC plant biology*, *16*(1), 154.
- Perpiñá, G., Cebolla-Cornejo, J., Esteras, C., Monforte, A. J., & Picó, B. (2017). ‘MAK-10’: A Long Shelf-life Charentais Breeding Line Developed by Introgression of a Genomic Region from Makuwa Melon. *HortScience*, *52*(11), 1633-1638.
- Pitrat, M., Hanelt, P., & Hammer, K. (2000). Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. *Acta Horticulturae*, *510*, 29–36.
- Pitrat, M. (2008). Melon (*Cucumis melo* L.) In: J. Prohens, & F. Nuez (Eds.), *Hand-book of crop breeding vegetables* (Vol 1., pp. 283-315). New York, USA: Springer.
- Pitrat, M. (2013). Phenotypic diversity in wild and cultivated melons (*Cucumis melo*). *Plant*

## Referencias

- Biotechnology*, 30(3), 273–278.
- Pitrat, M. (2017). Melon genetic resources: phenotypic diversity and horticultural taxonomy. In: R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas (Eds.), *Genetics and genomics of cucurbitaceae* (Vol. 20, pp. 25-59). Cham, Switzerland: Springer Nature.
- Pollack, F. G., & Uecker, F. A. (1974). *Monosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in *Cantaloupe* roots. *Mycologia*, 66, 346–349.
- Portnoy, V., Benyamini, Y., Bar, E., Harel-Beja, R., Gepstein, S., Giovannoni, J. J., ... & Katzir, N. (2008). The molecular and biochemical basis for varietal variation in sesquiterpene content in melon (*Cucumis melo* L.) rinds. *Plant molecular biology*, 66(6), 647-661.
- Ramamurthy, R. K., & Waters, B. M. (2015). Identification of fruit quality and morphology QTLs in melon (*Cucumis melo*) using a population derived from *flexuosus* and *cantalupensis* botanical groups. *Euphytica*, 204(1), 163-177.
- Rambla, J. L., Medina, A., Fernández-del-Carmen, A., Barrantes, W., Grandillo, S., Cammareri, M., ... & Primo, J. (2017). Identification, introgression, and validation of fruit volatile QTLs from a red-fruited wild tomato species. *Journal of experimental botany*, 68(3), 429-442.
- Ramsay L.D., Jennings D.E., Kearsey MJ (1996) The construction of a substitution library of recombinant backcross lines in *Brassica oleraceae* for the precision mapping of quantitative trait loci. *Genome* 39:558-567.
- Rastogi, S., Kumar, R., Chanotiya, C. S., Shanker, K., Gupta, M. M., Nagegowda, D. A., & Shasany, A. K. (2013). 4-Coumarate: CoA ligase partitions metabolites for eugenol biosynthesis. *Plant and cell physiology*, 54(8), 1238-1252.
- Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. (2007). High-Resolution DNA melting analysis for single and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8:597-608.
- Ríos, P. (2015). Clonaje posicional y validación de un gen candidato para eth6.3, un QTL implicado en la maduración climatérica del fruto del melón (Tesis Doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. Recuperado de <https://ddd.uab.cat/record/166043>
- Ríos, P., Argyris, J., Vegas, J., Leida, C., Kenigswald, M., Tzuri, G., ... Monforte, A. J. (2017). ETHQV 6.3 is involved in melon climacteric fruit ripening and is encoded by a NAC domain transcription factor. *The Plant Journal*, 91(4), 671-683.

- Robinson, R.W., & Decker-Walters, D.S. (1997). *Cucurbits*. New York, USA: CAB International.
- Roig, C., Fita, A., Ríos, G., Hammond, J. P., Nuez, F., & Picó, B. (2012). Root transcriptional responses of two melon genotypes with contrasting resistance to *Monosporascus cannonballus* (Pollack et Uecker) infection. *BMC genomics*, *13*(1), 601.
- Rose, J. K., Hadfield, K. A., Labavitch, J. M., & Bennett, A. B. (1998). Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology*, *117*(2), 345-361.
- Rouphael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., & Colla, G. (2010). Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia horticulturae*, *127*(2), 172-179.
- Ruggieri, V., Alexiou, K. G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., ... Garcia-Mas J. (2018). An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. *Scientific Reports*, *8*(1), 8088.
- Sabato, D., Esteras, C., Grillo, O., Peña-Chocarro, L., Leida, C., Ucchesu, M., ... & Picó, B. (2019). Molecular and morphological characterisation of the oldest *Cucumis melo* L. seeds found in the Western Mediterranean Basin. *Archaeological and Anthropological Sciences*, *11*(3), 789–810.
- Saladié, M., Rose, J. K., Cosgrove, D. J., & Catalá, C. (2006). Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. *The Plant Journal*, *47*(2), 282-295.
- Saladié, M., Cañizares, J., Phillips, M. A., Rodriguez-Concepcion, M., Larrigaudière, C., Gibon, Y., ... & Garcia-Mas, J. (2015). Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. *BMC genomics*, *16*(1), 440.
- Sales, C., Cervera, M. I., Gil, R., Portolés, T., Pitarch, E., & Beltran, J. (2017). Quality classification of Spanish olive oils by untargeted gas chromatography coupled to hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization and metabolomics-based statistical approach. *Food chemistry*, *216*, 365-373.
- Sánchez, G., Martínez, J., Romeu, J., García, J., Monforte, A. J., Badenes, M. L., & Granell, A. (2014). The peach volatilome modularity is reflected at the genetic and environmental response levels in a QTL mapping population. *BMC plant biology*, *14*(1), 137.
- Sanseverino, W., Hénaff, E., Vives, C., Pinosio, S., Burgos-Paz, W., Morgante, M., ... &

## Referencias

- Casacuberta, J. M. (2015). Transposon insertions, structural variations, and SNPs contribute to the evolution of the melon genome. *Molecular biology and evolution*, 32(10), 2760-2774.
- Scaglione, D., Pinosio, S., Marroni, F., Di Centa, E., Fornasiero, A., Magris, G., ... & Morgante, M. (2019). Single primer enrichment technology as a tool for massive genotyping: a benchmark on black poplar and maize. *Annals of botany*.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The plant journal*, 54(4), 712-732.
- Spadafora, N. D., Cocetta, G., Cavaiuolo, M., Bulgari, R., Dhorajiwala, R., Ferrante, A., ... & Müller, C. T. (2019). A complex interaction between pre-harvest and post-harvest factors determines fresh-cut melon quality and aroma. *Scientific reports*, 9(1), 2745.
- Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14269–14273.
- Serra, O., Donoso, J. M., Picanol, R., Batlle, I., Howad, W., Eduardo, I., & Arus, P. (2016). Marker-assisted introgression (MAI) of almond genes into the peach background: a fast method to mine and integrate novel variation from exotic sources in long intergeneration species. *Tree genetics & genomes*, 12(5), 96.
- Serres-Giardi L & Dogimont C. Cucurbitaceae: proceedings of the Xth Eucarpia meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. In: Sari N, Solmaz I, Aras V (eds.). Adana: Cukurova University; 2012. p. 254–63.
- Shalit, M., Katzir, N., Tadmor, Y., Larkov, O., Burger, Y., Shalekhet, F., ... & Karchi, Z. (2001). Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 794-799.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Sherman, A., Eshed, R., Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Cohen, S., ... & Ophir, R. (2013). Combining bulk segregation analysis and microarrays for mapping of the pH trait in melon. *Theoretical and applied genetics*, 126(2), 349-358.

- Shin, A. Y., Kim, Y. M., Koo, N., Lee, S. M., Nahm, S., & Kwon, S. Y. (2017). Transcriptome analysis of the oriental melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa*) during fruit development. *PeerJ*, 5, e2834.
- Silberstein, L., Kovalski, I., Huang, R., Anagnostou, K., Jahn, M. M. K., & Perl-Treves, R. (1999). Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 79(1-2), 101-111.
- Stepansky, A., Kovalski, I., & Perl-Treves, R. (1999). Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution*, 217(3-4), 313-332.
- Szabó, Z., Gyulai, G., Humphreys, M., Horváth, L., Bittsánszky, A., Lágler, R., & Heszky, L. (2005). Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica*, 146(1-2), 87-94.
- Tadmor, Y., Burger, J., Yaakov, I., Feder, A., Libhaber, S. E., Portnoy, V., ... Katzir, N. (2010). Genetics of flavonoid, carotenoid, and chlorophyll pigments in melon fruit rinds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10722-10728.
- Tang, Y., Zhang, C., Cao, S., Wang, X., & Qi, H. (2015). The effect of CmLOXs on the production of volatile organic compounds in four aroma types of melon (*Cucumis melo*). *PLoS One*, 10(11), e0143567.
- Tanksley SD, Nelson JC (1996) Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet* 92:191-203.
- Thakur, H., Sharma, S., & Thakur, M. (2019). Recent trends in muskmelon (*Cucumis melo* L.) research: an overview. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(4), 533-547.
- Tian F, Li DJ, Fu Q, Zhu ZF, Fu YC, Wang XK, Sun CQ (2006) Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits. *Theor Appl Genet* 112:570-580.
- Tomason, Y., Nimmakayala, P., Levi, A., & Reddy, U. K. (2013). Map-based molecular diversity, linkage disequilibrium and association mapping of fruit traits in melon.



## Referencias

- Molecular breeding*, 31(4), 829-841.
- Torres, A. M., Monforte, A. J., Millan, T., & Šatović, Z. (2012). QTL Detection and Application to Plant Breeding. In *La genética de los caracteres cuantitativos en la mejora vegetal del siglo XXI*. Sociedad Española de Genética; Sociedad Española de Ciencias Hortícolas.
- Troutman, J. L., & Matejka, J. C. (1970). Three fungi associated with cantaloupe roots in Arizona. *Phytopathology*, 60.
- Tuan, P. A., Lee, J., Park, C. H., Kim, J. K., Noh, Y. H., Kim, Y. B., ... Park, S. U. (2019). Carotenoid Biosynthesis in Oriental Melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa*). *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(2), 77. doi:10.3390/foods8020077.
- Tzuri, G., Zhou, X., Chayut, N., Yuan, H., Portnoy, V., Meir, A., ... Fei, Z. (2015). A 'golden' SNP in CmOr governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*). *The Plant Journal*, 82(2), 267-279.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Urrutia, M., Bonet, J., Arús, P., & Monfort, A. (2015). A near-isogenic line (NIL) collection in diploid strawberry and its use in the genetic analysis of morphologic, phenotypic and nutritional characters. *Theoretical and applied genetics*, 128(7), 1261-1275.
- Vandersteen, J.C., Bayrak-Toydemir, P., Palais, R.A., Wittwer, C.T. (2007). Identifying common genetic variants by high-resolution melting. *Clin Chem* 53:1191-1198.
- Vegas, J., Garcia-Mas, J., & Monforte, A. J. (2013). Interaction between QTLs induces an advance in ethylene biosynthesis during melon fruit ripening. *Theoretical and applied genetics*, 126(6), 1531-1544.
- Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Conduro, C., Crinò, P., Romano, D., ... & Paratore, A. (2014). Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* var. *inodorus* H. Jacq.) in relation to different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 169, 118-124.
- Vogel, J. T., Tan, B. C., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11364-11373.
- Von Korff, M., Wang, H., León, J., & Pillen, K. (2004). Development of candidate introgression

- lines using an exotic barley accession (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) as donor. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(8), 1736-1745.
- Vossen, R. H., Aten, E., Roos, A., & den Dunnen, J. T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Human mutation*, 30(6), 860-866.
- Wang, Y. H., Thomas, C. E., & Dean, R. A. (1997). A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5-6), 791-798.
- Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., ... & Kruglyak, L. (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280(5366), 1077-1082.
- Wang, C., Gao, G., Cao, S., Xie, Q., & Qi, H. (2019). Isolation and functional validation of the CmLOX08 promoter associated with signalling molecule and abiotic stress responses in oriental melon, *Cucumis melo* var. *makuwa* Makino. *BMC plant biology*, 19(1), 75.
- Whitaker, T.W. & Davis, G.N. (1962). Cucurbits: botany, cultivation and utilization. New York: Interscience.
- Whitaker, T. W., & Bemis, W. P. (1976). Cucurbits *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita*, *Lagenaria* (*Cucurbitaceae*). (pp. 64-69). *Evolution of crop plants.*—Longman, London.
- Wu, S., Zhang, B., Keyhaninejad, N., Rodríguez, G. R., Kim, H. J., Chakrabarti, M., ... Pan, Y. (2018). A common genetic mechanism underlies morphological diversity in fruits and other plant organs. *Nature communications*, 9(1), 4734.
- Yahyaoui, F. E., Wongs-Aree, C., Latché, A., Hackett, R., Grierson, D., & Pech, J. C. (2002). Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *European Journal of Biochemistry*, 269(9), 2359-2366.
- Yamamoto, M., Miki, T., Ishiki, Y. et al. (1995). The synthesis of ethylene in melon fruit during the early stage of ripening. *Plant and Cell Physiology*, 36, 591–596.
- Yano, R., Nonaka, S., & Ezura, H. (2017). Melonet-DB, a grand RNA-Seq gene expression atlas in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant and Cell Physiology*, 59(1), e4-e4.
- Yashiro, K., Iwata, H., Akashi, Y., Tomita, K. O., Kuzuya, M., Tsumura, Y., & Kato, K. (2005). Genetic relationship among East and South Asian melon (*Cucumis melo* L.) revealed by

## Referencias

- AFLP analysis. *Breeding science*, 55(2), 197-206.
- Zalapa, J. E., Staub, J. E., McCreight, J. D., Chung, S. M., & Cuevas, H. (2007). Detection of QTL for yield-related traits using recombinant inbred lines derived from exotic and elite US Western Shipping melon germplasm. *Theoretical and applied genetics*, 114(7), 1185-1201.
- Zamir, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature reviews genetics*, 2(12), 983.
- Zhang, C., Yazhong, J., Liu, J., Tang, Y., Cao, S. & Qi, H. (2014). The phylogeny and expression profiles of the lipoxygenase (LOX) family genes in the melon (*Cucumis melo* L.) genome. *Scientia Horticulturae*, 170, 94-102.
- Zhang, C., Shao, Q., Cao, S. X., Tang, Y. F., Liu, J. Y., Jin, Y. Z., & Qi, H. Y. (2015). Effects of postharvest treatments on expression of three lipoxygenase genes in oriental melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Postharvest Biology and Technology*, 110, 229-238.
- Zhang, H., Wang, H., Yi, H., Zhai, W., Wang, G., & Fu, Q. (2016). Transcriptome profiling of *Cucumis melo* fruit development and ripening. *Horticulture research*, 3, 16014.
- Zhao, X., Guo, Y., Huber, D. J., & Lee, J. (2011). Grafting effects on postharvest ripening and quality of 1-methylcyclopropene-treated muskmelon fruit. *Scientia horticulturae*, 130(3), 581-587.
- Zhao, G., Lian, Q., Zhang, Z. *et al.* A comprehensive genome variation map of melon identifies multiple domestication events and loci influencing agronomic traits. *Nat Genet.* (2019) doi:10.1038/s41588-019-0522-8.
- Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z. H. (2006). SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(11), 3158-3170.
- Zhuang, F. Y., Chen, J. F., Staub, J. E., & Qian, C. T. (2004). Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR and RAPD marker analysis. *Plant Breeding*, 123(2), 167-172.