

**Máster en mejora genética vegetal.**  
**Trabajo final de máster**  
**Valencia, Septiembre 2019**

**Mapeo de alta resolución de un QTL  
implicado en el tamaño del fruto de melón  
(*Cucumis melo. L.*)**



**Autora:** Whitney Dagmar Jourdain Javier

**Directores:** Antonio José Monforte Gilabert  
María José Gonzalo Pascual

**Tutora:** Ana María Fita Fernández

# Agradecimiento

Después de un arduo período de dos años, escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo fin de máster. Ha sido un período de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, sino también a nivel personal. Escribir este trabajo ha tenido un gran impacto en mí y es por eso que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante este proceso.

## **A Dios,**

Infinitas gracias a Dios por haberme dado la sabiduría y el entendimiento para poder llegar al final de mi carrera, por proveerme de todo lo necesario para poder salir adelante y por ser siempre la base de todos mis proyectos.

## **A mis directores,**

Al **Dr. Antonio José Monforte Gilabert** y la **Dra. María José Gonzalo Pascual** por aceptarme para realizar esta tesis de máster bajo sus direcciones y por la acertada orientación, el soporte y discusión crítica que me han permitido un magnífico aprovechamiento en el trabajo realizado. También agradecer la paciencia y comprensión desde mis primeros pasos por el laboratorio.

## **A mi tutora,**

**Ana María Fita Fernández** por haber aceptado bondadosamente ser la tutora de este proyecto.

## **A los investigadores,**

Deseo agradecer a todos los investigadores que trabajan en el laboratorio de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP **Clara Pons**, **Carlos Romero**, por la ayuda brindada en los momentos que la he necesitado durante esta etapa de trabajo, y de forma especial a **Soledad Casal** por brindarme su invaluable apoyo y confianza durante esta importante etapa de mi vida y desarrollo profesional, y por ser una magnífica entusiasta y optimista cuando lo necesité.

## **Al MESCyT,**

Al **Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (MESCyT)** por haber financiado mis estudios de máster.

**A las escuelas,**

Al **Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV)**, al **Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)** y a la **Universidad Politécnica de Valencia (UPV)** por recibirme dentro de sus instalaciones.

**A Profesores,**

Agradecer a mis profesores del máster por todo lo aprendido durante estos dos años de carrera.

**A mis padres,**

El **Sr. Victor Jourdain**, **Sr. Victor Fría** y la **Sra. Juanita Javier** por la comprensión, comunicación constante y apoyo desde mi hermoso país República Dominicana. De forma muy especial, agradecer a mi madre por haberme después de Dios, guiado por el buen camino, ojalá existiera una palabra más grande que gracias para expresarle a Dios lo agradecida que estoy con él de que te haya puesto a ti como mi madre, te amo mami.

**A mis hermanos,**

Por su apoyo, sus consejos y sobre todo el amor siempre brindado, los amo.

**A mis tíos,**

La **Sra. Trinidad A. Javier**, la **Sra. Julissa Anthony**, la **Sra. María I. Peña** y el **Sr. Hilario Javier** por siempre estar presentes para mí.

**Mis abuelos,**

Por ese amor y entusiasmo cada vez que los escuchaba. Siempre tuve miedo de perder a un ser querido y mucho más perderlo estando lejos, pero sé querido abuelito que donde quiera que estés, te sientes muy orgulloso de mí, te amo infinitamente.

**A mis amigos,**

**Yanilca E. Mercedes**, **Emely S. Solano**, **Krysty M. Santos**, **Sandy N. Valdiviezo**, **Deysi Caballero**, **Arturo Morales**, **Celia De Priso**, agradecerles porque este proceso sin ustedes, sin su apoyo, pues simplemente no sería lo mismo.

¡INFINITAS GRACIAS!

# Resumen

El melón, (*Cucumis melo L.*), es una especie hortícola perteneciente a la familia de la Cucurbitaceae, de origen asiático. Esta especie se consume normalmente por sus frutos, siendo muy apreciado por su alta variabilidad morfológica. Este cultivo se conoce desde hace más de 4000 años y su domesticación es en la actualidad un tema de interés para los programas de mejora, dada que esta no ha sido investigada en detalle y la mayoría de los principales rasgos de domesticación, aun no son bien conocidos. En trabajos anteriores, tras un cruzamiento entre Piel de Sapo (P) y la accesión silvestre Trigonus (T) se identificó un QTL *fwqt8.1* involucrado en el control genético del peso de fruto (FW) en melón, observándose una disminución del peso de los frutos en presencia del alelo T. En el trabajo realizado en esta tesis de máster se pretende estudiar más a fondo el efecto del QTL *fwqt8.1* sobre el peso del fruto del melón, así como localizar con mayor precisión la posición cromosómica del mismo, en poblaciones de mapeo derivadas del mismo cruce. Para eso se analizaron diferentes familias provenientes de líneas de introgresión avanzadas. En el estudio de las plantas de la F2 recombinante todos los marcadores de la región *fwqt8.1* mostraron estar implicados en la expresión de este carácter, posicionando al *fwqt8.1* entre los marcadores Chr8\_4393075 y Chr8\_4752299 a la derecha del cromosoma, siendo la región que más diferencia mostró en cuanto a la media de los alelos. Sin embargo en análisis de los nuevos recombinantes y la verificación test de progenie 2018 indican la presencia de otro QTL en el otro extremo de la región. Por lo tanto, se propone la presencia de dos QTLs en esta región del LG VIII.

**Palabras claves:** Trigonus, Piel de Sapo, QTL, recombinación, mapeo fino, líneas de introgresión, tamaño del fruto, HRM, test de progenie.

# Abstract

Melon, (*Cucumis melo L.*), is a horticultural species belonging to the Cucurbitaceae family, of Asian origin. This species is normally consumed for its fruits, being highly appreciated for its high morphological variability. This crop has been known for more than 4000 years and its domestication is currently a topic of interest for improvement programs, since it has not been investigated in detail and most of the main features of domestication, everything and are not well known. In previous works, after a cross between Piel de Sapo (P) and the Trigonus wild accession (T), a QTL *fwqt8.1* was identified, involved in the genetic control of fruit weight (FW) in melon, observing a decrease in weight of the fruits in the presence of the T. allele, in the work carried out in this master's thesis, the effect of QTL *fwqt8.1* on the weight of the melon fruit is further studied, as well as more precisely locate the chromosomal position of this, in mapping populations derived from the same crossing. For this, different families from advanced introgression lines were analyzed. In the study of recombinant F2 plants, all markers in the *fwqt8.1* region were shown to be involved in the expression of this character, placing *fwqt8.1* in between the Chr8\_4393075 and Chr8\_4752299 markers to the right of the chromosome, the region being which showed more difference with respect to the mean of the alleles. However, in the analysis of the new recombinants and the 2018 progeny test, it indicates the presence of another QTL at the other end of the region. Therefore, the presence of two QTLs in this region of LG VIII is proposed.

**Keywords:** Trigonus, Piel de Sapo, QTL, recombination, fine mapping, introgression lines, fruit weight, HRM, progeny test.

# Resumeix

El meló, (*Cucumis melo L.*), és una espècie hortícola pertanyent a la família de la Cucurbitaceae, d'origen asiàtic. Aquesta espècie es consumeix normalment pels seus fruits, sent molt apreciat per la seva alta variabilitat morfològica. Aquest cultiu es coneix des de fa més de 4000 anys i la seva domesticació és en l'actualitat un tema d'interès per als programes de millora, donada que aquesta no ha estat investigada en detall i la majoria dels principals trets de domesticació, tot i no són ben coneguts. En treballs anteriors, després d'un encreuament entre Pell de Gripau (P) i l'accessió silvestre Trigonus (T) es va identificar un QTL *fwqt8.1* involucrat en el control genètic del pes de fruit (FW) en meló, observant-se una disminució del pes dels fruits en presència de l'al·lel T. en el treball realitzat en aquesta tesi de màster es pretén estudiar més a fons l'efecte de l'QTL *fwqt8.1* sobre el pes del fruit del meló, així com localitzar amb més precisió la posició cromosòmica d'aquest, en poblacions de mapeig derivades del mateix encreuament. Per a això es van analitzar diferents famílies provinents de línies de introgressió avançades. En l'estudi de les plantes de la F2 recombinant tots els marcadors de la regió *fwqt8.1* van mostrar estar implicats en l'expressió d'aquest caràcter, posicionant al *fwqt8.1* en entre els marcadors Chr8\_4393075 i Chr8\_4752299 a la dreta del cromosoma, sent la regió que més diferència va mostrar respecte a la mitjana dels al·lells. No obstant això en anàlisi dels nous recombinants i la verificació test de progènie 2018 indica la presència d'un altre QTL en l'altre extrem de la regió. Per tant es proposa la presència de dos QTLs en aquesta regió del LG VIII.

**Paraules claus:** Trigonus, Peil de Sapo, QTL, recombinació, mapatge fi, línies de introgressió, pes del fruit, HRM, test de progènie.

# Índice general

<b>Agradecimiento</b> .....	<b>II</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Resumeix</b> .....	<b>VI</b>
<b>Índice general</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Lista de anexo</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. El melón ( <i>Cucumis melo L.</i> ).....	2
1.1.1. Taxonomía.....	2
1.1.2. Origen y diversificación.....	2
1.1.3. Importancia económica de la especie.....	3
1.1.4. Descripción botánica.....	5
1.2. Domesticación del melón.....	6
1.2.1. Domesticación.....	6
1.2.2. Mapeo de QTL de tamaño de fruto.....	7
1.2.3. Herramienta genéticas y genómicas disponibles.....	9
1.2.4. Variabilidad genética.....	10
1.2.5. Identificación de genes de interés mediante clonaje posicional.....	11
1.2.6. Antecedentes sobre caracterización y mapeo fino del <i>fwqt8.1</i> implicados en la domesticación de melón.....	12
1.3. Interés del trabajo realizado.....	12
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>15</b>
3.1. F2 recombinante 2018.....	16
3.1.1. Material vegetal.....	16
3.1.2. Análisis estadísticos.....	17
3.2. Test de progenie otoño 2018.....	18

3.2.1.	Material vegetal y cultivo.....	18
3.2.2.	Análisis estadísticos.....	19
3.3.	Verificación test de progenie anteriores.....	20
3.3.1.	Material vegetal.....	20
3.3.2.	Germinación.....	21
3.3.3.	Trasplante y fenotipado.....	21
3.3.4.	Análisis estadísticos.....	22
3.4.	Análisis de nuevos recombinantes.....	23
3.4.1.	Material vegetal.....	23
3.4.2.	Germinación.....	23
3.4.3.	Extracción de ADN.....	23
3.4.4.	Genotipado.....	25
3.4.5.	Trasplante y fenotipado.....	25
3.4.6.	Análisis estadístico para los nuevos recombinantes.....	26
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>27</b>
4.1.	F2 recombinante 2018.....	28
4.1.1.	Variación fenotípica.....	28
4.1.2.	Asociación simple marcador-peso en el cromosoma VIII.....	28
4.1.3.	Asociación simple marcador-peso en los cromosomas IV y XII.....	29
4.1.4.	Interacción entre marcadores de los distintos cromosomas.....	30
4.2.	Test de progenie otoño 2018.....	31
4.2.1.	Análisis por familias del experimento del test progenie otoño 2018.....	31
4.2.2.	Análisis por familias de asociación marcador- cromosomas IV y XII.....	31
4.2.3.	Interacción entre marcadores.....	32
4.3.	Verificación test de progenie anteriores.....	32
4.3.1.	Test de progenie 2017.....	32
4.3.2.	Test de progenie 2018.....	33
4.4.	Análisis de nuevos recombinantes.....	36
4.4.1.	Comparación de las familias por separado.....	36



4.5. Mapeo fino global de <i>fwqt8.1</i> .....	37
<b>5. Discusión.....</b>	<b>38</b>
5.1. Verificar posición del <i>fwqt8.1</i> en el cromosoma VIII.....	39
5.2. Fondo genético e interacción.....	40
5.3. Mapeo fino global de <i>fwqt8.1</i> .....	42
<b>6. Perspectivas futuras.....</b>	<b>44</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>46</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>48</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>54</b>

# Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Imágenes que representan la gran diversidad en rasgos frutales dentro de las especies de melón. a. grupo agrestis, b. grupo flexuoso c. grupo dudaim d. e.grupo cantalupensis f. g. h. grupo inodoro (Pitrat et al., 2008).....	3
<b>Figura 2.</b> Principales países productores de melón, FAOSTAT 2017.....	4
<b>Figura 3.</b> Volumen de melones exportados desde España a los distintos países de la Unión Europea en 2018, por país (en toneladas) FAOSTAT 2017.....	5
<b>Figura 4.</b> Secciones longitudinales de frutas típicas de genotipos parentales 'Piel de Sapo' (P) y Trigonus (T), (Díaz et al., 2017).....	8
<b>Figura 5.</b> Variabilidad fenotípica en la descendencia a: Piel de Sapo, b: Trigonus, c: F1, d: F2 segregante (Díaz et al., 2017).....	9
<b>Figura 6.</b> Región heterocigota de la familia 16M13 a partir de la cual se formaron las plantas para la F2 recombinante para el cromosoma VIII. En rojo los marcadores flanqueantes e intermedio utilizados para el genotipado de las plantas. ....	16
<b>Figura 7.</b> Genotipo de las familias estudiadas en el experimento del test de progenie otoño 2018, para el QTL tamaño del fruto. Cada familia presenta plantas con los alelos P o T en el mismo punto dentro del LG VIII. Dentro de cada familia hay plantas recombinantes y no recombinantes.....	19
<b>Figura 8.</b> Familias utilizadas para el experimento de la verificación de test de progenie 2018 con sus genotipos y puntos de recombinación.....	21
<b>Figura 9.</b> Invernadero de la Universidad Politécnica de Valencia. A) Plantas seleccionadas trasplantadas a invernadero, B) flores embolsadas y c) fruto cuajado.....	22
<b>Figura 10.</b> Gel de calidad, en agarosa al 0.8%. Las bandas de la izquierda se muestra los marcadores de peso molecular tipo $\lambda$ (10ng/ $\mu$ l) a unas cantidades de 25ng, 50ng y 100ng.....	25
<b>Figura 11.</b> Distribución de los valores de peso en las 33 plantas seleccionadas de la F2 recombinante analizada en la campaña de otoño de 2018.....	28
<b>Figura 12.</b> ANOVA de una vía para los marcadores segregantes del extremo derecho del LG VIII. *: P<0,05, **: P<0,01, ***P<0,001.....	33

**Figura 13.** ANOVA y test de Tukey-K entre las familias 19M17-19M19 (P en la región recombinante) y 19M20-19M25, del experimento verificación del test de progenie 2018\*: P<0,05, \*\*: P<0,01,\*\*\*P<0,001.....34

**Figura 14.** ANOVA y test de Tukey-K entre las familias 19M31-19M34 recombinante del experimento verificación del test de progenie 2018\*: P<0,05, \*\*: P<0,01,\*\*\*P<0,001.....34

**Figura 15.** ANOVA de una vía entre familias recombinantes (19M17-19M19 y 19M31-19M34) y fijadas para el alelo T (19M20-19M30).....35

**Figura 16.** Mapeo fino propuesto para *fwqt8.1* a 360 Kb y a 247 Kb.....37

# Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Genotipo de las 33 plantas recombinantes seleccionadas. (T: homocigoto Trigonus, P: homocigoto Piel de Sapo, H, heterocigótico).....	17
<b>Tabla 2.</b> Lista de los marcadores segregante del cromosoma VIII utilizados para el análisis de las plantas de la familia (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87) del progenie test 2018 y su posición en el cromosoma en pb.....	19
<b>Tabla 3.</b> Genotipo de las familias 19M51 y 19M52 y sus puntos de recombinación. Extremo derecho del cromosoma VIII, verificación test de progenie 2017. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus.....	20
<b>Tabla 4.</b> Genotipo de las familias 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15, para el experimento de los nuevos recombinantes. Cromosoma VIII. P: Piel de Sapo, T: Trigonus y H: Heterocigoto.....	23
<b>Tabla 5.</b> Genotipo definitivo de las plantas seleccionadas y sus puntos de recombinación. P: homocigoto Piel de sapo y T: homocigoto Trigonus.....	25
<b>Tabla 6.</b> Media del peso de fruto por genotipo y análisis de la varianza para los marcadores del cromosoma VIII para el peso, donde se refleja la media de los alelos, así como también el valor de P para cada marcador. mP: media para el alelo P, mT: media para el alelo T.*: $P<0,05$ , **: $P<0,01$ ,*** $P<0,001$ .....	29
<b>Tabla 7.</b> Media por genotipo y valor F del efecto de los marcadores segregantes de los cromosomas IV y XII sobre el carácter peso del fruto, para las familias F2 recombinantes (18M64, 18M65, 18M66 y 18M69). mP: media para el alelo P, mT: media para el alelo T.*: $P<0,05$ , **: $P<0,01$ ,*** $P<0,001$ .....	30
<b>Tabla 8.</b> Análisis de la varianza para las familias del test de progenie 2018 (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87), para los marcadores segregante del cromosoma VIII. Media para cada alelo. P: Piel de Sapo y T: Trigonus. *: $P<0,05$ , **: $P<0,01$ ,*** $P<0,001$ .....	31
<b>Tabla 9.</b> Análisis de la varianza marcador- cromosomas IV y XII, de las familias segregantes en dichos cromosomas. Media por alelos y valor F para cada una de las familias analizadas por cromosoma*: $P<0,05$ , **: $P<0,01$ ,*** $P<0,001$ .....	32
<b>Tabla 10.</b> Comparación de media de las familias experimentales mediante una prueba de Tukey-Kramer HSD.....	33

**Tabla 11.** Resultados del ANOVA para la comparación de familia recombinante contra no recombinante. Media para cada alelo. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .....34

**Tabla 12.** Prueba de Tukey-Kramer HSD para las familias recombinantes y no recombinantes. Las familias no conectadas por la misma letra son significativamente distintas. ....35

**Tabla 13.** Resultados del ANOVA para las familias de los nuevos recombinantes. Media para cada alelo. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .....36

# Lista de anexo

<b>Anexo 1A:</b> Genotipo de las plantas para el cromosomas VIII, de la familia 18M64, 18M65, 18M66 y 18M69 de la F2 recombinante. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus, H: heterocigótico En rojo los marcadores flanqueantes e intermedio.....	55
<b>Anexo 1B.</b> Genotipo de las plantas para los cromosomas IV y XII , de la familia 18M64, 18M65, 18M66 Y 18M69 de la F2 recombinante. P: Piel de Sapo, T: Trigonus, H: heterocigótico.....	56
<b>Anexo 2.</b> Genotipado de las plantas de las familias analizadas (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87) para el experimento test de progenie de la campaña del 2018. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus.....	57
<b>Anexo 3.</b> Genotipo de las plantas para la verificación del test de progenie 2017. En rosa se muestran los marcadores segregantes que marcan el punto de recombinación. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus.....	58
<b>Anexo 4.</b> Genotipo de las plantas para la verificación del test de progenie 2018. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus.....	58
<b>Anexo 5.</b> Genotipo de las familias segregantes 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus y H: heterocigoto.....	59

# Lista de abreviaturas

**ANOVA:** análisis de la varianza.

**BC:** retrocruzamiento.

**DH:** doble haploide.

**FW:** tamaño del fruto.

**HRM:** High Resolution Melting.

**IBMCP:** Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.

**IL:** líneas de introgresión

**Indel:** inserción/delección.

**Kb:** kilobases.

**LG:** grupo de ligamiento.

**Pb:** pares de bases.

**P:** piel de sapo.

**PA:** área del pericarpio.

**PT:** grosor del pericarpio.

**QTL:** locus de un carácter cuantitativo.

**SNP:** polimorfismo de un solo nucleótido.

**Ssp:** subespecie.

**SV:** variación estructural.

**Ssp:** subespecie.

**SV:** variación estructural.

**T:** Trigonus.

# INTRODUCCIÓN



# 1. Introducción

## 1.1. El melón (*Cucumis melo L*)

### 1.1.1. Taxonomía

El melón (*Cucumis melo L.*) es una especie dicotiledónea perteneciente a la familia Cucurbitaceae, subfamilia Cucurbitoideae, tribu Melothrieae, género *Cucumis* y especie *melo L.* con un genoma diploide y un número cromosómico  $2x=2n=24$ . Las cucurbitáceas tienen una alta diversidad fenotípica para la forma y el tamaño del fruto, lo que resulta en una gran variedad de usos (Bisognin, 2002).

La familia de las cucurbitáceas contiene 130 géneros que incluyen alrededor de 800 especies (Kocyan et al. 2007). Algunas de las más comunes y que tienen mayor importancia económica son: dentro del género *Cucumis* el melón y el pepino (*C. sativus L.*); dentro del género *Citrullus* la sandía (*C. lanatus L.*) y dentro del género *Cucurbita* la calabaza (especies *C. moschata L.* y *C. máxima L.*) y el calabacín (*C. pepo L.*) (Kocyan et al. 2007).

Actualmente el melón se cultiva en todo el mundo y se encuentra una amplia variabilidad fenotípica entre los cultivares modernos y tradicionales, variedades locales y silvestres (Gonzalo et al., 2019).

### 1.1.2. Origen y diversificación

Se han formulado varias hipótesis que apuntaban a un origen africano para la especie *C. melo*, basándose en la coincidencia en el número cromosómico de *C. melo* ( $2n=24$ ) con algunas especies silvestres africanas, en contraste con *C. sativus* y la especie silvestre de origen asiático *C. hystrix* Chakravarty que presentan un número menor ( $2n=14$ ). (Kirkbride 1993; Chen et al. 1998). Sebastian et al., (2010) utilizando secuencias de ADN de cloroplastos y marcadores nucleares en 100 accesiones de *Cucumis* provenientes de África, Australia y Asia, mostraron que el melón es de origen asiático, seguida de una rápida propagación al noreste de África (Paris, 2016). Los cultivares europeos provienen de la India, considerada como centro de diversidad primario (Gonzalo et al., 2019).

Tradicionalmente, el melón ha sido dividido en dos subespecies: *melo* y *agrestis*; y ambas contienen variedades tanto cultivadas y comestibles como totalmente silvestres (Jeffrey, 1980) y todas las plantas con pelos largos y extendidos en los ovarios se llamaron supsp. *melo*, mientras

que las plantas con ovarios de pelo corto se llamaron subsp. *agrestis* (Kirkbride, 1993). Las regiones en las que existe una mayor diversidad dentro de la especie son África y Asia, especialmente la India, donde también se concentran la mayor parte de las variedades silvestres. La clasificación intraespecífica de melón ha sido revisada varias veces, el agrupamiento más reciente propuesto por (Pitrat, 2017), sugiere 19 posibles grupos basándose en caracteres fenotípicos del fruto: *agrestis*, *kachri*, *chito*, *tibish*, *acidulus*, *momordica*, *conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *flexuosus*, *chate*, *dudaim*, *chandalak*, *indicus*, *ameri*, *cassaba*, *ibericus*, *cantalupensis* y *inodorus* (**Figura 1**). Dado la existencia de muchos tipos con caracteres intermedios, algunas accesiones de melón no fueron incluidas en esta clasificación.



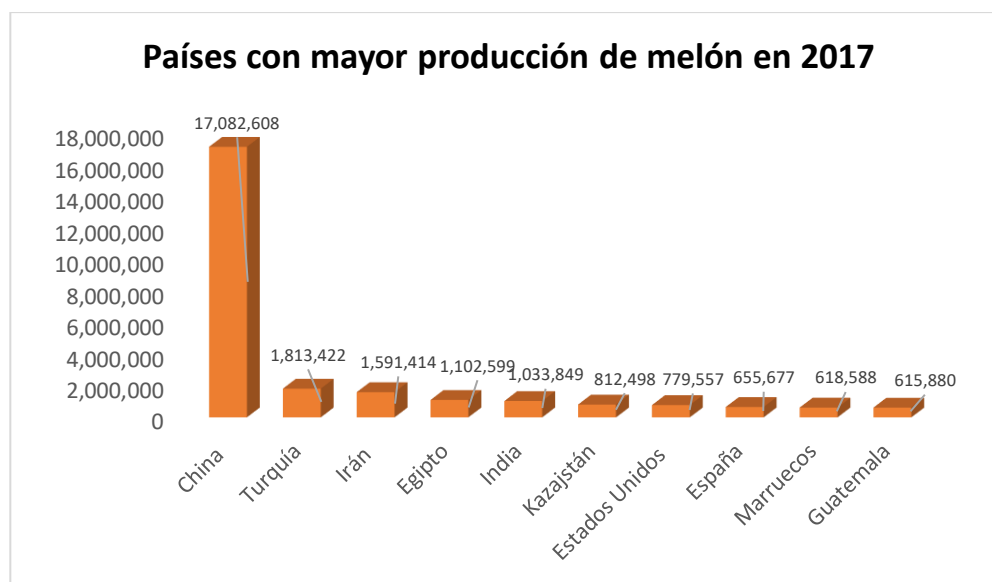
**Figura 1.** Imágenes que representan la gran diversidad en rasgos frutales dentro de las especies de melón. a. grupo *agrestis*, b. grupo *flexuoso* c. grupo *dudaim* d. e.grupo *cantalupensis* f. g. h. grupo *inodoro* (Pitrat et al., 2008).

### 1.1.3. Importancia económica de la especie

El melón es una de las principales especies hortícolas cultivadas en el mundo. En 2017, la superficie mundial cultivada de melones y la producción mundial se estimaron en 1,19 millones de hectáreas y 50 millones de toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2017).

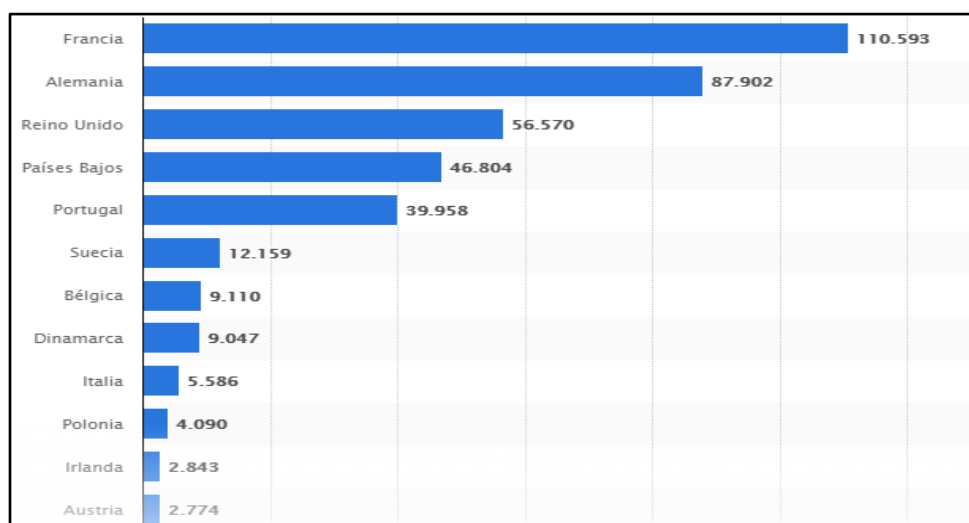
China es el primer productor de melón a nivel mundial, produciendo en 2017, 17,082,608 de toneladas lo que equivale aproximadamente a un 53.5% del total mundial, seguido por Turquía (1,813,422 Ton) e Irán (1,591,414 Ton). España ocupa el octavo lugar con 655,677 de toneladas equivalente a un 2,1% de la producción mundial (**Figura 2**).

A nivel de exportaciones España ocupa el primer lugar exportando 444 miles toneladas en 2017, fundamentalmente a países de Europa.



**Figura 2. Principales países productores de melón, FAOSTAT 2017.**

En el 2017, alrededor de 110.000 toneladas de melones fueron exportadas a Francia durante este periodo (FAOSTAT 2017) (**Figura 3**).



**Figura 3. Volumen de melones exportados desde España a los distintos países de la Unión Europea en 2018, por país (en toneladas) (FAOSTAT 2017).**

#### **1.1.4. Descripción botánica**

El melón es una planta herbácea anual susceptible a la temperatura, la intensidad de la luz y la duración del día. La planta de melón presenta tallo rastrero o trepador con un sistema radicular muy ramificado de crecimiento rápido. Esta planta se caracteriza por tallos herbáceos recubiertos de formaciones pilosas que presentan nudos con repartición generalmente regular de hojas, zarcillos y flores. Las hojas son pilosas habitualmente pentagonales y con limbo ovado (Valadez, 1989).

El melón es particularmente interesante por su biología de flores. Se pueden observar tres tipos de flores: masculina, femenina y hermafrodita o perfecta. Los tipos silvestres de melón, como la mayoría de las especies del género *Cucumis*, son monoicos (flores masculinas y femeninas en la misma planta). Aproximadamente 2/3 de las accesiones en colecciones de cultivares o variedades locales son andromonoicas (flores masculinas y hermafroditas en la misma planta) y 1/3 son monoicas. Pocas accesiones son hermafroditas (todas las plantas tienen solamente flores perfectas (Poole et al., 1939).

El fruto del melón se denomina pepónide y se caracteriza por su gran variabilidad de forma y tamaño; se pueden encontrar desde formas achatadas hasta muy alargadas con pesos que pueden variar desde 20 g hasta 35 kg. El epicarpio es duro y muestra distintos patrones de coloración con una superficie lisa, reticulada o escriturada. La pulpa puede ser delgada o carnosa y dulce o amarga con una gran gama de colores blanco, amarillo, naranja o verde. La placenta se divide en 3 o 4 carpelos y está ocupada por las semillas de forma fusiforme, aplastadas y de color blanco o amarillento (Křístková et al., 2003).

## **1.2. Domesticación del Melón**

### **1.2.1. Domesticación**

Domesticación es el proceso por el cual una población de una determinada especie animal o vegetal pierde, adquiere o desarrolla ciertos caracteres morfológicos, fisiológicos o de comportamiento, los cuales son heredables y, además, son el resultado de una interacción prolongada y de una selección artificial por parte del ser humano. Su finalidad es obtener determinados beneficios de dichas modificaciones (Doebley et al., 2006).

Existe un conjunto común de rasgos, conocido como el "síndrome de domesticación", que distingue a la mayoría de las plantas cultivadas de sus parientes silvestres (Hammer, 1984). En comparación con sus progenitores, las plantas domesticadas suelen tener semillas o frutos más grandes, plantas más robustas, crecimiento más determinado o mayor dominio apical y una pérdida de dispersión natural de semillas. Asimismo, se observan cambios fisiológicos como la pérdida de latencia de la semilla, la disminución de las sustancias amargas en las estructuras comestibles, cambios en la sensibilidad del fotoperiodo, floración sincronizada y la pérdida o reducción de mecanismos de defensas contra enemigos naturales (Doebley et al., 2006).

Estos cambios tienen como consecuencia una reducción en la supervivencia de los cultivos en el medio silvestre. Por lo tanto, los cultivos son ahora dependientes de los cuidados de los humanos para su propagación y supervivencia (Guerrero, et al., 2007).

El melón se conoce desde hace más de 4000 años (Andrews et al., 1956; Manniche, 1989; Meirano, 2000). Los principales caracteres que han sido objeto de domesticación de este cultivo, han sido tamaño del fruto, grosor de la pulpa, tamaño de la semilla, tamaño de las hojas y presencia de cucurbitacina. La domesticación del melón podría haber comenzado por el interés de sus semillas ricas en proteínas y lípidos de importante valor nutricional, similar a otros géneros de las cucurbitáceas como la calabaza (*Cucurbita*) y la sandía (*Citrullus lanatus*) (Pitrat, 2012).

La domesticación del melón aún no se conoce con claridad, un estudio reciente realizado por Endl et al., (2018) sugieren la posibilidad de que se hayan producido al menos dos eventos de domesticación independientes, uno en África y otro en Asia. Sin embargo no se ha podido determinar con exactitud cuál de los dos procesos de domesticación ocurrió primero.

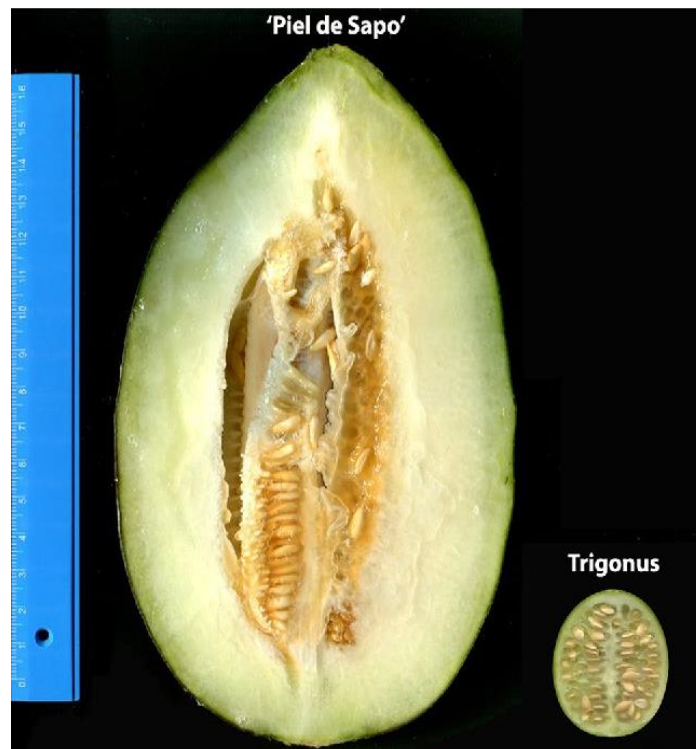
Los melones cultivados muestran una amplia gama de formas de fruto (desde ligeramente plana hasta extremadamente alargada), mientras que los melones silvestres suelen ser redondos u ovalados, y de tamaño pequeño que aumentó tras el proceso de domesticación de la especie.

### **1.2.2. Mapeo de QTLs de tamaño de fruto**

La estrategia de mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) se ha revelado exitosa para la disección genética de algunos de estos rasgos relacionados con la domesticación en otros cultivos, como arroz, maíz, sorgo, cebada, trigo, soja, girasol y tomate (Olsen et al., 2013). En el caso de

melón, se han identificado QTLs implicados en características del fruto, morfología de la planta y resistencia a patógenos (Díaz et al., 2011; Gonzalo y Monforte 2017). Estos estudios se han realizado comúnmente en poblaciones que provienen del cruce entre miembros de dos subespecies diferentes en melón, *melo* y *agrestis*. Un ejemplo de mapeo de un carácter relacionado con la domesticación, es la identificación del gen de pH responsable de la acidez de la fruta, cuya característica explica la historia evolutiva de los melones dulces (Cohen et al. 2014).

Díaz et al., (2017) por primera vez, llevaron a cabo un estudio de QTLs relacionado con el control de varios caracteres del síndrome de domesticación. Para este estudio se obtuvo una población F2 compuesta por 400 plantas provenientes del cruce intraespecífico entre una variedad de tipo “Piel de Sapo” (P) (subsp. *melo* var. *inodorus*) y la accesión silvestre Ames 24297, “Trigonus” (T) previamente clasificado como *C. trigonus*, aunque pertenece a *C. melo* ssp. *agrestis* grupo *agrestis* según (Pitrat, 2017). Esta última muestra todas las características típicas de un melón silvestre (Monforte et al. 2005), siendo una opción adecuada para estudiar la genética de la domesticación del melón. Los frutos del cultivar Piel de Sapo son grandes, de forma ovalada, con semillas grandes y un alto contenido de pulpa dulce, sin embargo los frutos de Trigonus son de tamaño pequeños, normalmente redondo, con semillas pequeñas y sin pulpa comestible (**Figura 4**) (Monforte et al.2005).



**Figura 4.** Secciones longitudinales de frutas típicas de genotipos parentales 'Piel de Sapo' (P) y Trigonus (T) (Díaz et al., 2017).

La expresión sexual muestra efectos pleiotrópicos en la morfología del fruto, ya que la monoecia conduce a frutos más alargados (Monforte et al. 2005; Ramamurthy; Waters 2015 y Périn et al., 2002). Díaz et al., (2017) con el fin de mitigar el efecto de la segregación del locus en la morfología fenotípica de la diversidad de la fruta, enriquecieron la población F2 con individuos andromonoicos seleccionándolos con marcadores CAPS. Así, la población de mapeo F2 finalmente consistió en 200 plantas. Los individuos de la F2 (**Figura 5**) se evaluaron en 3 ensayos de 2 localidades y 2 años distintos. Se definieron un total de 27 QTL con efectos estables en al menos dos ensayos F2, diez relacionados con los rasgos de la forma (cuatro para largo del fruto, dos para diámetro del fruto y tres para la forma del fruto) ubicadas en LGII, IV, VI y VIII respectivamente, 4 QTLs de tamaño de fruto, consistentes entre al menos 2 ensayos, en cromosoma II (*fwqt2.1*), IV (*fwqt4.1*), VI (*fwqt6.1*) y VIII (*fwqt8.1*) y cinco QTL que controlan el contenido de pulpa (tres para el área del pericarpio (AP) y dos para grosor del pericarpio (PA) en LGV, VI y VIII.

En cada ensayo el QTL asociado al tamaño del fruto (*fwqt8.1*) localizado en el grupo de ligamiento (LG) VIII, presentó un alto valor de LOD, mantenido entre los diferentes ensayos. Posteriormente, se verificó el efecto de este QTL en líneas de retrocruces avanzados, así se confirmó que los alelos de T disminuyen el tamaño de fruto y que la presencia de un solo alelo T



en LG VIII (en heterocigosis) es suficiente para obtener frutos de pequeño tamaño (Díaz et al., 2017).



**Figura 5. Variabilidad fenotípica en la descendencia F2 a: Piel de Sapo, b: Trigonus, c: F1, d: F2 segregante. (Díaz et al., 2017).**

### 1.2.3. Herramientas genéticas y genómicas disponibles

#### a. Mapas genéticos

El tamaño del genoma de melón es relativamente pequeño, se estima en 450-500 Mpb (Arumuganathan et al., 1991). Debido a la relevancia económica del melón durante los últimos 15 años se han desarrollado una serie de herramientas genéticas y genómicas que han ayudado a la comprensión de la biología de esta especie, así como a su mejora genética y el desarrollo de nuevas variedades.

Una de las primeras herramientas en ser desarrolladas fueron los marcadores moleculares. Se han desarrollado muchos tipos de marcadores moleculares en melón incluyendo SSRs y SNPs, que son actualmente los más utilizados ya que existen sistemas de detección de alto rendimiento automatizados y además son fácilmente transferibles a programas de mejora vegetal. El desarrollo de marcadores moleculares es fundamental para la construcción de mapas genéticos, que en melón se construyen desde hace casi 20 años utilizando los distintos tipos de marcadores moleculares



disponibles en cada momento. Actualmente, el mapa genético de referencia de melón es el publicado por (Díaz et al., 2011) que condensa en uno solo los diferentes mapas construidos a partir de varias poblaciones generadas con distintas variedades por distintos grupos de investigación. El mapa consenso contiene 1.592 marcadores moleculares (entre ellos 640 SSRs y 330 SNPs) distribuidos a lo largo de 12 grupos de ligamiento (LG).

#### b. Secuenciación del genoma

Uno de los avances más importantes para el estudio del melón es la secuenciación de su genoma (García-Mas et al. 2012). Se utilizó una línea doble haploide denominada DHL92 obtenida a partir del cruzamiento entre la variedad Piel de Sapo (grupo inodorus) y la variedad exótica de origen coreano PI161375 (grupo conomon), del cual predijeron 27.427 genes codificando proteínas, que fueron analizados mediante la reconstrucción de 22.218 árboles filogenéticos, lo que permitió la definición de genes ortólogos con otras especies vegetales. La disponibilidad de un genoma de referencia facilita estudiar la diversidad del genoma, con la posibilidad de descubrir SNPs y variación de inserción/delección (indel), así como, la variación estructural (SV) y polimorfismo de inserción de transposón.

#### **1.2.4. Variabilidad genética**

Actualmente, el melón tiene una distribución mundial con alta variación fenotípica. Por ejemplo, la forma del fruto de melón varía de oblongo a extremadamente alargada, el peso del fruto de unos pocos gramos a varios kilogramos y el sabor de la carne de amargo a muy dulce (Kirkbride 1993, Stepansky et al., 1999). Además, se han detectado altos niveles de variabilidad genética utilizando marcadores moleculares (Stepansky et al. 1999). En un estudio de variabilidad, (Monforte et al., 2003) encontraron un promedio de 6,3 alelos por locus de microsatélite en una serie de 27 genotipos de melón. En conjunto, estos datos confirman que *C. melo* es una de las especies más diversas del género *Cucumis*, aunque el control genético de su variación fenotípica es en gran parte desconocido. Se han informado más de 100 genes implicados en los rasgos morfológicos y la resistencia a la enfermedad y 20 de ellos ya se han cartografiado (Périn et al., 2002). Estos genes mapeados deben representar solo una fracción muy pequeña de los genes subyacentes a la variación fenotípica observada en el germoplasma de melón. La mayor parte de la variación podría deberse a una variabilidad alélica múltiple en un gran número de loci de rasgos cuantitativos (QTL). El análisis exhaustivo de los QTL requiere mapas detallados de enlaces de marcadores moleculares (Frery et al., 2000), lo que permite los primeros informes de análisis de

QTL en melón. Por ejemplo, Périn et al., (2002) identificaron QTLs implicados en la forma del fruto y la flor utilizando dos poblaciones de líneas recombinantes consanguíneas.

El análisis de QTL se puede usar como una estrategia para extraer genes o alelos de QTL en germoplasma exótico y transferirlos a los cultivares modernos de élite, lo que permite un manejo eficiente de la diversidad genética disponible en poblaciones naturales, especies silvestres y bancos de germoplasma (Tanksley et al., 1997 ).

### **1.2.5. Identificación de genes de interés mediante clonaje posicional**

Tras la detección de QTLs y su mapeado a una región del genoma del melón, el siguiente paso para la comprensión genética de los caracteres es la identificación del gen o genes responsables de las diferencias fenotípicas. La estrategia del clonaje posicional se basa en la identificación de marcadores genéticos estrechamente ligados al gen y a la generación de eventos de recombinación próximos al mismo, de forma que tras varios eventos de recombinación e incrementando la resolución del mapa genético, los marcadores más ligados al gen son utilizados para la construcción de un mapa físico en el que será seleccionado el gen candidato.

Aunque en melón hay disponibles mapas genéticos saturados y una gran cantidad de marcadores moleculares, el proceso de clonaje posicional es difícil y, comparado con el número de caracteres estudiados el número de genes clonados sigue siendo bajo. En esta especie se han clonado los genes mayores *Fom-1* y *Fom-2* responsables de la resistencia a *Fusarium oxysporum* razas 0,2 y 0,1 respectivamente (Joobeur et al., 2004); el gen *Vat*, responsable de la resistencia a la transmisión de virus por áfidos (Pauquet et al., 2004); el gen *nsv*, responsable de la resistencia al virus MNSV (Nieto et al., 2006). Relacionados con la fisiología de la flor, han sido clonados los genes *a* (andromonoecia) y *g* (ginoecia), responsables de la determinación sexual en melón y cuyas combinaciones dan lugar a los distintos tipos de flor: AAGG (monoicas, flores masculinas en el tallo principal y femeninas en las ramas laterales), aaGG (andromonoicas, flores masculinas en el tallo principal y hermafroditas en las ramas laterales) AAgg (ginoicas, sólo flores femeninas en ramas laterales) y aagg (hermafroditas, sólo flores hermafroditas en ramas laterales) (Boualem et al., 2008; Martin et al., 2009). Recientemente, también han sido clonados los genes *CmPH*, responsable de la acidez del fruto de melón (Cohen et al., 2014); *CmOR*, que gobierna la pigmentación de la pulpa del fruto (Tzuri et al., 2015); y *CmKFB*, involucrado en la pigmentación del exocarpo del fruto (Feder et al., 2015).

El único QTL clonado hasta la fecha es *ETHQV6.3* implicado en la maduración climatérica y que codifica un factor de transcripción con dominio NAC (Rios et al., 2015). Adicionalmente, la clonación del QTL *FSQS8.1* implicado en la morfología de fruto está también prácticamente concluido (Wu et al., 2018).

#### **1.2.6. Antecedentes sobre caracterización y mapeo fino del *fwqt8.1* implicados en la domesticación de melón**

En trabajos anteriores, Riahi, (2018) se realizó un mapeo fino del QTL de tamaño del fruto *fwqt8.1* en el LG VIII, tras un análisis de nuevas líneas recombinantes con introgresión del alelo de Trigonus en diferentes puntos de la zona donde se localiza el *fwqt8.1* y con la saturación de nuevos marcadores moleculares se logró acotar la posición cromosómica del *fwqt8.1* de 700 Kb a una zona de 360 Kb entre los marcadores CMPSNP97 y CMPSNP44.

### **1.3. Interés del trabajo realizado**

El interés de este trabajo de investigación radica en que hoy en día el desarrollo de nuevos cultivares de interés comercial es un reto tanto en el campo agronómico como genético. Es necesario comprender mejor las bases genéticas de las variaciones fenotípicas de los caracteres de interés agronómicos. La generación de variabilidad en cultivos de gran importancia económica como lo es el melón, resulta de vital interés para la mejora de la competitividad del sector.

# **OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis de máster es la caracterización en profundidad de un QTL implicado en el control genético de uno de los caracteres claves en la domesticación de melón: el tamaño del fruto. Para lograr este objetivo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Localizar con mayor precisión la posición cromosómica del QTL de tamaño de fruto *fwqt8.1* en el cromosoma VIII en una población F2 con alta recombinación.
- Estudiar el posible efecto en el tamaño del fruto de otras regiones presentes en el fondo genético de los genotipos analizados para el estudio de *fwqt8.1*. que podrían dificultar el avance en el mapeo fino.
- Acotar la posición del *fwqt8.1* con tests de progenie en familias con distintos puntos de recombinación.

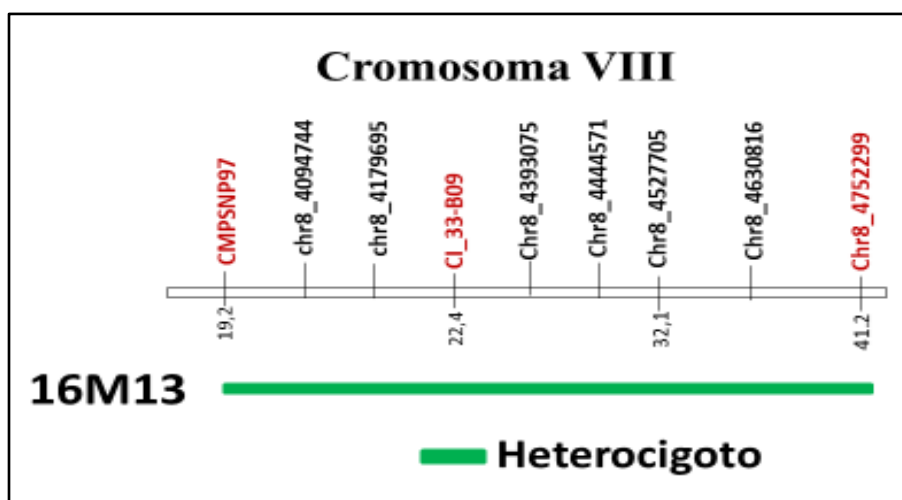
# **MATERIAL Y MÉTODOS**

# 3. Material y métodos

## 3.1. F2 recombinante 2018

### 3.1.1. Material vegetal

La F2 recombinante utilizada en el presente estudio se generó en la campaña primavera 2018, previo al comienzo de esta tesis máster, en el laboratorio de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP. A partir de la familia 16M13, heterocigota en la región donde se localiza *fwqt8.1* (**Figura 6**), se seleccionaron las plantas 16M13-65, 16M13-19, 16M13-37 y 16M13-74, también heterocigóticas, que luego fueron autofecundadas y se generaron las familias F2 18M64, 18M65, 18M66 y 18M69



**Figura 6. Región heterocigota de la familia 16M13 a partir de la cual se formaron las plantas para la F2 recombinante para el cromosoma VIII. En rojo los marcadores flanqueantes e intermedio utilizados para el genotipado de las plantas.**

Se analizaron un total de 437 plantas usando la tecnología de curvas de fusión de alta resolución HRM (High Resolution Melting) de Applied Biosystems 7500 Fast System, de las cuales fueron seleccionadas 33 plantas con diferentes puntos de recombinación entre las posiciones 4.063.741 pb y 4.752.299 pb, empleando dos marcadores flanqueantes (CMPSNP97 y chr8\_4752299) y uno intermedio (CI\_33-B09 a 4.311.140 pb) (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Genotipo de las 33 plantas recombinantes seleccionadas. (T: homocigótico Trigonus, P: homocigótico Piel de Sapo, H: heterocigótico).**

	4.063.741 CMPSNP97	4.311.140 CI_33-B09	4.752.299 chr8_4752299
18M64-37; 18M64-28; 18M66-15; 18M66-29; 18M66-57; 18M66-67; 18M69-33; 18M69-109	H	T	T
18M65-68; 18M69-111	H	H	T
18M64-76; 18M69-143	T	T	H
18M65-66	T	H	H
18M64-14; 18M66-38; 18M69-37; 18M69-142	P	P	H
18M64-42; 18M66-5; 18M66-51; 18M66-64; 18M69-174; 18M69-182	P	H	H
18M66-19; 18M66-21; 18M66-66; 18M66-68; 18M66-83; 18M69-54; 18M69-89	H	P	P
18M64-27; 18M69-147	H	H	P
18M69-103	H	P	H

Las mismas 33 plantas de la F2 se genotiparon con marcadores adicionales para determinar la posición de los puntos de recombinación (**Anexo 1A**). Adicionalmente también se genotiparon con el sistema Sequenom MassARRAY iPLEX por el Servicio de Investigaciones Biomédicas, Unidad Central de Investigación (Universidad de Valencia), con marcadores SNPs, en los cromosomas I, II, III, IV, VII, VIII, XI y XII, para verificar la presencia de introgresiones adicionales (**Anexo 1B**).

### 3.1.2. Análisis estadísticos para la F2 recombinante, 2018

Para el análisis estadístico de estas familias (18M64, 18M65, 18M66 y 18M69), se generó una matriz de datos con el genotipo para cada marcador y los datos fenotípicos del peso de fruto juntando las 4 familias.

Los datos se analizaron estadísticamente con el software JMP pro V13.1 (SAS Institute Inc), realizándose un análisis de varianza de un factor para estudiar la asociación entre marcador y fenotipo en los cromosomas IV, VIII y XII según el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$



$Y_{ij}$ : parámetro morfológico  $j$  en el marcador  $i$ .

$\mu$ : media general.

$\alpha_i$ : efecto del marcador

$i$ .  $\epsilon_{ij}$ : error de medida.

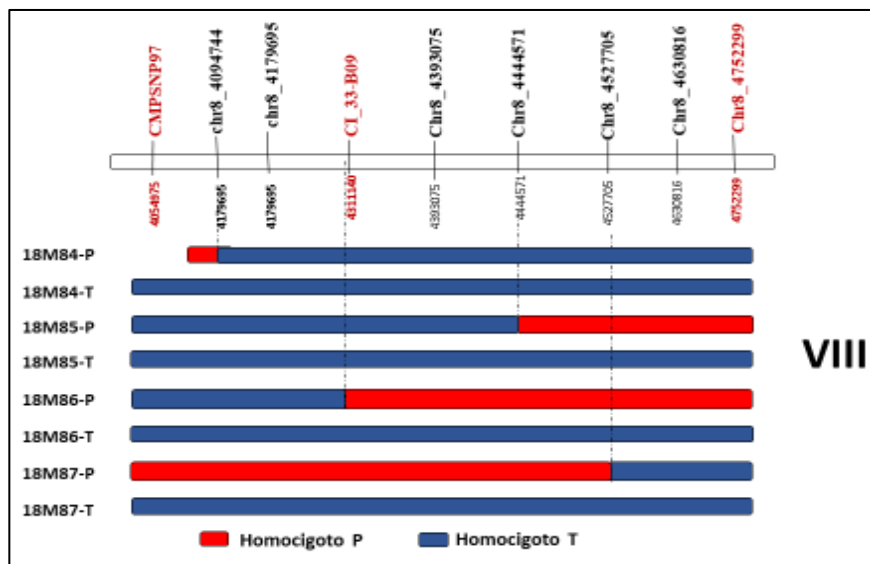
Además, se analizó la interacción entre los marcadores del grupo de LG VIII y los marcadores segregantes en los cromosomas IV y XII (**Anexo 1**).

Se analizaron la media, desviación estándar y la distribución del carácter de peso de fruto en la población, posteriormente se realizó el gráfico de distribución.

### 3.2. Test de progenie otoño 2018

#### 3.2.1. Material vegetal y cultivo

En el experimento de test de progenie realizado en la campaña de otoño 2018 previo al comienzo de esta tesis de máster, en el laboratorio de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP se evaluaron 4 familias (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87) con recombinaciones en distintos puntos del *fwqt8.1*. Se seleccionaron plantas homocigóticas para el alelo Piel de Sapo (P) o homocigóticas para el alelo Trigonus (T) en la región segregante recombinante para estudiar si existía co-segregación entre la región genómica y el tamaño del fruto (**Figura 7**). Los genotipos de cada una de las plantas seleccionadas en las familias experimentales y sus puntos de recombinación, se presentan en el **Anexo 2**.



**Figura 7.** Genotipo de las familias estudiadas en el experimento del test de progenie otoño 2018, para el QTL tamaño del fruto. Cada familia presenta plantas con los alelos P o T en homocigosis en el mismo punto dentro del LG VIII. Dentro de cada familia hay plantas recombinantes y no recombinantes.

### 3.2.2. Análisis estadísticos

El análisis estadístico del test de progenie realizado en otoño 2018 ya incluido en el presente trabajo de máster, se llevó a cabo usando el software JMP pro V13.1 (SAS Institute Inc). Se realizó un análisis de varianza de una vía con el modelo descrito anteriormente en el apartado 3.1.2, para cada familia (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87) por separado con el fin de estudiar la asociación de los marcadores segregantes del LG VIII (**Tabla 2**), con el tamaño del fruto. Para ello se generó una matriz con los datos de genotipado de estas familias así como los datos del peso (fenotípicos).

**Tabla 2. Lista de los marcadores segregante del cromosoma VIII utilizados para el análisis de las plantas de la familia (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87) del progenie test 2018 y su posición en el cromosoma en pb.**

Marcadores	Cromosoma	Posición pb
CMPSNP97	VIII	4,063,741
chr8_4094744		4,094,744
chr8_4179695		4,179,695
Cl_33-B09		4,311,140
chr8_4393075		4,393,075
chr8_4444571		4,444,571
chr8_4527705		4,527,705
chr8_4630816		4,630,816
chr8_4752299		4,752,299

Además de la segregación en el cromosoma VIII, se observaron otras regiones con marcadores segregantes. En el cromosoma IV se observó una zona que comprende 3 marcadores y en el cromosoma XII, 4 marcadores que mostraron esta segregación. Las plantas seleccionadas segregaban también en otras regiones del genoma. Por ello se estudió la interacción entre los marcadores de los cromosomas IV, VIII y XII, que presentaban distinto genotipo, mediante un análisis ANOVA a dos vías y se generó un gráfico de medias por marcador en caso de significación de la interacción.

También se analizaron los cromosomas IV y XII, por separado, realizando un análisis de la varianza para los marcadores segregantes.

### 3.3. Verificación test de progenie anteriores

#### 3.3.1. Material vegetal

En este experimento realizado para la verificación de test de progenie de la campañas de 2017 y 2018 se emplearon distintas familias, proveniente de diferentes años.

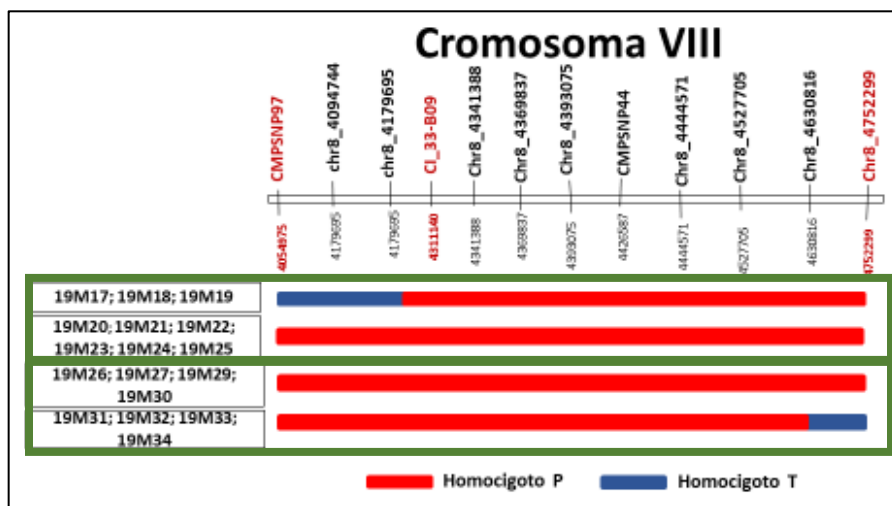
En la verificación del **test de progenie del año 2017**, se generaron familias a partir de las plantas 17M35-22 y 17M35-28 que se catalogaron, respectivamente 19M51 y 19M52 (**Tabla 3**). Las familias seleccionadas presentaban una recombinación en la posición del marcador Chr8\_4910084 a la derecha de la probable posición del QTL de peso de fruto. En el **Anexo 3** se presentan el genotipado de estas plantas.

**Tabla 3. Genotipo de las familias 19M51 y 19M52 y sus puntos de recombinación. Extremo derecho del cromosoma VIII, verificación test de progenie 2017. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus.**

	Pedigrí anterior	CMPSNP97	CMPSNP44	CI_33-B09	chr8_4752299	chr8_4910084	chr8_5166994	CMPSNP62
<b>19M51</b>	17M35-22	P	P	P	P	P	P	P
<b>19M52</b>	17M35-28	P	P	P	P	T	T	T

Posteriormente, para la verificación del experimento de **test de progenie de la campaña 2018**, se realizó a partir de plantas de las familias 18M86 y 18M87. La familia 18M86 presentaba una recombinación en la posición 4.179.695. Se seleccionaron los individuos 18M86-10, 18M86-11 y 18M86-19 homocigóticos para el alelo T en esa posición y fueron renombrados 19M17, 19M18 y 19M19 respectivamente, y los individuos fijados para el mismo alelo T en homocigosis, 18M86-14, 18M86-20, 18M86-22, 18M86-25, 18M86-33 y 18M86-35 renombrados 19M20, 19M21, 19M22, 19M23, 19M24 y 19M25.

Luego, la familia 18M87 presentaba una recombinación en la posición 4.527.705, se seleccionaron los individuos 18M87-3, 18M87-7, 18M87-13 y 18M87-32 que presentaban el alelo T fijado en homocigosis y fueron renombrados 19M26, 19M27, 19M29 y 19M30 respectivamente y los individuos homocigóticos para el alelo P en esa posición 18M87-19, 18M87-29, 18M87-35 y 18M87-38 catalogados 19M31, 19M32, 19M33 y 19M34 (**Figura 8, Anexo 4**).



**Figura 8.** Familias utilizadas para el experimento de la verificación de test de progenie 2018 con sus genotipos y puntos de recombinación.

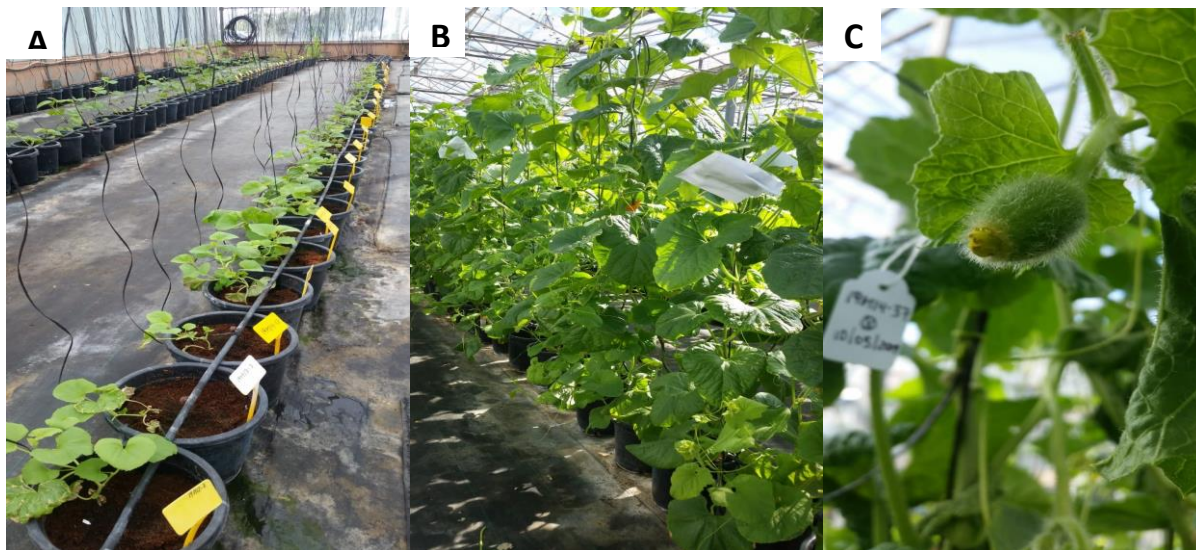
### 3.3.2. Germinación

Las semillas de las plantas seleccionadas para generar las familias (19M17 a 19M34) y (19M51 a 19M52) para el experimento de verificación del test de progenie anteriores, se abrieron con ayuda de una pinza y se desinfectaron con lejía 30% durante 1 min, luego se sumergieron en agua destilada dos veces durante 1 min. A continuación, se colocaron en placas de petri cubiertas con algodón y papel de filtro humidificado y se incubaron 24h en oscuridad a 37°C. Después, las semillas que habían germinado, se sembraron en bandejas 30x50 cm de alveolos en fitotrón del IBMCP a 23 °C por 16h (luz) y a 20 °C por 8h (oscuridad).

### 3.3.3. Trasplante y fenotipado

Las plantas provenientes de las familias (19M17 a 19M34) y (19M51 y 19M52), se trasplantaron a invernadero de la Universidad Politécnica de Valencia (**Figura 9A**), seleccionando de 2 plantas por familias siendo un total de 10 a 12 plantas que poseen el mismo genotipo. Se realizó una poda de formación, para dejar solamente dos ramas por planta. Aproximadamente, un mes después del trasplante, las plantas empezaron a florecer, apareciendo primero, flores masculinas seguidas por flores hermafroditas. Las plantas fueron

autofecundadas, así, el día anterior a la antesis, se embolsaron las flores hermafroditas para evitar la fecundación cruzada por otra planta (**Figura 9B**). El día siguiente, las flores en antesis se polinizaron con polen de flores masculinas de la misma planta. Luego, se etiquetaron poniendo el nombre de la planta y la fecha de polinización y se volvieron a tapar unos 3 días. Se sigue polinizando hasta obtener frutos bien cuajados, uno por cada rama o por lo menos uno por planta. Tras la polinización, se marcaron los frutos cuajados (**Figura 9C**), y se calculan 45 días para su cosecha. Una vez cosechados, los frutos fueron pesados y posteriormente se escanearon. Luego se sacaron las semillas, se limpiaron, se secaron a 37 °C durante 72 horas y se guardaron en frigorífico a 4 °C para su uso en futuras etapas del proyecto.



**Figura 9. Invernadero de la Universidad Politécnica de Valencia. A) Plantas seleccionadas trasplantadas a invernadero, B) flores embolsadas y c) fruto cuajado.**

#### **3.3.4. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de las familias del año 2017 y 2018 se realizó un análisis de la varianza de una vía utilizando el método descrito anteriormente en el apartado 3.1.2 con el software JMP pro V13.1 (SAS Institute Inc) para ver si los marcadores segregantes de estas familias, tienen alguna asociación con la expresión fenotípica del fruto. Posteriormente se compararon los genotipos de las familias entre ellas realizando una prueba de Tukey-Kramer HSD.

Además, para las familias del año 2018 se realizó una comparación entre familias recombinantes y no recombinantes en distintos puntos.

### 3.4. Análisis de nuevos recombinantes

#### 3.4.1. Material vegetal

En este cuarto experimento llevado a cabo en la presente tesis de máster, en el laboratorio de Genómica en Mejora Vegetal del IBMCP para el análisis de los nuevos recombinantes, se seleccionaron un total de 4 plantas (18M64-27, 18M66-68, 18M69-103 y 18M69-142) con diferentes puntos de recombinación en la región *fwqt8.1*, a partir de las cuales se generaron las familias 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15 respectivamente (Tabla 4). En el Anexo 5 se presenta el genotipado de estas familias.

Tabla 4. Genotipo de las familias 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15, para el experimento de los nuevos recombinantes. Cromosoma VIII. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus y H: Heterocigoto.

	Pedigrí anterior	CMPSNP97	chr8_4094744	chr8_4179695	CI_33-B09	chr8_4393075	chr8_4444571	chr8_4527705	chr8_4630816	chr8_4752299
19M12	18M64-27	H	H	H	H	H	H	H	H	P
19M13	18M66-68	H	H	H	P	P	P	P	P	P
19M14	18M69-103	H	H	P	P	P	P	P	P	H
19M15	18M69-142	P	P	P	P	P	P	P	P	H

#### 3.4.2. Germinación

Las semillas de las plantas seleccionadas para generar las familias 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15 fueron germinadas y sembradas en bandejas 30x50 cm, utilizando el método descrito anteriormente en el apartado 3.3.2. Se trasplantaron 60 plantas de cada familia, siendo un total de 240 plantas.

#### 3.4.3. Extracción de ADN

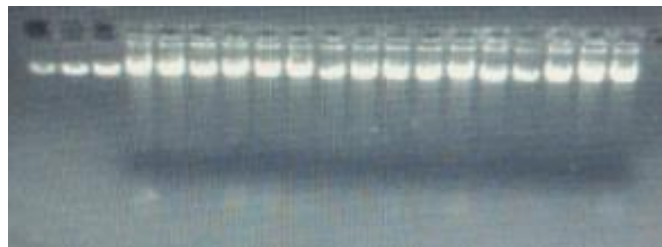
El ADN se extrajo a partir de cotiledones u hojas jóvenes de las plantas de la familia 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15, siguiendo el protocolo de (Doyle et al., 1990) con ligeras modificaciones. Cada muestra de tejido vegetal se colocó con 2 bolas de acero inoxidable en tubos de 1,1 ml en tiras de 8, y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se trituraron en molinillo Geno/Grinder 2000 (SPEX Sample Prep) a 230 golpes/min durante 19 segundos manteniéndose congeladas en nitrógeno líquido hasta la adición de la solución de extracción.



A cada muestra, se le agregaron 340  $\mu\text{l}$  de la solución de extracción CTAB precalentado a 65°C (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM (pH 8), Tris 100 mM (pH 8) y 2-mercaptoetanol 0,2% adicionado inmediatamente antes de su uso). Luego, los tubos se incubaron a 65°C durante 40 min invirtiendo 2 a 3 veces durante la incubación. A continuación, se realizó un spin y se añadieron 340  $\mu\text{l}$  de cloroformo: isoamil alcohol (24:1) mezclando por inversión. Se centrifugó a 3300 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo, al que se agregó 300  $\mu\text{l}$  de isopropanol a -20 °C. La solución se mezcló suavemente invirtiendo los tubos manteniéndose a -20 °C entre 1 hora a 24 horas para precipitar el ADN. Una vez precipitado, se centrifugó a 3300 rpm durante 20 min a T° ambiente, se eliminó el sobrenadante por inversión, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de Washing buffer (Etanol 76% v/v, Acetato Amónico 10mM), se agitó con vórtex y se centrifugó nuevamente a 3300 rpm a T° ambiente durante 10 min. El sobrenadante se eliminó por inversión y se dejó secar el precipitado a T° ambiente invirtiendo los tubos sobre papel absorbente durante 2-3 min luego se dejó al aire boca arriba durante 10 min. Se resuspendió el precipitado en 30  $\mu\text{l}$  de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) con 0,2  $\mu\text{l}$  de RNAsa a 10 mg/ml y se incubó a 37 °C en agitación durante 1 hora.

La calidad y la concentración del ADN extraído se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% utilizando el tampón TAE 1x diluido a partir de 50x (Tris 40mM, acetic acid 20mM, EDTA 1mM, pH 8,1) y tiñendo con bromuro de etidio a una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

A su vez, 2  $\mu\text{l}$  de ADN genómico, se colocaron en placa y se le añadieron 2,5  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 6x y 6  $\mu\text{l}$  de agua Mili-Q. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel. Se colocó el marcador de peso molecular de tipo  $\lambda$  (10ng/  $\mu\text{l}$ ) a unas cantidades de 25ng, 50ng y 100ng. Luego, introduciendo el gel en el tampón TAE, se pasó una corriente de 100 V durante 40 min (**Figura 10**). Finalmente, las bandas se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta. Después de determinar la concentración de cada muestra de ADN, se realizó una dilución a 1ng/ $\mu\text{l}$  a un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ .



**Figura 10.** Gel de calidad, en agarosa al 0.8%. Las bandas de la izquierda se muestra los marcadores de peso molecular tipo  $\lambda$  (10ng/  $\mu\text{l}$ ) a unas cantidades de 25ng, 50ng y 100ng.

### 3.4.4. Genotipado

En el servicio de secuenciación del IBMCP se llevó a cabo, el genotipado de los individuos de las familias 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15 usando la tecnología de curvas de fusión de alta resolución HRM (High Resolution Melting) de Applied Biosystems 7500 Fast System. Las reacciones de 10 µl se prepararon en placa de 96 pocillos que contenían 5 µl de MeltDoctor™ HRM Master Mix de Applied Biosystems, 0.3 µl de cada cebador a 10 µM, 2 µl de ADN diluido a una concentración de 1 ng/ µl y 2,4 µl de agua destilada y desionizada. La amplificación se realizó con una primera etapa de inicio a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización y extensión a respectivamente, 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min. Para finalizar con una etapa de fusión a 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 1 min. Los individuos se genotiparon usando los marcadores SNPs que marcan el punto de recombinación para cada familia (**Tabla 4**). Los resultados se analizaron con el software High Resolution Melt v2.0. Una vez teniendo los resultados de genotipados, se seleccionaron 10 plantas por familias, 5 plantas homocigóticas T y 5 plantas homocigóticas P (**Tabla 5**).

**Tabla 5. Genotipo definitivo de las plantas seleccionadas y sus puntos de recombinación. P: Homocigótico Piel de Sapo y T: Homocigótico Trigonus.**

	CMPSNP97	CI_33-B09	chr8_4752299
19M12-7; 19M12-9; 19M12-14; 19M12-15; 19M12-19.	P	P	P
19M12-13; 19M12-22, 19M12-29; 19M12-12; 19M12-10.	T	T	P
19M13-3; 19M13-10; 19M13-52; 19M13-24; 19M13-30.	T	P	P
19M13-12; 19M13-22; 19M13-32; 19M13-53; 19M13-4.	P	P	P
19M14-2; 19M14-4; 19M14-7; 19M14-12; 19M14-13.	T	P	P
19M14-11; 19M14-15; 19M14-44, 19M14-21; 19M14-37.	P	P	P
19M15-1; 19M15-7; 19M15-8; 19M15-9; 19M15-14.	P	P	P
19M15-6; 19M15-12; 19M15-27; 19M15-28; 19M15-33.	P	P	T

### 3.4.5. Trasplante y fenotipado

Las plantas fueron trasplantadas y fenotipadas siguiendo el mismo procedimiento del apartado 3.3.3. Aproximadamente a los 15 días posteriores a la polinización, se procedió un aclareo de frutos conservando únicamente 2 frutos por planta para su mejor desarrollo. Cumpliéndose



45 días de cuajado, se cosecharon los frutos, se pesaron en laboratorio y se seccionaron longitudinalmente para escanearlos.

#### **3.4.6. Análisis estadístico para los nuevos recombinantes**

Para el análisis de las familias 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15 se utilizó el software JMP pro V13.1 (SAS Institute Inc) realizando un test ANOVA de una vía.

Además se realizó una comparación de medias entre los alelos P y T, de cada familia (19M12, 19M13, 19M14 y 19M15) por separado.

# RESULTADOS

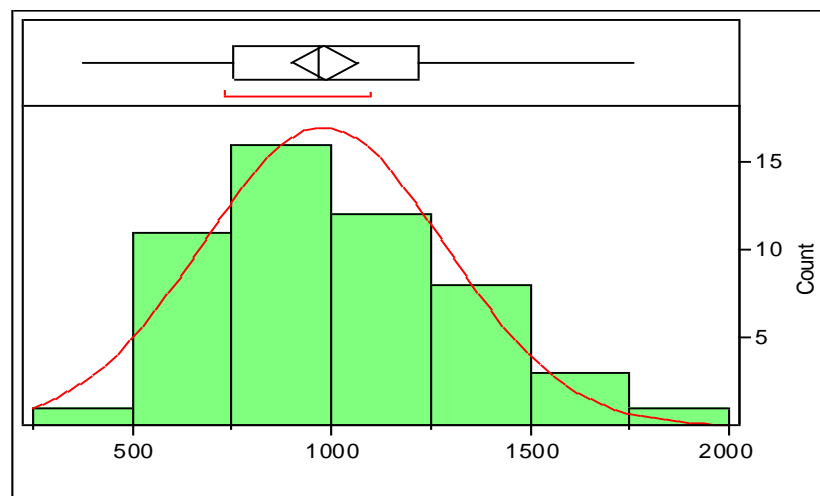
# 4. Resultado

## 4.1. F2 recombinante 2018

### 4.1.1. Variación fenotípica

Un total de 52 plantas pertenecientes a una población F2 fueron analizadas, de las cuales 33 habían sido seleccionadas por presentar una recombinación segregante en la región de *fwqt8.1*.

El peso del fruto siguió una distribución normal, no sesgada (**Figura 11**), con coincidencia de la media, la moda y la mediana en el mismo valor (967.3). El peso del fruto osciló en un intervalo comprendido entre 369.5 como valor mínimo y 1762 como valor máximo.



**Figura 11.** Distribución de los valores de peso en las 33 plantas seleccionadas de la F2 recombinante analizada en la campaña de otoño de 2018.

### 4.1.2. Asociación simple marcador-peso en el cromosoma VIII

El estudio de la asociación entre marcador-peso, se realizó para los marcadores segregantes del cromosoma VIII, que se encuentran en la región donde se localiza el QTL de tamaño de fruto *fwqt8.1*. La asociación se evaluó mediante un análisis de varianza.

Todos los marcadores situados entre las posiciones 4.094.744 hasta 4.752.299 pb mostraron diferencias significativas entre los alelos P y T para el peso de fruto. Los marcadores *chr8\_4444571* ( $p < 0.0003$ ), *chr8\_4527705* ( $p < 0.0003$ ), y *chr8\_4630816* ( $p < 0.0002$ ) fueron los que presentaron mayores diferencias observándose un aumento en el tamaño del fruto cuando está presente el alelo P en homocigosis y frutos de menor tamaño cuando el alelo es el de T en

homocigosis (**Tabla 6**), lo que indica que el QTL probabilísticamente estaría entre los marcadores chr8\_4393075 y chr8\_4752299.

**Tabla 6. Media del peso de fruto por genotipo y análisis de la varianza para los marcadores del cromosoma VIII para el peso, donde se refleja la media de los alelos, así como también el valor de P para cada marcador. mP: media para el alelo P, mT: media para el alelo T. \*: P<0,05, \*\*: P<0,01,\*\*\*P<0,001.**

Marcador	Posición (pb)	Cromosoma	Carácter	Media	Prob > F
chr8_4094744	4.094.744	VIII	Peso	mT=809.5	0.0093**
				mP=1195.69	
chr8_4179695	4.179.695			mT= 823	0.0046**
				mP= 1196.41	
CI_33-B09	4.311.140			mT= 815.715	0.0052**
				mP= 1177.38	
chr8_4393075	4.393.075			mT= 829.63	0.0069**
				mP= 1179.59	
chr8_4444571	4.444.571			mT= 739.35	0.0003***
				mP= 1192.72	
chr8_4527705	4.527.705			mT= 749.72	0.0003***
				mP= 1237.83	
chr8_4630816	4.630.816			mT= 711.06	0.0002***
				mP= 1311.72	
chr8_4752299	4.752.299			mT= 748.67	0.0011**
				mP=1265.95	
CMPSNP62	5.282.726	mT= 739.35	0.0012**		
		mP= 1254.8			

#### 4.1.3. Asociación simple marcador-peso en los cromosomas IV y XII

Las otras dos regiones genómicas segregantes, cromosoma IV y XII, fueron analizadas por separado, para ver si estaban implicadas en el tamaño de fruto de melón. El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas en el tamaño de fruto en función del alelo presente para ninguno de los marcadores analizados

En el cromosoma XII, el marcador CMPSNP284, hay una diferencia no significativa que no parece ser real, debido a que el alelo T aumenta la media para el peso del fruto, además de que la segregación del marcador es anómala lo que posiblemente se deban a fallos en el genotipado. (**Tabla 7 y Anexo 1B**).

**Tabla 7. Media por genotipo y valor F del efecto de los marcadores segregantes de los cromosomas IV y XII sobre el carácter peso del fruto, para las familias F2 recombinantes (18M64, 18M65, 18M66 y 18M69). mP: media para el alelo P, mT: media para el alelo T. \*: P<0,05, \*\*: P<0,01,\*\*\*P<0,001.**

<b>Marcador</b>	<b>Posición (pb)</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Carácter</b>	<b>Media</b>	<b>Prob &gt; F</b>		
<b>snp480</b>	362.722	<b>IV</b>	<b>Peso</b>	mP=969.83	0.2396		
				mT=1142.8			
<b>snp677</b>	29.823.907			mP=992.44	0.9323		
				mT=1003.3			
<b>snp24</b>	31.066.049			mP=927.06	0.8179		
				mT=884.2			
<b>ps07e07</b>	32.158.388			mP=979.313	0.9559		
				mT=991.8			
<hr/>							
<b>CMPSNP923</b>	2.093.562			<b>XII</b>	<b>Peso</b>	mP=946.04	0.6568
						mT=998.5	
<b>snp310</b>	5.144.113					mP=985.65	0.9441
		mT=975					
<b>ai35a08</b>	13.943.454	mP=969.29	0.6944				
		mT=915.86					
<b>CMPSNP284</b>	20.713.220	mP=874.38	0.0549				
		mT=1064.85					
<b>CI_57-E03</b>	23.570.081	mP=968.19	0.5816				
		mT=1042					

#### **4.1.4. Interacción entre marcadores de los distintos cromosomas**

Se analizó la interacción entre los marcadores segregantes de los cromosomas IV y XII con los marcadores del cromosoma VIII mediante un análisis de ANOVA dos vías. Los resultados no mostraron interacciones significativas para ninguno de los marcadores en base al tamaño del fruto (datos no mostrados).

## 4.2. Test de progenie otoño 2018

### 4.2.1. Análisis por familias del experimento del test progenie otoño 2018

Las cuatro familias del test de progenie de la campaña de otoño 2018 (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87), fueron analizadas individualmente realizando un análisis de varianza para cada una de ellas. En el **Anexo 2** se marcan los puntos de recombinación para cada familia.

Se analizaron los marcadores que segregaban para los alelos T y P en las diferentes familias. Las medias de los peso del fruto fueron significativamente diferentes para la familia 18M86 (**Tabla 8**). En esta familia la región segregante comprendía entre los marcadores CI\_33-B09 y chr8\_4752299. Aunque es la única familia que mostró diferencias significativas, la familia 18M85, cuya zona segregante comparte la región distal, mostró diferencia entre medias muy similar a 18M86, por lo que la falta de significación estadística para esta puede deberse a falta de potencia, ya que sólo pudieron obtener 3 frutos de cada clase fenotípica.

Con estos datos, aunque no es concluyente, es posible mantener la hipótesis que el QTL está entre los marcadores chr8\_4393075 y chr8\_4752299 vistos en la f2. Dado que la familia 18M87 no mostró claramente diferencias entre las clases genotípicas, se puede sugerir que la posición del QTL estaría entre chr8\_4527705 y chr8\_4752299, aunque sería necesario verificar el fenotipo de 18M85.

**Tabla 8.** Análisis de la varianza para las familias del test de progenie 2018 (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87), para los marcadores segregante del cromosoma VIII. Media para cada alelo. P: Piel de Sapo y T: Trigonus. \*: P<0,05, \*\*: P<0,01, \*\*\*P<0,001.

Familia	Media P	Media T	Prob > F
18M84	1024	954	0.8
18M85	988	730	0.3
18M86	1105	764	0.0147*
18M87	1152	1027	0.6

### 4.2.2. Análisis por familias de asociación marcador- cromosomas IV y XII

Las familias 18M84, 18M85, 18M86 y 18M87 segregaban también en otras regiones del genoma, cromosoma IV y XII. Con el objetivo de conocer el efecto de la dotación genética de estos cromosomas en el peso de fruto, se realizó un análisis de varianza para los marcadores segregantes individualmente.

**Tabla 9. Análisis de la varianza marcador- cromosomas IV y XII, de las familias segregantes en dichos cromosomas. Media por alelos y valor F para cada una de las familias analizadas, por cromosoma. .\*: P<0,05, \*\*: P<0,01,\*\*\*P<0,001.**

<b>Cromosoma</b>	<b>Familia</b>	<b>Marcador</b>	<b>Posición (pb)</b>	<b>Media</b>	<b>Prob &gt; F</b>	
<b>IV</b>	<b>18M84</b>	<b>snp677</b>	29.823.907	<b>mP=959</b>	0.72	
				<b>mT=897</b>		
	<b>18M86</b>	<b>ps07e07</b>	32.158.388	<b>mP=876</b>	0.71	
				<b>mT=960</b>		
	<b>XII</b>	<b>18M84</b>	<b>CMPSNP923</b>	2.093.562	<b>mP=879</b>	0.65
					<b>mT=983</b>	
<b>18M85</b>		<b>snp310</b>	5.144.113	<b>mP=780</b>	0.09	
				<b>mT=1163</b>		
<b>18M85</b>		<b>CMPSNP284</b>	20.713.220	<b>mP=775</b>	0.2	
				<b>mT=1102</b>		
<b>18M85</b>	<b>CMPSNP284</b>	20.713.220	<b>mP=890</b>	0.86		
			<b>mT=844</b>			

Las medias entre los alelos P y T presente en los marcadores estudiados en cada grupo de ligamiento (LG), no mostró diferencias significativas para el carácter peso del fruto, en ninguna de las familias estudiadas. (**Tabla 9**), se presentan los datos de media y valor F de cada una de las familias analizadas, por cromosoma. La familia 18M87 no tuvo ningún marcador segregante en las regiones extras estudiadas.

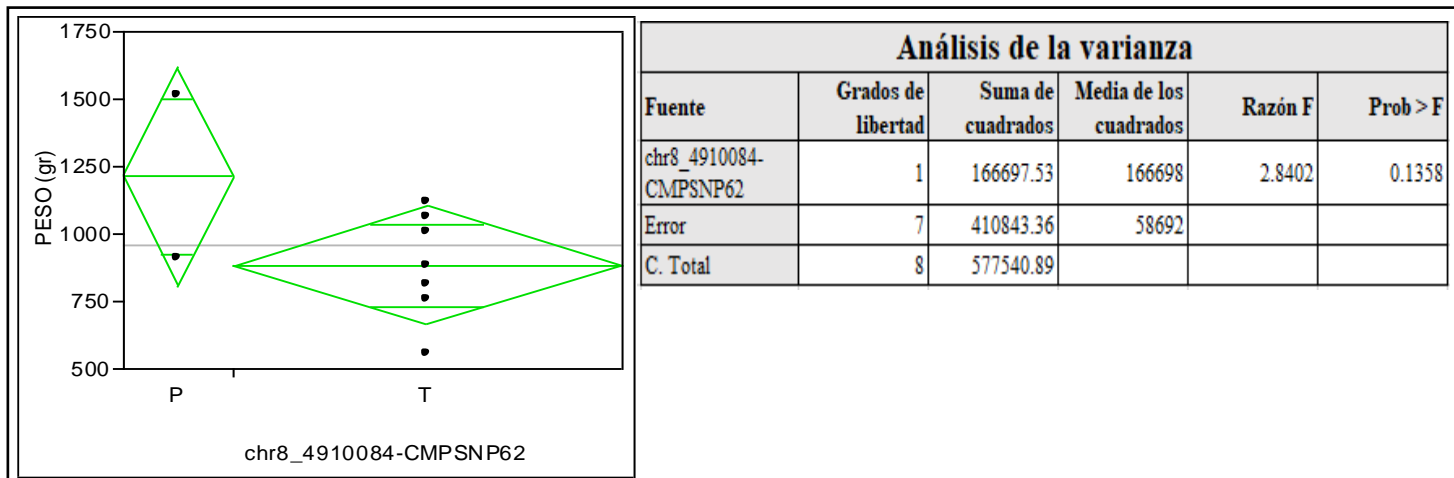
#### **4.2.3. Interacción entre marcadores**

Se analizó la interacción entre todos los marcadores de los cromosomas IV, VIII, y XII, mediante ANOVA a dos vías, no encontrándose ninguna interacción epistática significativa en ninguno de los casos (datos no mostrados).

### **4.3. Verificación test de progenie anteriores**

#### **4.3.1. Test de progenie 2017**

En el análisis de las familias con los genotipos en el extremo derecho del cromosoma VIII (19M51 y 19M52) del experimento de 2017, no se encontraron diferencias significativas para la media de los alelo P y T en ninguno de los tres marcadores segregantes (chr8\_4910084, chr8\_5166994 y CMPSNP62) con una probabilidad  $p > 0.1358$  (**Figura 12**).



**Figura 12. ANOVA de una vía para los marcadores segregantes del extremo derecho del LG VIII. \*: P<0,05, \*\*: P<0,01,\*\*\*P<0,001.**

El análisis del peso de fruto por familia no mostró tampoco diferencias significativas para las medias del peso de fruto de cada familia. Los resultados de la prueba Tukey-Kramer HSD mostraron la misma letra para todas las familias (**Tabla 10**). Lo que indica que el QTL no está en el extremo distal de la región del cromosoma VIII, aunque sólo dos frutos se pudieron obtener en la familia 19M51, por lo que no se considera conclusivo estos resultados, esta familia deberá de volver a evaluarse.

**Tabla 10. Comparación de media de las familias experimentales mediante una prueba de Tukey-Kramer HSD.**

Familia	Media	Tukey-Kramer HSD
19M51	1216	A
19M52	888	A

#### **4.3.2. Test de progenie 2018**

La verificación del test de progenie de 2018 se hizo comparando familias recombinantes contra familias no recombinantes. En la comparación de las familias 19M17-19M19 recombinante y con el alelo P en homocigosis en el intervalo de los marcadores CI\_33-B09 y Chr8\_4752299, contra las familias no recombinantes con el alelo T en homocigosis en toda el cromosoma CMPSNP97 y Chr8\_4752299 (19M20-19M25), no presentaron diferencias significativas en cuando a la media del peso del fruto en función a los alelos presentes (**Figura 13**), lo que sugiere que el *fwqt8.1* estaría hacia la izquierda de CI\_33-B09.



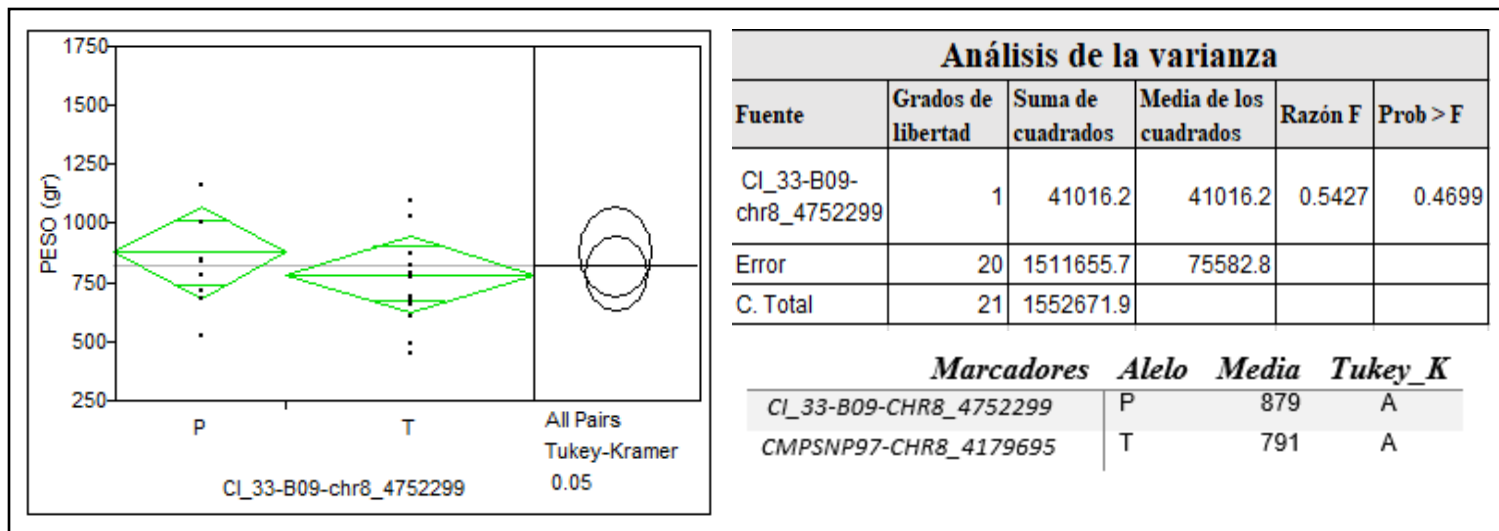


Figura 13. ANOVA y test de Tukey-K entre las familias 19M17-19M19 (P en la región recombinante) y 19M20-19M25, del experimento verificación del test de progenie 2018. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Luego, la comparación de las familias 19M26-19M30 fijadas para el alelo T en todo el cromosoma contra las familias 19M31-19M34 recombinante y con el alelo P en homocigosis en el intervalo de los marcadores CMPSNP97 a Chr8\_4527705, no mostraron diferencias significativas respecto al peso del fruto en función del alelo presente (Figura 14). En este caso la región no segregante estará en el extremo opuesto, lo que sugiere *fwqt8.1* estaría a la derecha del Chr8\_4527705.

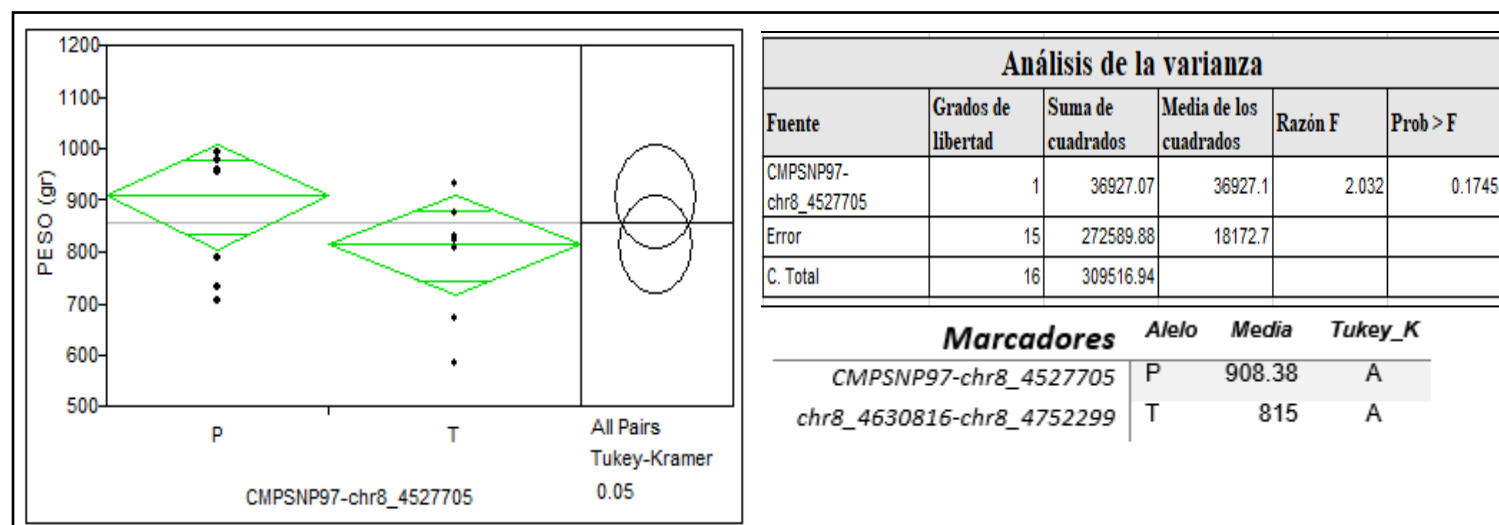


Figura 14. ANOVA y test de Tukey-K para las familias 19M31-19M34 recombinantes del experimento verificación del test de progenie 2018. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Las diferencias se observaron mediante una prueba ANOVA de una vía, y el test Tukey-Kramer HSD para familia analizada (Figura 14 y 15).

La comparación de medias de las familias recombinantes (19M17 a 19M19 y 19M31 a 19M34) contra no recombinantes (19M20-19M30) no mostró diferencias significativas entre familias con una probabilidad  $p > 0.2105$  (Figura 15 y Tabla 11).

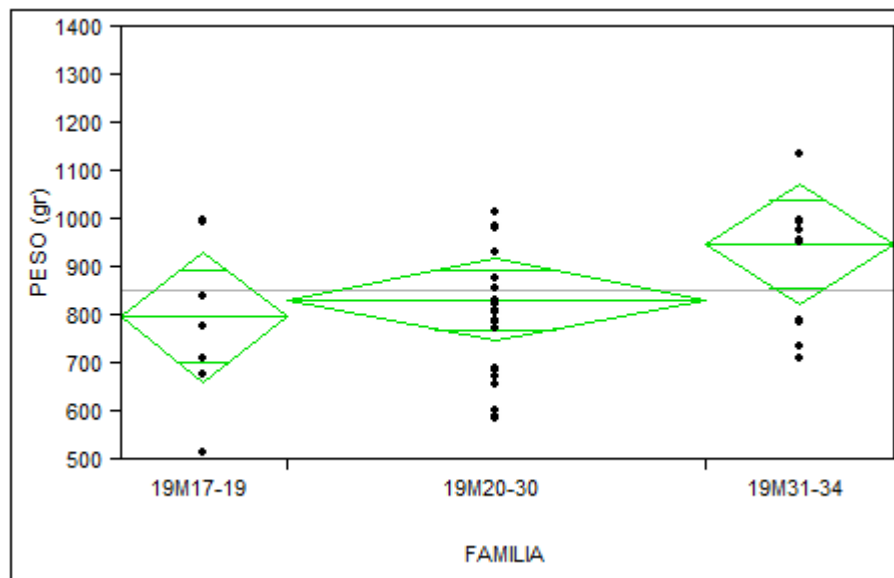


Figura 15. ANOVA de una vía entre familias recombinantes (19M17-19M19 y 19M31-19M34) y fijadas para el alelo T (19M20-19M30).

Tabla 11. Resultados del ANOVA para la comparación de familia recombinante contra no recombinante. Media para cada alelo. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Análisis de varianza					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
FAMILIA	2	115537.5	57768.7	1.6319	0.2105
Error	34	1203601.7	35400.1		
C. Total	36	1319139.2			

El análisis de Tukey-Kramer HSD no mostró diferencias significativas entre familias. Lo que implica que el QTL posiblemente no se encuentre en los extremos del cromosoma VIII, resultados que respaldan lo que hemos visto en los experimentos anteriores (Tabla 12).

Tabla 12. Prueba de Tukey-Kramer HSD para las familias recombinantes y no recombinantes. Las familias no conectadas por la misma letra son significativamente distintas.

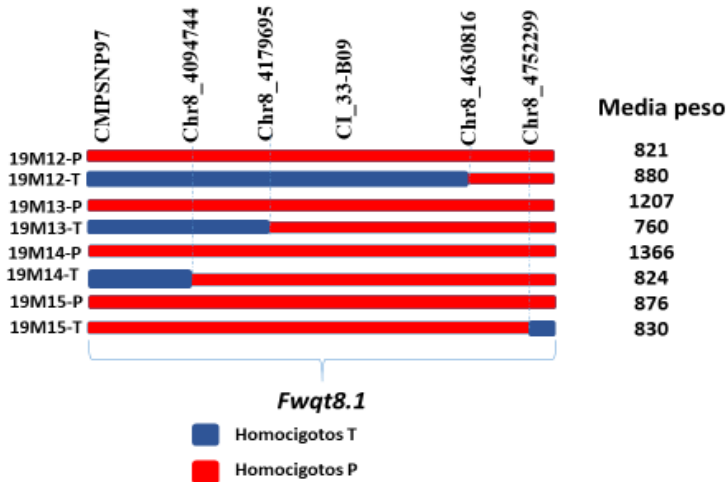
FAMILIA	Media	Tukey-Kramer
19M31-34	950	A
19M17-19	833	A
19M20-30	798	A

## 4.4. Análisis de nuevos recombinantes

### 4.4.1. Comparación de las familias por separado

Las familias empleadas para este experimento presentaban recombinación en distintos puntos del intervalo comprendido entre los marcadores CMPSNP97 y Chr8\_4752299 (**Anexo 5**). El análisis de la varianza, dentro de cada familia por separado, mostró diferencias significativas para las familias 19M13 y 19M14 con disminución del tamaño del fruto cuando el alelo T estaba presente (**tabla 13**). Las familias 19M12 y 19M15, no mostraron diferencias significativas, aunque el tamaño de los frutos son muy pequeños con comparación con lo esperado para Piel de Sapo, incluso comparando con las plantas 19M13-P y 19M14-P, lo que pone en sospecha de que estas familias tengan otro QTL de peso de fruto fijado. Atendiendo al resultado de las familias 19M13 y 19M14, sitúan al *fwqt8.1* a la izquierda de chr8\_4179695.

**Tabla 13. Resultados del ANOVA para las familias de los nuevos recombinantes. Media para cada alelo. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus. \*: P<0,05, \*\*: P<0,01, \*\*\*P<0,001.**



Familia	Media P y T	prob >F
19M12	mP=821	0.8512
	mT=880	
19M13	mP=1207	0.0484*
	mT=760	
19M14	mP=1366	0.0344*
	mT=824	
19M15	mP=876	0.5414
	mT=830	

## 4.5. Mapeo Fino global del *fwqt8.1*

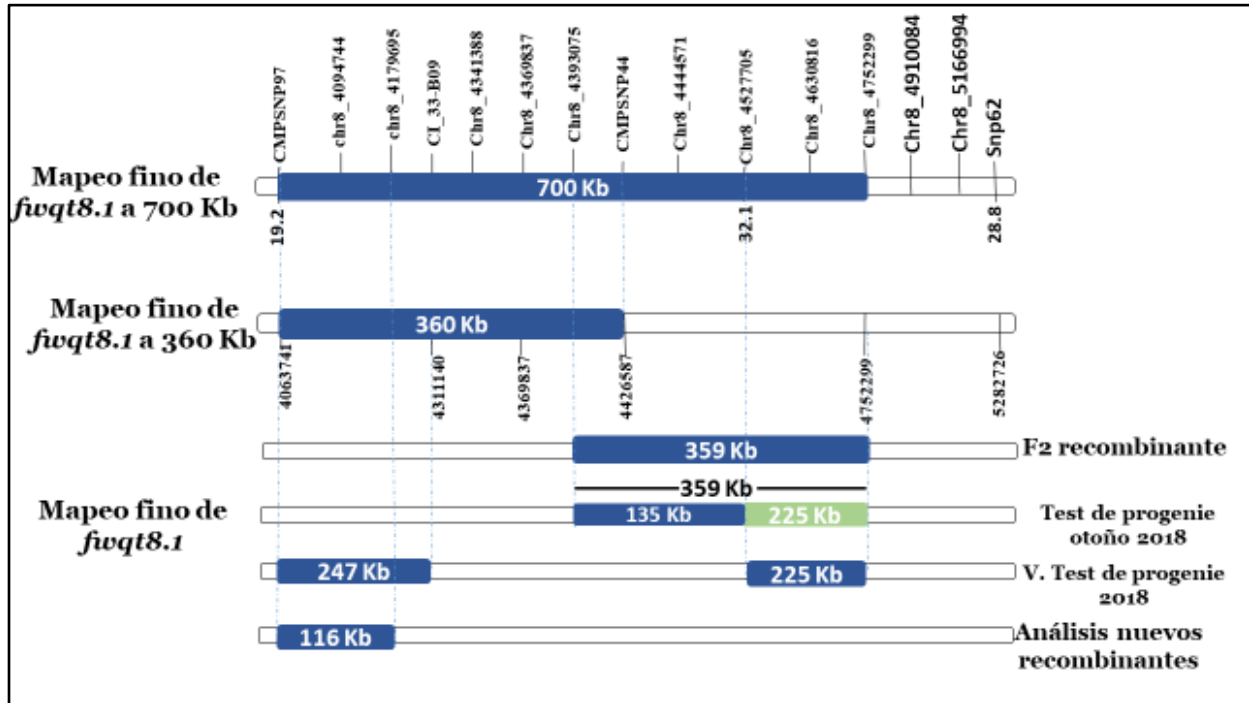


Figura 16: Resumen de las conclusiones de los análisis de las distintas test de progenie.

# DISCUSIÓN

## 5. Discusión

### 5.1. Verificar posición del *fwqt8.1* en el cromosoma VIII

El objetivo de localizar con mayor precisión la posición exacta del QTL asociado al tamaño del fruto en melón se abordó en diferentes experimentos. La región en la que se ha centrado el trabajo se había delimitado anteriormente en la posición 4.063.741 y 4.752.299 pb (Díaz et al., 2017) observándose una disminución del carácter cuando está presente el alelo T.

El análisis de la primera población, una F2 segregante seleccionada con alta recombinación en la región de *fwqt8.1*, indicó que el QTL estaría localizado entre los marcadores Chr8\_4393075 y Chr8\_4752299. Comparando con los resultados obtenidos anteriormente en la tesis de máster realizada por Riahi (2018) donde localizan el *fwqt8.1* en una región de 360 Kb entre los marcadores CMPSNP97 y CMPSNP44, se solapa con los resultados actuales entre los marcadores Chr8\_4393075 y CMPSNP44 la zona compartida en ambos experimentos (**Figura 16**). Por tanto, los resultados son compatibles entre los dos trabajos.

Los resultados del test de progenie 2018 donde la familia 18M86 presento diferencias significativas para la región homocigótica para el alelo P en comparación con la región del alelo T en homocigosis, nos permite confirmar que la zona del *fwqt8.1* está dentro de la zona propuesta anteriormente, viéndose diferencias significativas en función del alelo presente, resultados que concuerdan con los obtenidos en la F2. Además, podemos proponer la región entre los marcadores Chr8\_4527705 y Chr8\_4752299 como posible posición de *fwqt8.1*.

La verificación del test de progenie 2017 no fue conclusiva debido al bajo número de individuos homocigóticos para el alelo P, por lo que los datos no son estadísticamente válidos, con este experimento el objetivo era estudiar el extremo derecho del cromosoma VIII, donde se encuentran los marcadores segregantes chr8\_4910084, chr8\_5166994 y CMPSNP62 (**Figura 12**).

Con las familias experimentales utilizadas cuesta establecer una delimitación de la posición del *fwqt8.1* correctamente, lo que podría explicarse con la alteración de algunos datos por las condiciones de cuajado y al bajo número de frutos obtenidos, lo que se pudo ver afectado por varios factores, entre ellos la temperatura, debido a que influye en el desarrollo y buen cuajado de las flores del melón, las bajas temperaturas pueden inhibir el desarrollo de flores masculinas después de la diferenciación, determinando una precoz aparición de flores femeninas. Para la

cuaja de frutos la temperatura debería ser de 20-23-°C, lo que hace que el cultivo del melón sea de épocas de primavera-verano (Abarca et al., 2017).

En el estudio realizado por (Vegas et al., 2013), se creó un mapa genético de mediana resolución de la región donde se localiza el locus *ETHQV6.3* responsable de la maduración climatérica del fruto del melón, localizado entre los marcadores CMBR002 y CMN61\_14, que posteriormente mediante un estudio de recombinantes originados en el mismo estudio, sitúan al QTL entre los marcadores FR14-P22 y CMCIN41, pero debido a que los resultados obtenidos se basan en información de un solo fruto por planta como consecuencia de las condiciones de cuajado, se sugirió que la nueva posición debían confirmarse mediante un test de progenie en experimentos posteriores, debido a que los resultados obtenidos pueden inducir a errores.

## **5.2. Fondo genético e interacción**

En nuestro trabajo no se observó efecto de loci en los cromosomas IV y XII en el tamaño del fruto, ninguno de los marcadores segregantes mostró diferencias significativas entre las clases genotípicas. Estos cromosomas se han visto implicados en otros rasgos relacionados con la domesticación. Riahi, (2018) estudió el efecto del cromosoma IV sobre la expresión genética del contenido de pulpa en melón, donde se reveló un efecto positivo de la introgresión de T en dicho cromosoma sobre el contenido en pulpa. Anteriormente se ha identificado el QTL (pm-r) en el LG XII posiblemente relacionado al gen recesivo que confiere resistencia a oídio en el cultivo de melón para las razas 1, 2 y 5 (Beraldo P. 2015).

Riahi, (2018) en su análisis de asociación marcador-peso, encontró una diferencia significativa en la media de los marcadores situados en el cromosoma VI para este carácter, explicando que posiblemente eso se deba a la presencia en esa misma región de un QTL implicado en el tamaño del fruto (*fwqt6.1*) descrito previamente por Díaz et al., (2017), donde también se describieron otros QTLs, en el cromosoma II (*fwqt2.1*) y IV (*fwqt4.1*) relacionados con este carácter.

El análisis de epistasia realizado en este estudio, con el fin de detectar los supuestos efectos de otras regiones genómicas para el carácter peso del fruto, se estudiaron todas las posibles interacciones entre los distintos LG del genoma de melón. Los resultados demuestran que no existen interacciones entre diferentes regiones, debido a que no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las combinaciones digénicas. La ausencia de epistasia en estos experimentos de F2 recombinante y test de progenie otoño 2018, nos lleva a decir que la única

zona implicada en la expresión del *fwqt8.1* sobre el tamaño del fruto del melón, es la que está en el cromosoma VIII.

La posición del *fwqt8.1* que ha sido estudiada en este trabajo, concuerdan con las reportadas por Díaz et al., (2017) donde posiciona al *fwqt8.1* en el LG VIII. García et al., (2015) encontraron co-localización con genes miembros de familias génicas implicadas en morfología del fruto en tomate: SUN responsable de la forma alargada del tomate, en el caso de *fwqt2.1* y *fwqt4.1* y OFP, CNR y WOX en el caso de *fwqt8.1*.

Estos genes habían sido descrito anterioremente: los OFP (Ovate Family Proteins) regulan el alargamiento del tomate (Liu et al. 2002), mientras que la familia de genes CNR (Cell Number Regulator) controla el tamaño del fruto en el tomate (Frary et al., 2000), entre otras especies. La familia de genes WOX (homeobox relacionado con Wuschel) se ha descrito para controlar el número de lóbulos de tomate (Muños et al. 2011). En las regiones que contienen el QTL del tamaño en LGIV (*pca1qt4.1* y *fwqt4.1*), se ha encontrado un gen homólogo en tomate que regula el tamaño del fruto en la secuencia del melón (*CmCNR2*). Del mismo modo, otros miembros de la familia CNR (*CmCNR4*, 6, 7) se encuentran en la región de LGVI que alberga QTL relacionado con el tamaño (*fwqt6.1*, *fwqt6.1* y *pca1qt6.1*). En el caso de *fwqt8.1* QTL de interés en esta tesis de máster, se han descubierto genes homólogos para algunos que controlan el tamaño en tomate, como lo son: Wuschel (*CmWuschel3*) y KLU / FW3.2 (*Cmfw3.2-5*), este último regula la división celular en frutos de tomate (Monforte et al., 2014).

Esta información ha sido validada en varios estudios realizados con el fin de conocer sobre las bases genéticas de los cambios de la morfología del fruto en el tomate durante el proceso de domesticación y transfiriendo esa información al melón para investigar si la variación de la morfología del fruto de Cucurbitaceae puede deberse a genes ortólogos y/o homólogos encontrados en el tomate.



### 5.3. Mapeo Fino global de *fwqt8.1*

Los resultados de todos los experimentos realizados muestran un efecto en el peso en diferentes regiones del cromosoma VIII, siempre dentro del área donde se localiza el QTL *fwqt8.1*. En la estrategia de mapeo por sustitución se asume que cuando el carácter co-segrega con la región recombinante, el QTL está localizado en esa región, mientras que cuando no hay segregación se asume que no está en la región recombinante, sino en la región fijada. El mapeo por sustitución cuadra razonablemente bien en el caso del experimento de test de progenie de otoño 2018 (familias 18M84-18M86). En el caso del experimento de verificación del test de progenie 2018 no se encuentra ninguna co-segregación en las familias 19M17-19M25 y 19M26-19M34.

Para asegurarnos, hacemos el mapeo fino sólo con las familias en las que encontramos co-segregación: la F2 recombinante y el test de progenie otoño 2018 que nos dice que el QTL posiblemente se encuentra en la región comprendida entre los marcadores Chr8\_4393075 y Chr8\_4752299, es decir, a la derecha del cromosoma VIII y el experimento de los nuevos recombinantes, las familias 19M13 y 19M14 posiciona el QTL entre los marcadores CMPSNP97 y Chr8\_4179695 a la izquierda del cromosoma (**Figura 16**).

Esto podría explicarse a la presencia de múltiples QTLs en la región o en otras regiones cromosómicas que no hemos identificado. Se han reportado casos similares en varios estudios. Por ejemplo, anteriormente, un QTL para resistencia a *Phytophthora infestans* en el cromosoma 5 de *Solanum habrochaites* fue mapeado e introgresado en tomate cultivado (*S. lycopersicum*). Se generaron líneas casi isogénicas (NIL) y se usaron para el mapeo fino de este QTL, que reveló un QTL coincidente o vinculado con efectos indeseables en el rendimiento, la madurez, el tamaño del fruto y los rasgos de la arquitectura de la planta. Posteriormente, en un mapeo de alta resolución en el cromosomas 5 sub-NIL reveló la presencia de múltiples QTLs relacionados con la resistencia al patógeno (*P. infestans*) dentro de una región de 12,3 cM (Erron et al., 2013).

Esta complejidad genética, que incluye múltiples QTL estrechamente vinculados, también han reportado en otras especies como el Maíz donde tras el cruce dos accesiones: B73 × Mo17 para un mapeo de mayor resolución, se detectó un efecto importante sobre el rendimiento de grano y otros rasgos relacionados con el rendimiento en el cromosoma 5, es este cromosoma se detectaron al menos dos QTL cuyos efectos parecen actuar de manera dominante (Graham et al. 1997). Otro ejemplo fue el reportado por Pasyukova et al. (2000) en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), donde tras una análisis de mapeo de deficiencia indica que existen múltiples QTL

estrechamente vinculados que afectan la variación en la vida útil del insecto en los intervalos de cromosoma 2 y cromosoma 3. Casos similar ocurrió en estudio realizado en ratones (Mollah et al.,2011) y ratas (Granhall et al. 2006 ).

Por lo que basado en estos estudios podemos atribuir las diferentes zonas propuestas en los experimentos, a la acción de dos QTLs ligados.

Las familias 19M13 y 19M14 nos permiten posicionar el QTL a la zona izquierda del cromosoma, entre los marcadores CMPSNP97 y chr8\_4179695 con una distancia de 116 Kb siendo 244 Kb menos a lo propuesto en la tesis de Riahi (2018). En esta posición se encuentran un total de 12 genes anotados (MELO3C007611 hasta MELO3C007622), según la anotación génica en la secuencia del genoma de referencia del melón disponible en MELONOMICS (<http://melonomics.cragenomica.es>). Ninguno coincide con los 4 genes propuestos por Riahi (2018): (MELO3C007628, MELO3C007630, MELO3C007661, MELO3C007675).

Por otro lado la posición delimitada con las familias de la F2 recombinante y el test de progenie otoño 2018 posicionan al QTL entre los marcadores Chr8\_4393075 y Chr8\_4752299, región derecha del cromosoma, en dicha zona se encuentran aproximadamente 27 genes anotados. De la cual 1 había sido descrito previamente relacionado con el tamaño del fruto:

**MELO3C007675:** situado en la posición 4.570.242 y 4.573.666 pb, este gen es similar BAM1 que codifica “Leucine-rich repeat receptor like kinase”, necesario para el desarrollo de gametofitos masculinos, así como para la especificación y función de los óvulos. Participa en el proceso de comunicación célula-célula requerido durante el desarrollo temprano de las anteras, y regula la división y diferenciación celular para organizar las capas celulares. Requerido para el desarrollo de hebras vasculares de alto orden dentro de la hoja y un control correlacionado de la forma, el tamaño y la simetría de la hoja (Uniprot; <https://www.uniprot.org/>).

Este gen ya se había propuesto por Riahi (2018) como posible gen candidato de este carácter.

# **PERSPECTIVAS FUTURAS**

## **6. Perspectivas futuras**

A partir de los estudios y discusiones realizados en la presente tesis de máster, las perspectivas para trabajos futuros se orientan a la siguiente dirección:

- Volver a evaluar las familias que no han sido conclusivas, con más réplicas de plantas.
- Generar recombinantes a partir de genotipos que han recombinando para los dos posibles QTLs.
- Saturar con más marcadores SNP, lo que permitiría detectar dichos puntos de recombinación y realizar una evaluación del fenotipo del carácter peso del fruto en pruebas de progenie.
- Futuras evaluaciones, aumentar el número de réplicas.

# CONCLUSIONES

## 7. Conclusiones

Las conclusiones que pueden derivarse de esta presente tesis de máster basándonos en los resultados obtenidos, son las siguientes:

- El análisis de las diferentes familias experimentales, ha permitido comprobar el efecto del *fwqt8.1* en el cromosoma VIII, observándose una variación fenotípica importante en cuanto a tamaño del fruto cuando está presente el alelo T en homocigosis en dicho cromosoma, induciendo a frutos más pequeños en comparación con el alelo P homocigoto.
- Los cromosomas IV y XII no muestran ninguna influencia en la expresión de este carácter, con lo cual se puede concluir con la ausencia de epistasia y por tanto solo la zona del cromosoma VIII está implicado en el control genético del *fwqt8.1*.
- Las dos regiones propuestas por las diferentes familias experimentales, nos lleva a concluir la acción de dos QTLs implicados en el peso del fruto dentro del LG VIII.

# Referencias bibliográficas

- Andrews AC (1956).** Melons and Watermelons in the Classical Era. *Osiris* 12: 368–375.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991).** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:208–218.
- Abarca R (2017).** Manual de manejo agronómico para cultivo de melón. Instituto de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) 01:17-92.
- Bisognin DA (2002).** Origin and evolution of cultivated cucurbits. *SciElo* 32: 715– 723.
- Brotman Y, Normantovich M, Goldenberg Z, Zvirin Z, Kovalski I, Stovbun N., Doniger T, Bolger A.M., Troadec C., Bendahmane A., Cohen R., Katzir N., Pitrat M., Dogimont C. & Perl-Treves R. (2013).** Dual resistance of melon to *Fusarium oxysporum* races 0 and 2 and to Papaya ring-spot virus is controlled by a pair of head-to-head-oriented NB-LRR genes of unusual architecture. *Mol Plant* 6: 235-8.
- Collard B, Jahufer M, Brouwer J, Pang E (2005).** An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Cohen S, Itkin M., Yeselson Y., Tzuri G., Portnoy V., Harel-Baja R., Lev S., Sa'ar U., Davidovitz-Rikanati R. & Baranes N et al., (2014)** The PH gene determines fruit acidity and contributes to the evolution of sweet melons. *Nature communications*. PubMed 5:4026-4051.
- Díaz A, Zarouri B, Fergany M, Eduardo I, Álvarez JM, Picó B, Monforte AJ (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. doi: 10.1371/journal.pone.0104188.
- Díaz A, Martín AM, Dolcet R, Garcés A, Álvarez JM, Garcia-Mas J, Picó B, Monforte AJ (2017).** Quantitative trait loci analysis of melon (*Cucumis melo L.*) domestication-related traits. *Theor Appl Genet* 10: 1-20.
- Diaz A, Fergany M, Formisano G, Ziarsolo P, Blanca J, Fei Z, Staub JE, Zalapa JE, Cuevas HE, Dace G, Oliver M, Boissot N, Dogimont C, Pitrat M, Hofstede R, Van Koert P, Harel-Beja R, Tzuri G, Portnoy V, Cohen S, Schaffer A, Katzir N, Xu Y, Zhang H, Fukino N, Matsumoto S, Garcia-Mas J, Monforte AJ (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: 111. doi: 10.1186/1471-2229-11-111.

**Doebley JF, Gaut BS, Smith BD (2006).** The Molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309–1317.

**Doyle J, Doyle J (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13–15.

**Endl J, Achigan E.G, Pandey A. K, Monforte A.J., Picó 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: 1-10.

**Erron H, Johnson EB, y St. Clair D (2014).** Multiple QTL for Horticultural Traits and Quantitative Resistance to *Phytophthora infestans* Linked on *Solanum habrochaites* Chromosome 11. *PMC* 5(2): 219-233.

**Erron H, Johnson EB, y St. Clair D (2013).** Linkage Relationships Among Multiple QTL for Horticultural Traits and Late Blight (*P. infestans*) Resistance on Chromosome 5 Introgressed from Wild Tomato *Solanum habrochaites*. *G3 (Genes, Genomas, Genetica)* 3: 2131-2146.

**Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Van der Knaap E, Cong B, Liu JP, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000).** A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289:85-88.

**FAOSTAT (2017).** Estadísticas agrícolas de melón: producción, superficie y rendimiento. Recuperado de: <https://blogagricultura.com/blog/>.

**Feder A., Burger J., Gao S., Lewinsohn E., Katzir N., Schaffer A.A., Meir A., Davidovich- Rikanati R., Portnoy V. & Gal-On A. (2015)** A Kelch domain-containing F-box coding gene negatively regulates flavonoid accumulation in *Cucumis melo* L. *PubMed* 169(3):1714-1726.

**Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, Gonzalez VM, Henaff E, et al. (2012).** The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceeding of the National Academy of Sciences (PNAS)* 109: 11872–11877.

**Graham GI, Wolff D y Stuber C (1997).** Characterization of a Yield Quantitative Trait Locus on Chromosome Five of Maize by Fine Mapping. *ACSESS DL*. 5: 1601-1610.



**González-Guerrero M, et al. (2007).** GintMT1 codifica una metalotioneína funcional en los intraradices de *Glomus* que responde al estrés oxidativo. *Micorriza* 17 (4): 327-335.

**Gonzalo MJ; Díaz A; Dhillon N; Reddy U; Picó B; Monforte AJ (2019).** Re-evaluation of the role of Indian germplasm as center of melon diversification based on genotyping-by-sequencing analysis. *BMC Genomics* 20: 3-13.

**Hammer K. (1984).** Das Domestikations syndrom. Die Kulturpflanze *PLOS Genetics*. 32: 11–34  
[doi 10.1371 / journal.pgen.1003604](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003604).

**Jeffrey C. (1980).** A review of the Cucurbitaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 81:233–247.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676>.

**Joobeur T, King J.J, Nolin S.J, Thomas C.E. & Dean R.A. (2004).** The Fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J* 39, 283-97.

**Krístkova E, Lebada A, Vinter V, Blahousek O. (2003).** Genetic resources of the genus *Cucumis* and their morphological description. *Horticultural Science* 30: 14–42.

**Kirkbride JH (1993).** Biosystematic Monograph of the Genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): Botanical Identification of Cucumbers and Melons. US Department of Agriculture. Parkway Publishers. 46:82-159.

**Liu JP, Van Eck J, Cong B, Tanksley SD (2002).** A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *PubMed* 99(20):13302-13306.

**Manniche L. (1989).** An ancient Egyptian herbal, University. *Near Eastern Studies* 53:176-p.

**Meirano V. (2000).** Mets et végétaux en Grande Grèce : nouvelles données de la coroplathie. *Pallas*: 167–180.

**Monforte AJ, 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* 65:4625–4637.

**Monforte AJ, Garcia-Mas J, Arus P (2003).** Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding* 122: 153–157.

**Monforte AJ, Eduardo I, Abad S, Arús P (2005).** Inheritance mode of fruit traits in melon: Heterosis for fruit shape and its correlation with genetic distance. *Euphytica* 144: 31–38.

**Muños S, Ranc N, Botton E, Bérard, A., Rolland, S., Duffé, P, Carretero Y, Le Paslier MC, Delalande C, Bouzayen, Brunel, D, Causse M (2011).** Increase in tomato locule number is controlled by two SNPs located near WUSCHEL. *Plant Physiol* 156:2244-2254.

**Nieto C, Morales M., Orjeda G, Clepet C, Monforte AJ, Sturbois B, Puigdomenech P, Pitrat M, Caboche M. & Dogimont C (2006).** An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal* 48, 452-62.

**Pauquet J, Burget E, Hagen L, Chovelon V, Menn A.I, Valot N, Desloire S, Caboche M, Rousselle P. & Pitrat M (2004).** Map-based cloning of the Vat gene from melon conferring resistance to both aphid colonization and aphid transmission of several viruses. *ProdINRA* 97:325-329.

**Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, et al (1998).** Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335: 721-726.

**Pasyukova EG, Vieira C y Mackay T (2000).** Mapeo de deficiencias de loci de rasgos cuantitativos que afectan la longevidad en *Drosophila melanogaster*. *GNETICS* 156: 1129-1146.

**Paris H (2016).** Overview of the origins and history of the five major cucurbit crops : issues for ancient DNA analysis of archaeological specimens. *Vegetation History and Archaeobotany* 25: 405–414.

**Périn C, Hagen L S, Giovinazzo N, Besombes D, Dogimont C and Pitrat M (2002).** Genetic control of fruit shape acts prior to anthesis in melon (*Cucumis melo L.*). *Mol genet genomics* 266: 933-941.

**Pitrat M (2017).** Melon Genetic Resources: Phenotypic Diversity and Horticultural Taxonomy. In: Grumet R, Katzir N, Garcia-Mas J, editors. *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae*. Springer International Publishing, 20:25–60.

**Pitrat M (2012).** Domestication and diversification of melon. In: Sari S and A, editor. Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. Antalya (Tukey), p 31-40.

**Poole CF, Grimball PC (1939).** Inheritance of sex forms in *Cucumis melo L.* *Journal of Heredity* 30: 21–25.

**Ramamurthy RK, Waters BM (2015).** Identification of fruit quality and morphology QTLs in melon (*Cucumis melo*) using a population derived from flexuosus and cantalupensis botanical groups. *Euphytica* 204:163–177.

**Renner S.S., Schaefer H. & Kocyan A. (2007).** Phylogenetics of *Cucumis* (*Cucurbitaceae*): cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *PubMed* 10:7-58.

**Riahi C (2018).** Caracterización y mapeo fino de QTLs implicados en la domesticación de melón (*Cucumis melo. L*) (tesis de máster). Laboratorio de genómica en mejora vegetal del IBMCP, Universidad Politécnica de Valencia, España.

**Rios 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). Universidad Autónoma de Barcelona, España.

**Sterken R, Kiekens R, Boruc J, Zhang F, Vercauteren A, Vercauteren I, Smet L, Stijn Dhondt, Inzé D, Veylder L, Russinova E (2012).** El mapeo combinado de ligamiento y asociación revela CYCD5; 1 como un gen de rasgo cuantitativo para la endoreduplicación en *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*. 109 (12): 4678-4683.

**Sebastian P, Schaefer H, Telford IRH, Renner SS (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: 14269–73.

**Stepansky A, Kovalski I, Schaffer A.A. & Perl-Treves R. (1999).** Variation in sugar levels and invertase activity in mature fruit representing a broad spectrum of *Cucumis melo* genotypes. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 53-62.

**Tzuri G, Zhou X, Chayut N, Yuan H, Portnoy V, Meir A., Sa'ar U., Baumkoler F, Mazourek M, Lewinsohn E., Fei Z, Schaffer A.A, Li L, Burger J, Katzir N. & Tadmor Y. (2015)** A 'golden' SNP in *CmOr* governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*). *Plant J* 82, 267-79.

**Valverde R (2007).** Mapeo genético y detección de QTLs en especies de *Solanum*. *Agronomía Costarricense* 31(2): 31-47.

**Vegas J (2013).** Estudio genético de la maduración del fruto en melón en la línea isogenica SC3-5-1 (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, España.

**Wu R., Lin M. (2018).** Functional mapping-how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 7, 229–237.

# **Anexo**

Anexo 1A: Genotipo de las plantas para el cromosomas VIII, de la familia 18M64, 18M65, 18M66 y 18M69 de la F2 recombinante. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus, H: heterocigótico. En rojo los marcadores flanqueantes e intermedio.

PLANTA	CMPSPN97	chr8_4094744	chr8_4179695	CI_33-B09	chr8_4393075	chr8_4444571	chr8_4527705	chr8_4630816	chr8_4752299
18M65-38	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M65-57	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M66-57	H	T	T	T	T	T	T	T	T
18M65-45	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M65-47	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M65-24	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M66-61	T	H	T	T	T	T	H	T	P
18M66-29	H	T	T	T	T	T	T	T	T
18M64-42	P	H	H	H	H	H	H	H	H
18M66-38	P	P	P	P	P	H	H	H	H
18M69-33	H	H	-	T	T	T	T		T
18M69-109	H	H	T	T	T	T	T	T	T
18M64-37	H	H	T	T	T	T	T		T
18M66-15	H	T	T	T	T	T	T	T	T
18M65-68	H	H	H	H	H	H	H	T	T
18M66-67	H		T	T	T	T	T	T	T
18M64-28	H	T	T	T	T	T	T	T	-
18M65-56	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M69-54	H	H	H	P	P	P	P	P	P
18M64-11	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M65-66	T		T	H	H	H	H	H	H
18M65-33	H		H	H	H	H	H	H	H
18M64-36	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M65-48	H	H	H	H	H	H		H	H
18M64-33	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M66-21	H	P	P	P	P	P	P	P	P
18M65-50	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M69-111	H	H	H	H	T	T	T		T
18M64-2	H		H	H	H	H	H	H	H
18M69-103	H	H	P	P	P	P	P	P	H
18M64-14		P	P	P	P	P	P	H	H
18M64-24	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M64-13	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M66-16	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M64-3	H	-	H	H	H	H	H	H	H
18M65-60	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18M66-68	H	H	H	P	P	P	P		P
18M69-37	P	P	P	P	H	H	H	H	H
18M69-142	P	P	P	P	P	P	P	P	H
18M66-51	P	H	H	H	H	H	H	H	H
18M69-174	P	P	P	H	H	H	H	H	H
18M69-143	T	T	T	T	T	H	H	H	H
18M69-182	P	P		H	H	H	H	H	H
18M66-19	H	P	P	P	P	P	P	P	P
18M64-76			T	T	T	H	H	H	H
18M66-64	P	P	H	H	H	H	H	H	H
18M64-27		H	H	H	H	H	H	H	P
18M66-5	P	P	H	H	H	H		H	H
18M66-83	H	H	H	P	P		P	P	P
18M69-89	H	P	P	P	P	P	P	P	P
18M69-147	H	H	H	H	H	H	P	P	P
18M66-66	H	H	P	P	P	P		P	P

**Anexo 1B: Genotipo de las plantas para los cromosomas IV y XII , de la familia 18M64, 18M65, 18M66 y 18M69 de la F2 recombinante. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus, H: heterocigótico.**

PLANTAS	Marcador	Cromosoma IV												Cromosoma XII									
		snp480	CMFSNP1132	CMFSNP907	snp264	CMPSNP502	snp352	CMPSNP187	CMPSNP607	snp677	snp24	ps07e07	CMPSNP185C E218	CMPSNP923	snp310	ai35a08	CMPSNP284	snp361	CL_57-E03	fr14f22	snp5	CMPSNP60	
LG		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		0,0	11,2	20,2	32,1	49,9	54,7	61,1	69,1	77,1	86,8	101,5	114,6	3,2	9,8	16,4	21,4	37,0	50,0	67,7	58,1	64,5	
18M65-38		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M65-57		P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M66-57		H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M65-45		P	P	P	P	P	P	P	P	T	P	P	P	T	P	T	T	P	H	P	P	P	P
18M65-47		T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	T	P	T	P	P	P	P
18M65-24		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	T	T	T	P	P	P	P	P	P
18M66-61		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M66-29		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M64-42		P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	H	P	P	P	P	H	P	P	P	P	P	P
18M66-38		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M69-33		P	P	P	P	P	P	P	P	T	T	T	P	H	H	H	H	P	P	P	P	P	P
18M69-109		P	P	P	P	P	P	P	P	T	H	H	P	H	P	P	T	P	P	P	P	P	P
18M64-37		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	H	H	H	T	P	P	P	P	P	P
18M66-15		H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M65-68		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M66-67		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M64-28		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	H	P	H	H	P	P	P	P	P	P
18M65-56		P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M69-54		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	H	H	H	T	P	P	P	P	P	P
18M64-11		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	P	P	P	P
18M65-66		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M65-33		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	P	T	T	P	P	P	P	P	P
18M64-36		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	P	P	P	P
18M65-48		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	T	T	T	P	P	P	P	P	P
18M64-33		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	P	P	T	P	T	P	P	P	P
18M66-21		P	P	P	P	P	P	P	P	T	H	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M65-50		P	P	P	P	P	P	P	P	T	P	P	P	T	T	T	T	P	P	P	P	P	P
18M69-111		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	H	H	P	T	P	P	P	P	P	P
18M64-2		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M69-103		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	T	P	P	P	P	P	P
18M64-14		P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	H	P	H	H	H	H	P	P	P	P	P	P
18M64-24		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	P		T	P	T	P	P	P	P
18M64-13		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	H	P	H	H	P	P	P	P	P	P
18M66-16		H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M64-3		T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	T	P	T	P	P	P	P
18M65-60		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	T	T	T	P	P	P	P	P	P
18M66-68		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M69-37		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	T	P	P	P	P	P	P
18M69-142		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	T	P	P	P	P	P	P
18M66-51		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	H	P	H	P	P	P	P
18M69-174		P	P	P	P	P	P	P	P	T	T	T	P	P	P	P	T	P	P	P	P	P	P
18M69-143		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	P	P	P	T	P	P	P	P	P	P
18M69-182		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	T	H	T	P	P	P	P	P	P
18M66-19		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	T	P	T	P	P	P	P
18M64-76		T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	P	P	T	P	T	P	P	P	P
18M66-64		T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	P	P	T	P	P	P	P	P	P
18M64-27		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	T	P	T	T	P	P	P	P	P	P
18M66-5		T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	H	H	P	H	P	P	P	P
18M66-83		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
18M69-89		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	H	H	H	T	P	P	P	P	P	P
18M69-147		P	P	P	P	P	P	P	P	P	H	H	P	P	P	P	T	P	P	P	P	P	P
18M66-66		P	P	P	P	P	P	P	P	T	H	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Anexo 2. Genotipado de las plantas de las familias analizadas (18M84, 18M85, 18M86 y 18M87) para el experimento test de progenie de la campaña del 2018. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus.

Plantas	CMPSNP97	chr8_4094744	chr8_4179695	CI_33-B09	chr8_4393075	chr8_4444571	chr8_4527705	chr8_4630816	chr8_4752299
18M84-4		P	T	T	T	T	T	T	T
18M84-5		P	T	T	T	T	T	T	T
18M84-19		P	T	T	T	T	T	T	T
18M84-11		P	T	T	T	T	T	T	T
18M84-18		P	T	T	T	T	T	T	T
18M84-23		T	T	T	T	T	T	T	T
18M84-29		T	T	T	T	T	T	T	T
18M84-39		T	T	T	T	T	T	T	T
18M85-5	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M85-14	T	T	T	T	T	P	P	P	P
18M85-15	T	T	T	T	T	P	P	P	P
18M85-19	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M85-24	T	T	T	T	T	P	P	P	P
18M85-38	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M86-5	T	X	T	P	P	P	P	P	P
18M86-10	T	X	T	P	P	P	P	P	P
18M86-11	T	X	T	P	P	P	P	P	P
18M86-19	T	X	T	P	P	P	P	P	P
18M86-14	T	X	T	T	T	T	T	T	T
18M86-20	T	X	T	T	T	T	T	T	T
18M86-25	T	X	T	T	T	T	T	T	T
18M86-33	T	X	T	T	T	T	T	T	T
18M86-35	T	X	T	T	T	T	T	T	T
18M87-3	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M87-7	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M87-8	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M87-13	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M87-32	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18M87-19	P	P	P	P	P	P	P	T	T
18M87-29	P	P	P	P	P	P	P	T	T
18M87-35	P	P	P	P	P	P	P	T	T
18M87-38	P	P	P	P	P	P	P	T	T



Anexo 3. Genotipo de las plantas para la verificación del test de progenie 2017. En rosa se muestran los marcadores segregantes que marcan el punto de recombinación. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus.

Familia	CMPSNP1112	CMPSNP97	CMPSNP44	CI_33-B09	chr8_4910084	chr8_5166994	CMPSNP62
19M51	P	P	P	P	P	P	P
19M52	P	P	P	P	T	T	T

Anexo 4. Genotipo de las plantas para la verificación del test de progenie 2018. P: homocigoto Piel de Sapo y T: homocigoto Trigonus.

PLANTAS	CMPSNP97	chr8_4094744	chr8_4179695	CI_33-B09	chr8_4393075	chr8_4444571	chr8_4527705	chr8_4630816	chr8_4752299
19M17	T	X	T	P	P	P	P	P	P
19M18	T	X	T	P	P	P	P	P	P
19M19	T	X	T	P	P	P	P	P	P
19M20	T	X	T	T	T	T	T	T	T
19M21	T	X	T	T	T	T	T	T	T
19M22	T	X	T	T	T	T	T	T	T
19M23	T	X	T	T	T	T	T	T	T
19M24	T	X	T	T	T	T	T	T	T
19M25	T	X	T	T	T	T	T	T	T
19M26	T	T	T	T	T	T	T	T	T
19M27	T	T	T	T	T	T	T	T	T
19M29	T	T	T	T	T	T	T	T	T
19M30	T	T	T	T	T	T	T	T	T
19M31	P	P	P	P	P	P	P	T	T
19M32	P	P	P	P	P	P	P	T	T
19M33	P	P	P	P	P	P	P	T	T
19M34	P	P	P	P	P	P	P	T	T

Anexo 5. Genotipo de las familias segregantes 19M12, 19M13, 19M14 y 19M15. P: homocigoto Piel de Sapo, T: homocigoto Trigonus y H: heterocigoto.

	Pedigrí anterior	CMPSNP97	chr8_4094744	chr8_4179695	CI_33-B09	chr8_4393075	chr8_4444571	chr8_4527705	chr8_4630816	chr8_4752299
19M12	18M64-27	H	H	H	H	H	H	H	H	P
19M13	18M66-68	H	H	H	P	P	P	P	P	P
19M14	18M69-103	H	H	P	P	P	P	P	P	H
19M15	18M69-142	P	P	P	P	P	P	P	P	H