



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y  
Celular de Plantas

Mapeo fino de un QTL implicado en la morfología del fruto  
de melón en la línea de introgresión TRI01-2.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Rodriguez Lorenzo, Victor

Tutor/a: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Cotutor/a externo: Monforte Gilabert, Antonio José

Director/a Experimental: Gonzalo Pascual, María José

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

# Resumen

El melón (*Cucumis melo L.*) es una especie de gran importancia económica a nivel mundial, con una producción global de aproximadamente 29 millones de toneladas en 2022. La forma del fruto es un carácter agronómico de gran relevancia que influye en aspectos relacionados con su transporte, almacenamiento y procesamiento. El control genético de este carácter es complejo, involucrando a una gran cantidad de QTLs. En el trabajo previo de Campos et al. (2023), se desarrolló una colección de 30 líneas de introgresión (ILs) a partir de la accesión silvestre Ames 24297 (TRI) en el fondo genético Piel de Sapo (PS). Entre estas, la línea TRI01-2 destacó al identificarse un QTL en el cromosoma 1 para la forma del fruto. Esta línea, con una región de introgresión de 26,448,808 pb, mostró que la presencia de alelos del parental TRI producía frutos significativamente más redondos en comparación con los de PS, caracterizados por su fenotipo ovalado. Por esta razón, el objetivo principal de la tesis de master es la caracterización del QTL implicado en la forma de fruto en melón mediante la saturación de la región con marcadores moleculares. Para ello se desarrollaron dos poblaciones F<sub>2</sub> derivadas del cruce entre TRI01-2 y PS que fueron analizadas en dos localizaciones diferentes, en la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), y en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (Málaga). El mapeo fino resultó en un mapa genético donde el ratio Kb/cM varió entre intervalos. En el intervalo Chr1\_14777711-Chr1\_15072547 se halló una alta distancia genética, como resultado de una alta tasa de recombinación, sin embargo, en los intervalos adyacentes se encuentra una supresión de la recombinación relacionada con regiones centroméricas. Finalmente, el análisis del QTL reveló un QTL para la forma del fruto alrededor del marcador Chr1\_14443328. Asimismo, se analizaron los momentos del desarrollo claves para la morfología del fruto de la IL TRI01-2, y de PS. Las diferencias en longitud, diámetro e índice de forma del fruto (FSI) se establecieron en etapas distintas, destacando que el FSI se define antes de la antesis.

**Palabras clave:** *Cucumis melo*; forma del fruto; línea de introgresión; mapeo de QTL; selección de recombinantes; genotipado; desarrollo del fruto.

# Abstract

Melon (*Cucumis melo* L.) is a species of great economic importance worldwide, with a global production of approximately 29 million tons in 2022. Fruit shape is a highly relevant agronomic trait that influences aspects related to transport, storage, and processing. The genetic control of this trait is complex, involving many QTLs. In a previous work by Campos et al. (2023), a collection of 30 introgression lines (ILs) was developed using the wild accession Ames 24297 (TRI) in the genetic background of Piel de Sapo (PS). Among these, the TRI01-2 line stood out, as a QTL for fruit shape was identified on chromosome 1. This line, with an introgressed region of 26,448,808 bp, showed that the presence of TRI parental alleles produced significantly rounder fruits compared to PS fruits, characterized by their oval phenotype. For this reason, the main objective of this master's thesis is the characterization of the QTL involved in melon fruit shape through the saturation of the region with molecular markers. To achieve this, two F<sub>2</sub> populations derived from the cross between TRI01-2 and PS were developed and analyzed in two different locations: the Polytechnic University of Valencia (UPV) and the Subtropical and Mediterranean Horticulture Institute La Mayora (Málaga). Fine mapping resulted in a genetic map where the Kb/cM ratio varied across intervals. In the Chr1\_14777711-Chr1\_15072547 interval, a high genetic distance was found due to a high recombination rate; however, adjacent intervals showed suppressed recombination related to centromeric regions. Finally, QTL analysis revealed a QTL for fruit shape near the Chr1\_14443328 marker. As a secondary objective, key developmental stages for fruit morphology were analyzed in the IL TRI01-2 and PS. Differences in fruit length, diameter, and shape index (FSI) were established at different stages, with FSI notably being defined before anthesis.

**Keywords:** *Cucumis melo*; fruit shape; introgression line; QTL mapping; recombinant selection; genotyping; fruit development.

## Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.			X	
ODS 2. Hambre cero.	X			
ODS 3. Salud y bienestar.			X	
ODS 4. Educación de calidad.			X	
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.	X			
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades.			X	
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.		X		
ODS 13. Acción por el clima.			X	
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.			X	
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFM con los ODS con un grado de relación más alto:

El ODS 2 “Hambre cero”, así como el ODS 12 “Producción y consumo responsable”, guardan una estrecha relación con el presente trabajo. Esto se debe a que este proyecto contribuye en gran medida a la mejora de la producción agrícola mediante la caracterización genética de un rasgo clave, como es la forma del fruto en melón, una especie de gran relevancia económica y alimentaria. La optimización de este carácter agronómico puede aumentar la eficiencia en el transporte, almacenamiento y

procesamiento, aspectos fundamentales para garantizar la disponibilidad de alimentos y reducir las pérdidas postcosecha. Además, este enfoque promueve un uso más eficiente y sostenible de los recursos agrícola, aspecto crucial en regiones con recursos limitados, y en contextos de alta demanda alimentaria.

Asimismo, este trabajo está bastante relacionado con otros objetivos, como el ODS 8 “Trabajo decente y crecimiento económico”, y con el ODS 9 “Industria, innovación e infraestructuras”. El descubrimiento del gen /genes involucrados en la morfología del fruto, contribuye al desarrollo de variedades con formas específicas de interés comercial. Esto impulsa el desarrollo económico en regiones productoras, fomentando empleos relacionados con la agricultura, la investigación y la comercialización. Además, la implementación de herramientas moleculares avanzadas, como el empleo de marcadores moleculares para el mapeo fino de QTLs, promueve la innovación en la mejora genética y el desarrollo de infraestructuras científicas.

# Agradecimientos

Un año y medio después de graduarme como biólogo, y sin tener claro en qué especializarme, puedo decir con certeza que he elegido el camino adecuado. Agradezco a todo el personal universitario con el que he tenido el privilegio de coincidir en Granada, Salamanca y Valencia, quienes me han transmitido su pasión por el mundo vegetal en todas sus facetas.

Durante este año de intenso trabajo y dedicación, he adquirido una base sólida en el campo de la mejora genética vegetal. No obstante, esta experiencia no habría sido posible sin el apoyo y la orientación de las personas que han estado a mi lado durante este proceso:

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mi tutor, el Dr. Antonio Monforte, por su amabilidad, su conocimiento y por inculcarme su pasión por la genómica aplicada a la mejora vegetal.

Asimismo, estoy agradecido con mi directora experimental, María José Gonzalo, por su dedicación, orientación, y por enseñarme la forma de trabajo y las técnicas utilizadas durante la tesis.

Debo agradecer profundamente también a Iván Navarro, compañero y amigo, por su apoyo a lo largo de este proceso.

Quiero también agradecer al laboratorio 0.08 y a todas las personas que han pasado por él este año, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de conocer de cerca una profesión tan apasionante como esta.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que he tenido el honor de conocer este año, de quienes he aprendido algo valioso, y a todas las experiencias previas que me han llevado hasta aquí, formando la persona que soy hoy. Un agradecimiento muy especial a mi familia, que, a pesar de la distancia, siempre he sentido su apoyo, energía y calor, los cuales han sido el motor de este proceso. Gracias por motivarme cada día.

# Índice de contenidos

1. Introducción .....	1
1.1 Importancia económica .....	1
1.2 Taxonomía.....	2
1.3 Descripción botánica.....	3
1.4 Origen y diversificación .....	4
1.5 Genética del melón.....	4
1.6 Genética de la forma del fruto .....	6
1.7 Genes controlando la forma del fruto .....	8
1.8 Justificación y antecedentes .....	9
1.9 Planteamiento de objetivos.....	13
2. Material y Métodos.....	14
2.1 Efecto del QTL durante el desarrollo del fruto .....	14
2.1.1 Material vegetal.....	14
2.1.2 Desinfección de semillas y siembra .....	14
2.1.3 Análisis Parentales.....	15
2.1.3.1 Verificación de efectos del QTL .....	15
2.1.3.2. Ensayo de desarrollo del fruto .....	15
2.1.4 Análisis de datos .....	16
2.2 Mapeo fino del QTL .....	16
2.2.1 Material vegetal.....	17
2.2.2 Selección de recombinantes .....	17
2.2.2.1 Extracción de ADN y cuantificación .....	17
2.2.2.2 Marcadores flanqueantes .....	18
2.2.2.3 Diseño de cebadores .....	19
2.2.2.4 Genotipado.....	19
2.2.2.5 Fenotipado .....	21
2.2.2.6 Saturación de la región con nuevos marcadores .....	21
2.2.2.7 Mapa físico y genético.....	21
2.2.3 Análisis de datos .....	22
3. Resultados.....	23
3.1 Evaluación de los efectos del QTL en la forma y desarrollo del fruto.....	23
3.1.1 Verificación de los efectos del QTL en la forma final del fruto.....	23
3.1.2 Efectos del QTL durante el desarrollo del fruto .....	23

3.1.3 Estabilidad de los efectos del QTL y variación fenotípica entre localizaciones	25
3.2 Mapeo fino .....	26
3.2.1 Análisis de poblaciones $F_2$ .....	26
3.2.2 Distribución fenotípica $F_2$ .....	27
3.2.3 Efecto del número de carpelos en la morfología de fruto .....	30
3.2.4 Mapa genético y físico .....	30
3.2.5 Asociación de los marcadores y la forma de fruto .....	32
3.2.6 Análisis de QTL.....	34
4. Discusión .....	36
4.1 Efectos del QTL durante el desarrollo del fruto.....	36
4.2 Mapeo fino .....	37
4.3 Asociación del número de carpelos con la forma final del fruto .....	39
5. Conclusiones.....	40
6. Bibliografía .....	41
<b>ANEXO</b> .....	46

# Listado de figuras

**Figura 1.** Datos de producción y área cosechada de melón en el mundo comprendidos entre la década 2012- 2022 según la FAO.

**Figura 2.** Datos de producción de melón por continentes en el mundo en 2022 según la FAO.

**Figura 3.** Varios grupos de cultivares de melón (*Cucumis melo*) basados en la clasificación de Pitrat (2008): (A) inodorus (Piel de Sapo); (B) conomon (Shiro Uri Okayama); (C) momordica (PI124112); (D) chate (Carosello Barese); (E) dudaim (melón de bolsillo de la reina Ana); (F) acidulus (TGR-1551); (G) makuwa (Ginsen makuwa); (H) ameri (Kizil Uruk); (I) cantalupensis (Vedrantais); (J) reticulatus (Dulce); (K) flexuoso (Arya); (L) tibish (tibish); (M) chinensis (Songwhan Charmi) y (N) melón silvestre (trigonus) (Monforte et al., 2014).

**Figura 4.** Frutos característicos de un melón silvestre del grupo *agrestis* (a) y su sección transversal (b) (Pitrat, 2017).

**Figura 5.** Tipos de flores de melón monoico, y andromonoico respectivamente. Las flores masculinas son idénticas en todos los tipos de melón. ov, ovario; sg, estigma; y st, estambre (Boualem et al., 2008).

**Figura 6.** Secciones de parafina de ovarios representativos de los genotipos PS y CALC8-1 durante el inicio del primordio del ovulo.

**Figura 7.** Esquema para el desarrollo de la población de líneas de introgresión (IL) TRI con el fondo genético PS. Se indica el número de generaciones de retrocruzamiento (BC) y autofecundación (S), junto con la plataforma de genotipado empleada para la selección asistida por marcadores (MAS) para obtener la colección de 30 ILs (Campos et al., 2023).

**Figura 8.** Genotipo gráfico de la colección de 30 líneas de introgresión (IL) TRI. Cada fila representa una IL, y las 12 columnas representan los cromosomas del melón. En amarillo, la región introgresada TRI, sobre fondo genético Piel de Sapo en verde (Campos et al., 2023). Las líneas relevantes para este estudio se destacan dentro del recuadro rojo.

**Figura 9.** Variación en la forma del fruto en las líneas de introgresión (ILs) TRI. Los nombres de las ILs se muestran en la parte inferior, y las barras representan la diferencia porcentual en el valor promedio de cada IL con respecto al progenitor recurrente, Piel de Sapo (PS). Las barras coloreadas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la IL y PS según la prueba de Dunnett. El color de los recuadros que separan las barras señala el cromosoma dónde se localiza la introgresión. De izquierda a derecha, se incluyen los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12 (Campos et al., 2023).

**Figura 10.** Genotipo gráfico dónde se muestran las líneas de introgresión TRI01-1, TRI01-2 y TRI01-3. En amarillo, región de introgresión del alelo TRI, en verde, alelo PS, y en celeste, presencia de ambos alelos, heterocigoto (H).

**Figura 11.** Imagen de fruto representativo de la variedad Piel de Sapo y de la IL TRI01-2 respectivamente.

**Figura 12.** Comparación de frutos representativos de la IL TRI01-1, la variedad Piel de Sapo, y la IL TRI01-2 respectivamente.

**Figura 13.** Imagen de varias muestras de ADN a través de la luz ultravioleta en el transiluminador junto con las muestras de ADN Lambda patrón (25 ng, 50 ng y 100 ng) para la cuantificación.

**Figura 14.** Región de introgresión propuesta para la saturación con marcadores moleculares destinada a la selección de recombinantes. Se muestra en amarillo la región de introgresión de Trigonus (TRI) sobre fondo genético Piel de Sapo (PS), en verde. Se indican las posiciones en pares

de bases (pb) de los marcadores seleccionados como flanqueantes, que abarcan desde la región compartida entre TRI01-2 y TRI01-1 hasta el inicio de la región común entre TRI01-2 y TRI01-3.

**Figura 15.** Esquema de las fases de amplificación utilizando la técnica PACE.

**Figura 16.** Ejemplo de gráfica generada por Thermo Fisher™ Cloud. Los individuos homocigotos para cada alelo se representan en azul y rojo, mientras que los heterocigotos, que presentan ambos alelos, se muestran en verde.

**Figura 17.** Gráficos de longitud (A), diámetro (C), y de la variación de sus valores (B), (D) respectivamente a lo largo de los 40 días para TRI01-2 y PS. Los valores de longitud y diámetro están expresados en milímetros (mm).

**Figura 18.** Gráficos del índice de forma del fruto (FSI) (A), y de la variación de sus valores (B) a lo largo de los 40 días para TRI01-2 y PS.

**Figura 19.** Gráficos de la interacción Genotipo-Ambiente de los tres caracteres: L, D y FSI, para PS (rojo) y TRI01-2 (verde) en ambas localidades, UPV y La Mayora.

**Figura 20.** Representación gráfica de la distribución de la longitud, diámetro, y FSI de las plantas recombinantes  $F_2$  en la Universidad Politécnica de Valencia (A), como de La Mayora (B). En esta última localización también se incluyó el análisis de la línea TRI01-1. Las gráficas muestran el número de plantas dentro de cada rango de medida. Los valores medios de longitud, diámetro y FSI para los genotipos PS,  $F_2$  y TRI01-2 están indicados en las distribuciones correspondientes.

**Figura 21.** Relación lineal entre longitud y diámetro, longitud y FSI, y diámetro y FSI en la UPV (A) y La Mayora (B). Los ajustes significativos, determinados mediante ANOVA con  $p < 0.05$ , se destacan en rojo. Asimismo, se presentan los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) correspondientes para cada relación.

**Figura 22.** Gráficos que muestran la variación de la longitud (L), diámetro (D) y FSI en función del número de carpelos presentes en las plantas recombinantes  $F_2$  seleccionadas de la UPV. Se incluyen las medias y desviaciones estándar de estas variables para los frutos con 3 y 4 carpelos. Los valores de  $p < 0.05$  se consideran significativos y se resaltan en rojo.

**Figura 23.** Representación combinada del mapa genético y físico, indicando las distancias genéticas (cM) y físicas (Mb) respectivamente. El mapa genético fue elaborado a partir de los datos de genotipado de la población  $F_2$  cultivada en La Mayora, mientras que el mapa físico se determinó con las posiciones de los marcadores en el genoma de referencia v4.0 seleccionados para el ensayo en la UPV.

**Figura 24.** Representación de los cinco marcadores seleccionados en La Mayora en los mapas físico (en Mb) y genético (en cM), junto con el F ratio de FSI y el LOD score asociado a las variables de longitud (L), diámetro (D) y FSI. Adicionalmente, una representación de dónde se piensa que está el QTL, en amarillo, zona de introgresión TRI01-2, en azul oscuro, zona probable de QTL. El umbral de LOD se representa como la línea negra continua.

**Figura 25.** Relación entre las distancias y físicas genéticas de los 5 SNPs empleados en el estudio de La Mayora con el trabajo de Argyris et al. (2015). En la gráfica de la derecha se muestra la relación entre las distancias genéticas (eje y izquierda), físicas (eje x) y la frecuencia de recombinación (eje y derecha) en la pseudomolécula PMI de melón. Para cada marcador SNP (círculo rojo relleno) en el mapa genético se trazó la distancia genética en centimorgans (cM) según su posición física en megabases (Mb) en la pseudomolécula (PM). Adicionalmente, se muestra la tasa de recombinación mediante una línea continua. Un intervalo físico coincidente entre ambos estudios se destaca mediante un círculo, mientras que la flecha naranja señala una región específica caracterizada por una alta distancia genética y una elevada tasa de recombinación. Por otro lado, los círculos verdes rellenos destacan una aproximación a las distancias genéticas de los marcadores Chr1\_11948434, Chr1\_12899448 y Chr1\_13501585, ubicados en las posiciones físicas 11,948,434; 12,899,448; y 13,501,585 pb en este estudio, donde se registra una frecuencia de recombinación baja o nula.

## Listado de tablas

**Tabla 1.** El tamaño del genoma de diferentes tipos de cultivos en comparación con el melón (Chikh-Rouhou et al., 2023).

**Tabla 2.** Medias y desviaciones estándar de los genotipos para longitud, diámetro y FSI. Los valores con  $p < 0.05$ , considerados significativos según la ANOVA y el test de Dunnett, se resaltan en rojo.

**Tabla 3.** p-valor del ANOVA de dos vías realizado para evaluar los efectos genotípicos, ambientales y la interacción entre ambos (GxA) sobre L, D, FSI en PS y TRI01-2. Los valores de  $p < 0.05$  se consideran significativos y se resaltan en rojo.

**Tabla 4.** Medias y desviaciones estándar de PS, TRI01-2 y de los recombinantes  $F_2$  cultivados en la UPV, así como, en el caso de la Mayora, de la población  $F_2$  para longitud, diámetro y FSI. En esta última localización también se incluyó el análisis de la línea TRI01-1.

**Tabla 5.** Distancia física (pb) entre los marcadores seleccionados en la UPV, el número de plantas recombinantes identificadas entre dichos marcadores y la relación de Kb por cM en cada intervalo entre dos marcadores consecutivos.

**Tabla 6.** Distancia genética (cM) y distancia física (pb) entre los marcadores seleccionados en La Mayora, y la relación de Kb por cada cM en un intervalo de dos marcadores consecutivos.

**Tabla 7.** Resumen de las medias del valor de FSI por alelo de los marcadores utilizados en la Universidad Politécnica de Valencia. Los valores de  $p < 0.05$  se consideran significativos.

**Tabla 8.** Resumen de las medias del valor de FSI por alelo de los marcadores utilizados en La Mayora. Los valores de  $p < 0.05$ , considerados significativos, se destacan en rojo. También se muestra el F-ratio asociado a cada valor  $p$ .

**Tabla 9.** Datos de QGene que muestran el LOD score y el efecto aditivo de las variable FSI, y longitud, en el intervalo Chr1\_1443328-Chr1\_14777713.

## Listado de Anexos

**Anexo 1.** Cebadores PACE diseñados, utilizados en la genotipificación durante diferentes etapas del ensayo en Valencia y La Mayora. En amarillo, marcadores no polimórficos entre parentales (Chr1\_14603738, Chr1\_14956485 y Chr1\_16000882).

**Anexo 2.** Genotipo de las plantas recombinantes  $F_2$  cultivadas en la Universidad Politécnica de Valencia. Los colores indican: morado para los marcadores flanqueantes a la región de introgresión compartida entre TRI01-2 y TRI01-1 hasta el inicio de la región común entre TRI01-2 y TRI01-3, verde oscuro para el genotipo homocigoto PS, amarillo para el genotipo homocigoto TRI01-2, verde claro para la presencia de ambos alelos y blanco para los genotipos no determinados.

**Anexo 3.** Genotipo de las plantas  $F_2$  cultivadas en La Mayora. Los colores indican: verde oscuro para el genotipo homocigoto PS, amarillo para el genotipo homocigoto TRI01-2, verde claro para la presencia de ambos alelos y blanco para los genotipos no determinados.

**Anexo 4.** Región de introgresión de TRI01-2 en común con TRI01-1 (izquierda) y TRI01-3 (derecha). Los colores indican: En morado para los marcadores flanqueantes entre la región de introgresión compartida entre TRI01-2 y TRI01-1 hasta el inicio de la región común entre TRI01-2 y TRI01-3, azul para los marcadores seleccionados para saturar la región, verde oscuro para el alelo homocigoto PS, y amarillo para el alelo homocigoto TRI01-2.

# Lista de abreviaturas

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism  
ANOVA: Analysis of Variance  
D: Diámetro  
DPA: Días posteriores a la antesis  
FAO: Food and Agriculture Organization  
FSI: Fruit Shape Index  
GBS: Genome by Sequencing  
GWAS: Genome-Wide Association Study  
IMA: Integrated Molecular Approach  
IL: Introgression Line  
INDEL: Insertion-Deletion  
Kb: Kilo Base  
L: Longitud  
LOD: Logarithm of the Odds  
MAS: Marker-Assisted Selection  
Mb: Mega Base  
NGS: Next Generation Sequencing  
pb: Par de bases  
PS: Piel de Sapo  
QTL: Quantitative Trait Locus  
RADP: Random Amplified Polymorphic DNA  
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism  
SSR: Simple Sequence Repeat  
TRI: Trigonus

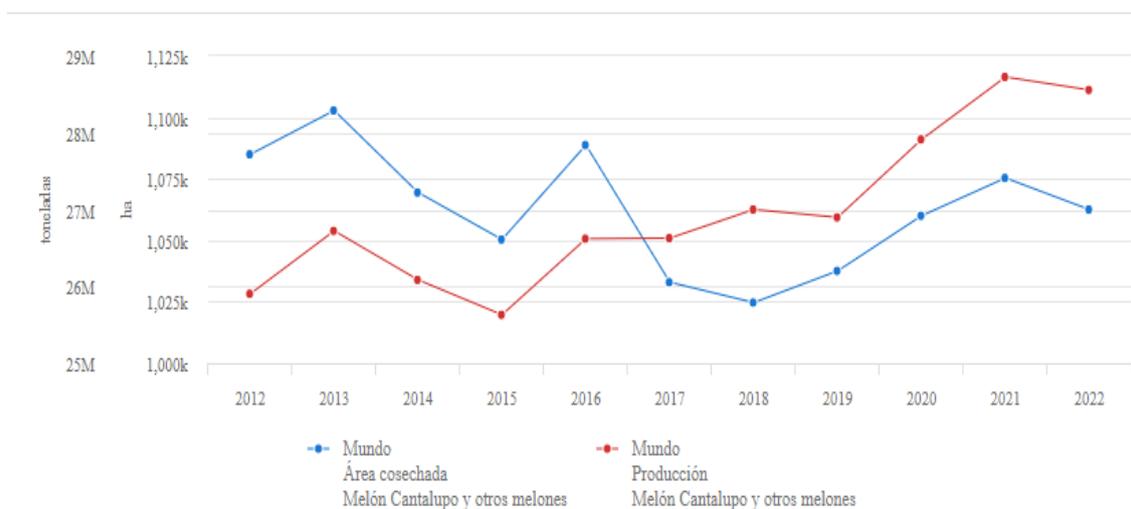
# 1. Introducción

## 1.1 Importancia económica

El melón es una especie de gran importancia económica a nivel mundial, especialmente en regiones templadas y tropicales. Según la FAO, en la última década ha habido un aumento de más de 2 millones de toneladas en la producción mundial de melón, siendo en el año 2022 de aproximadamente 29 millones de toneladas. Sin embargo, el área cosechada mundial se ha reducido aproximadamente en un 2% (**Figura 1**). Prácticas agrícolas, como el uso de variedades híbridas, han permitido intensificar la producción en menor área, lo que resulta en un mayor rendimiento por unidad de superficie cultivada (Cavalcante et al., 2020).

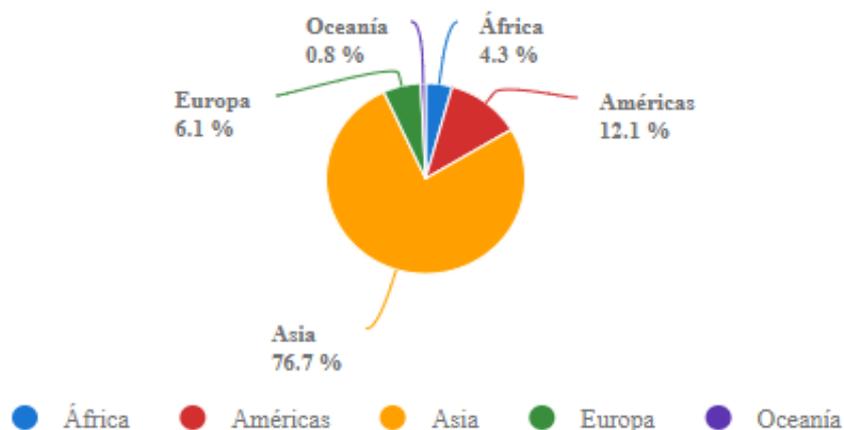
Producción/Rendimiento de Melón Cantalupo y otros melones en Mundo

2012 - 2022



**Figura 1.** Datos de producción y área cosechada de melón en el mundo comprendidos entre la década 2012- 2022 según la FAO.

Asia lidera la producción mundial, con un 76.7 % en 2022, seguida de América (12.1%) y Europa (6.1%) (**Figura 2**). En cuanto a los países productores, China ocupa el primer puesto, con una producción de 14 millones de toneladas, seguida de Turquía que supera el millón de toneladas. España, es el principal productor de Europa con una producción de 524 mil toneladas y 16,220 hectáreas cultivadas. La mayor parte de esta producción se dedica a la exportación, donde se sitúa en el segundo lugar en la lista de países europeos, sólo por debajo de Italia que produce 590 mil toneladas y 22890 hectáreas cultivadas (FAO, 2022).



**Figura 2.** Datos de producción de melón por continentes en el mundo en 2022 según la FAO.

## 1.2 Taxonomía

El melón (*Cucumis melo L.*) es una especie dicotiledónea, de gran interés tanto por sus propiedades biológicas como por su importancia económica. Pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, una importante familia de plantas angiospermas que incluye alrededor de 800 especies distribuidas en 30 géneros (Rolnik & Olan, 2020). Entre las especies que forman parte de esta familia, cabe destacar por su interés agronómico la sandía (*Citrullus lanatus*), la calabaza (*Cucurbita spp.*) y especies del género *Cucumis*, como el pepino (*Cucumis sativus*) y melón (*Cucumis melo*) (García-Mas et al., 2012).

La extensa variación morfológica de los frutos dentro de *C. melo* dificulta una clasificación intraespecífica convencional. Kirkbride. (1993) propuso, aunque actualmente obsoleta, una clasificación de la especie en dos subespecies, basada en la pubescencia de los ovarios y los frutos jóvenes. Así, los ovarios y frutos jóvenes con pelos cortos se asignaron a *C. melo* subespecie *agrestis*, mientras que aquellos con pelos largos se asignaron a *C. melo* subespecie *melo*.

Recientemente, Endl et al. (2018), plantearon una clasificación centrándose en la filogenia de la especie y en el lugar de domesticación, basado en una divergencia en dos linajes: uno predominante en Asia (*C. melo ssp. melo*) y otro restringido a África (*C. melo ssp. meloides*).

La división más completa, basándose en una clasificación horticultural, es la realizada por Pitrat, (2017), que comprende 19 grupos, dentro de los cuales, se agrupan los melones comestibles en seis grupos botánicos, incluyendo Flexuosus (Oriente Medio, Mediterráneo), Conomon (Asia), Cantalupensis (Europa, América), Inodorus (Oriente Medio, sur de Europa), Chito (Asia), Dudaim (Asia) y Momordica (Asia) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Varios grupos de cultivares de melón (*Cucumis melo*) basados en la clasificación de Pitrat (2008): (A) inodorus (Piel de Sapo); (B) conomon (Shiro Uri Okayama); (C) momordica (PI124112); (D) chate (Carosello Barese); (E) dudaim (melón de bolsillo de la reina Ana); (F) acidulus (TGR-1551); (G) makuwa (Ginsen makuwa); (H) ameri (Kizil Uruk); (I) cantalupensis (Vedrantais); (J) reticulatus (Dulce); (K) flexuoso (Arya); (L) tibish (tibish); (M) chinensis (Songwhan Charmi) y (N) melón silvestre (*trigonus*) (Monforte et al., 2014).

### 1.3 Descripción botánica

*C. melo* es una planta anual, herbácea, de crecimiento rastrero o trepador. Sus tallos son delgados, pubescentes y pueden alcanzar hasta 3 metros de longitud, desarrollando zarcillos a partir de las axilas de las hojas para sujetarse a estructuras vecinas. Las hojas son alternas, grandes, con bordes lobulados y textura rugosa. Las flores son de color amarillo y acampanadas, de entre 2 y 3 cm de diámetro. En cuanto a su reproducción, los melones silvestres son monoicos con flores masculinas y femeninas en la misma planta, mientras que los melones cultivados son en su mayoría andromonoicos (flores masculinas y hermafroditas en la misma planta), 1/3 son monoicos y en un bajo porcentaje pueden ser hermafroditas (con sólo flores hermafroditas) (Choudhary & Pandey, 2016; Kesh & Kaushik; 2021).

Se piensa que el melón fue domesticado por sus semillas ricas en proteínas y lípidos, y más tarde por su mesocarpo o pulpa del fruto (Zeven & Wet, 1982). Los frutos de los melones silvestres, anteriormente considerados *Cucumis trigonus*, son pequeños (alrededor de 30–50 g) y de forma ovalada u ovoide, con el exocarpo liso, reticulado o verrugoso, típicamente de color verde claro con manchas verde oscuro (**Figura 4**). Las variedades cultivadas, son más grandes (hasta 35 kg) y varían considerablemente en forma, desde planos (longitud:diámetro=0.6) hasta muy largos (longitud:diámetro>10), y presentan exocarpos de diferentes colores. Internamente, presenta una cavidad, la placenta, que contiene numerosas semillas ovoides. Por regla general suelen presentar

tres placentas (incluidos los melones silvestres), pero algunos grupos tienen hasta cinco (Pitrat, 2017).



**Figura 4.** Frutos característicos de un melón silvestre del grupo *agrestis* (a) y su sección transversal (b) (Pitrat, 2017).

## 1.4 Origen y diversificación

El origen de *C. melo* ha sido objeto de debate durante años (Kirkbride., 1993). Actualmente, se reconoce que esta especie proviene de Asia (Sebastian et al., 2010), siendo la India el principal centro de domesticación y diversificación del melón, desde donde los cultivares de melón se diversificaron de manera divergente hacia el Mediterráneo/Oriente Próximo, y hacia el Lejano Oriente (Gonzalo et al., 2019).

Endl et al. (2018) sugiere que la domesticación del melón ocurrió en al menos dos eventos independientes, uno en África y otro en Asia. Cada evento dio lugar a linajes con características adaptadas a las condiciones y necesidades locales de cada región. Aunque estos eventos de domesticación fueron independientes, hubo un flujo genético entre las poblaciones domesticadas y silvestres en algunas áreas, lo que contribuyó a una mayor diversidad genética en los cultivares modernos. Además, los cultivares locales de India y África tienden a agruparse con los melones silvestres de sus respectivas regiones, lo que respalda la existencia de estos dos eventos de domesticación. En Asia, la domesticación habría favorecido una amplia diversificación, originando la mayoría de las variedades de melón conocidas actualmente. Por el contrario, la domesticación en África ha tenido un impacto más limitado, con una menor diversificación.

## 1.5 Genética del melón

El melón es una especie diploide ( $2x = 2n = 24$ ) con 12 cromosomas y un genoma pequeño de entre 454-502 Mb. En comparación con otros miembros de la familia de las

cucurbitáceas, como sandía y pepino, el genoma del melón es grande, pero es considerablemente pequeño en comparación con otras especies (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** El tamaño del genoma de diferentes tipos de cultivos en comparación con el melón (Chikh-Rouhou et al., 2023).

Crop/Species	Genome Size and Chromosome number	Reference
Melon ( <i>Cucumis melo</i> )	450 Mb (x=12)	Garcia-Mas et al. (2012)
Watermelon ( <i>Citrullus lanatus</i> )	425 Mb (x=11)	Guo et al. (2019, 2013)
Cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> )	367 Mb (x=7)	Yano et al. (2020)
Tomato ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	900 Mb (x=12)	The Tomato Genome Consortium (2012)
Pepper ( <i>Capsicum annum</i> )	3480 Mb (x=12)	Kim et al. (2014)
Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	17,000 Mb (x=7)	Brenchley et al. (2012)

Los programas de mejora genética están orientados principalmente al aumento en el rendimiento del cultivo, resistencia a enfermedades, plagas y condiciones climáticas adversas, y optimizar la calidad del producto en términos de sabor, textura y valor nutricional. Para alcanzar dichos objetivos existen numerosas herramientas disponibles como los mapas genéticos, que permiten identificar la ubicación y secuencia de los genes relacionados con características específicas. La construcción de mapas permite la selección asistida por marcadores para seleccionar plantas que posean los genes deseados sin necesidad de esperar a que la característica se exprese físicamente, acelerando el proceso de mejora (Hasan et al., 2021).

Los primeros mapas genéticos fueron abordados con el uso de marcadores moleculares de tipo RFLPs (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica), RAPDs (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) e isoenzimas, los cuales se asociaron con algunos rasgos morfológicos y de resistencia a patógenos. A pesar de este progreso, la escasez de marcadores precisos y accesibles limitaba los análisis genéticos. El uso de marcadores más avanzados, como SSRs (Secuencias simples repetidas), SNPs (Polimorfismo de nucleótido único) e INDELs (Inserciones y deleciones), permitió aumentar significativamente el número de mapas debido a su alta resolución, precisión y facilidad de detección (Hasan et al., 2021).

El mapa genético generado por Diaz et al. (2011) es uno de los mapas de referencia más completo cubriendo 1,150 cM e incluyendo 1,592 marcadores (640 SSRs, 330 SNPs, 252 AFLPs, 239 RFLPs, 89 RAPDs, 15 IMAs, 16 INDELs y 11 caracteres morfológicos). La utilidad de este mapa se ha podido comprobar tras su uso en el mapeo de caracteres cuantitativos (QTLs), análisis de sintenia y selección asistida por marcadores (MAS).

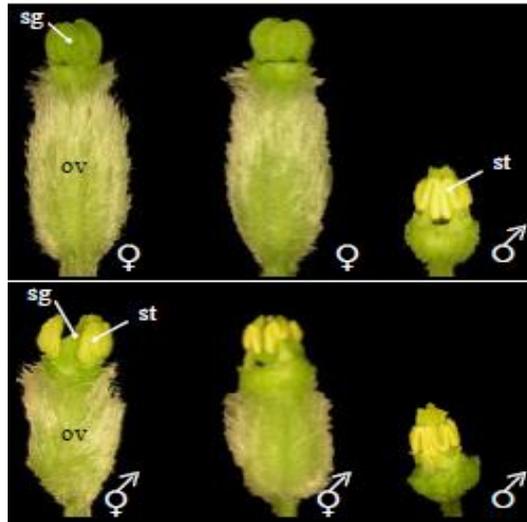
El avance de técnicas de secuenciación, como Next-Generation Sequencing (NGS) y GBS (Genotyping by sequencing), ha permitido la creación de mapas genéticos altamente detallados y densos en diversas especies. Estas tecnologías posibilitan el análisis masivo de marcadores, como los SNPs, en regiones específicas del genoma, aportando un mayor conocimiento sobre la variabilidad genética y la arquitectura de caracteres complejos. Además, la gran cantidad de datos de secuencias de ADN generados permite identificar variaciones genómicas, impulsando los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) y la detección de QTLs, sin limitaciones en la disponibilidad de marcadores (Phan & Sim, 2017).

Actualmente, para la mayoría de las cucurbitáceas existen genomas de referencia. En el caso de *C. melo*, se empleó una línea homocigótica doble-haploide (DHL92), derivada del cruce entre la accesión coreana PI 161375 y la línea de Piel de sapo PS, ensamblando 375 Mb (alrededor del 83,3% del genoma estimado del melón) y prediciendo 27,427 genes para constituir la versión v3.6.1 (Garcia-Mas et al., 2012). Seis años después esta versión fue actualizada por la v4.0, que identifica 29,980 genes y mejora los modelos de genes en términos de descripción de estructura de genes, definición de regiones UTR o uniones intrón-exón (Ruggieri et al., 2018).

## 1.6 Genética de la forma del fruto

La forma del fruto es un carácter agronómico de gran interés tanto para los agricultores como para los consumidores, ya que afecta no solo en el valor comercial del producto, sino también en aspectos relacionados con su transporte, almacenamiento y procesamiento. El melón, que exhibe una notable diversidad en la forma de sus frutos, ofrece un modelo valioso para estudiar la base genética de la morfología del fruto. La gran variabilidad de formas de los frutos de melón, incluyendo formas esféricas, elipsoides o extremadamente alargadas, indica una compleja regulación genética que involucra múltiples loci y genes, hecho comprobado en numerosos estudios (Dogimont.,2011, Monforte et al., 2014, Pan et al., 2020).

La forma final de fruto está altamente correlacionada con la forma del ovario, habiéndose identificado numerosos genes implicados en la forma del fruto que actúan en etapas tempranas del desarrollo, indicando que esta forma se determina pre-antes de la antesis (Périn et al., 2002). Eduardo et al. (2007) describieron que la dimensión que mayor correlación tiene con la forma del fruto es la longitud siendo el efecto del diámetro menos relevante, por lo que se propone el crecimiento longitudinal como el factor principal en la morfología final. Además, el sexo de la flor juega un papel fundamental en la determinación de la forma del fruto. En el melón, este proceso está regulado por los genes andromonoecios (*a*) y gynoecios (*g*), cuya interacción genera diferentes tipos sexuales. Los individuos monoicos (A-G-) y andromonoicos (aaG-) tienen flores masculinas en el tallo principal y, respectivamente, flores femeninas o hermafroditas en las ramas axilares (**Figura 5**), mientras que los individuos ginoicos (AAgg) y hermafroditas (aagg) solo tienen flores femeninas y hermafroditas, respectivamente (Boualem et al., 2008).



**Figura 5.** Tipos de flores de melón monoico, y andromonoico respectivamente. Las flores masculinas son idénticas en todos los tipos de melón. ov, ovario; sg, estigma; y st, estambre (Boualem et al., 2008).

Los patrones de expresión sexual en las cucurbitáceas pueden ser influenciados por hormonas como el etileno y por factores ambientales. En particular, el gen *CmACS-7* está implicado en la biosíntesis de etileno en las primeras etapas del desarrollo de las flores pistiladas y es el responsable de expresión sexual de la flor femenina. La enzima codificada por este gen es esencial en su forma activa para el desarrollo de flores femeninas en líneas monoicas, mientras que una reducción en la actividad enzimática da lugar a flores hermafroditas en líneas andromonoicas. Este hecho se asocia con una menor producción de etileno en las flores femeninas, dando lugar a la formación de frutos menos redondos (Martos-Fuentes et al., 2017).

Por otro lado, el locus *p* (pentamerous) controla el número de carpelos, lo que influye en la forma del fruto. Así, los frutos con cinco carpelos presentan una forma casi esférica mientras que los frutos con tres carpelos presentan una forma más alargada (Périn et al., 2002). Posteriormente, Wang et al. (2022), identificaron el gen *CmCLV3* como responsable en la variación del número de carpelos del fruto.

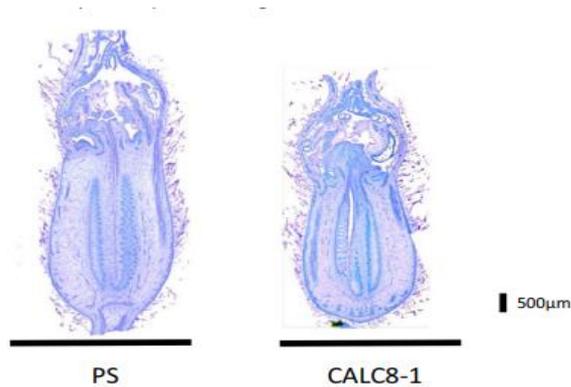
En estudios relacionados con la forma de fruto, se identificaron 58 QTLs implicados en este carácter. Estos QTLs se localizaron principalmente en los cromosomas 1, 2, 8, 11 y 12 definiendo 5 Meta-QTLs (Monforte et al., 2014). Por ejemplo, Díaz et al. (2014) en un cruce entre la variedad española Piel de Sapo (PS) y la accesión india PI124112 (CALC), identificaron QTLs asociados a características morfológicas del fruto, validando específicamente el QTL *fsqs8.1* en una línea de introgresión desarrollada en el fondo genético de Piel de Sapo. Esta línea con la introgresión en la región del QTL da frutos redondos en lugar de los típicamente ovalados. Además, se mapearon otros 10 QTLs: cinco relacionados con la longitud del fruto (*fl*), dos con el diámetro (*fq*) y tres con el tamaño (*fs*). Entre ellos, *fsqs12.1* influye en la forma al reducir el diámetro, mientras que *flqs2.1* y *fsqs2.1* alargan el fruto incrementando su longitud.

Posteriormente, se han ido identificando nuevos QTLs como *fs.4* y *fl.4*, en una línea de introgresión del melón variedad Dudaim (DUD) en el cultivar Piel de Sapo, que presentó una reducción significativa del índice de forma del fruto (FSI) en un 30,9% y de su longitud en un 38,8% (Castro et al., 2019). Asimismo, Santo Domingo et al. (2022) describieron *fsqv6.1* y *flqv6.1*, localizados en el cromosoma 6, tras el cruce entre las variedades Vedrantis (VED) y Piel de Sapo. Estos QTLs son responsables de una forma más redonda del fruto. Por otro lado, el QTL *flqw5.1* ubicado en el cromosoma 5, disminuye la longitud y el área del fruto.

## 1.7 Genes controlando la forma del fruto

Se han realizado numerosos estudios en *C. melo* para identificar los genes responsables de controlar la forma del fruto en cucurbitáceas. Sin embargo, estos genes aún no han sido completamente descritos (Kesh & Kaushik, 2021). En el caso del tomate, ampliamente estudiado como planta modelo y con una notable diversidad en la forma de sus frutos al igual que el melón, se han identificado genes asociados a QTLs relacionados con esta característica (Sierra-Orozco et al., 2021). De esta forma, en los estudios de (Monforte et al., 2014), se propuso que la variación en la forma del fruto entre diferentes especies podría estar controlada por genes pertenecientes a la misma familia. Analizaron las familias de genes de QTLs relacionados con la morfología del fruto del tomate en el genoma del melón. Identificaron 24 miembros de la familia *SUN* (*CmSUN*), 5 de *YABBY* (*CmYABBY*), 21 de *OFF* (*CmOFF*), 9 de *CNR* (*CmCNR*), 10 de *WOX* (*CmWOX*) y 5 de *KLUH/CYP78A* (*CmCYP78A*). Estos genes se distribuyeron en los cromosomas del melón, variando entre tan solo cuatro en los cromosomas 1, 2 y 9 hasta un máximo de doce en los cromosomas 6 y 8. Los genes *SUN* codifican una proteína del dominio *IQ*, la cual es responsable de la elongación del fruto (Rodríguez et al., 2011). Por otro lado, *WOX* influye en el tamaño del meristemo y en el número de lóculos del fruto (Muños et al., 2011), mientras que *CNR* regula el tamaño de los órganos y la planta mediante la cantidad de células (Guo & Simmons, 2011). El gen *KLUH* interviene en la división celular, afectando tanto la masa del fruto como la de las semillas (Chakrabarti et al., 2013). En cuanto a *OFF*, su función está relacionada con la disposición de los microtúbulos dentro de las células (B. Zhang et al., 2023).

Recientemente, Martínez-Martínez et al. (2022) identificaron a *CmOFF13* como el gen responsable del QTL *fsqs8.1* mediante un mapeo de alta resolución y análisis funcional. Este gen, miembro de la familia *OFF*, es homólogo a *AtOFF1* en *Arabidopsis thaliana* y *SLOFP20* en tomate, genes que están asociados con el control de la forma de órganos vegetales al regular la elongación celular longitudinal desde etapas tempranas del desarrollo del ovario. Además, ambos inducen el acortamiento de órganos en sus respectivas especies (Wu et al., 2018). El efecto de *CmOFF13* en la morfología del ovario y del fruto se atribuye a cambios en los patrones de expresión genética. Esto podría estar influenciado por variaciones estructurales, como las mediadas por actividad de transposones en regiones genómicas circundantes, y posiblemente por la orientación de los microtúbulos que promueven la elongación celular (X. Zhang et al., 2020). Estas modificaciones explican las diferencias fenotípicas entre la línea de introgresión CALC8-1, que produce frutos más redondeados en comparación con la variedad Piel de Sapo, que desarrolla frutos alargados, observadas en el trabajo de Martínez-Martínez et al. (2022) (**Figura 6**).



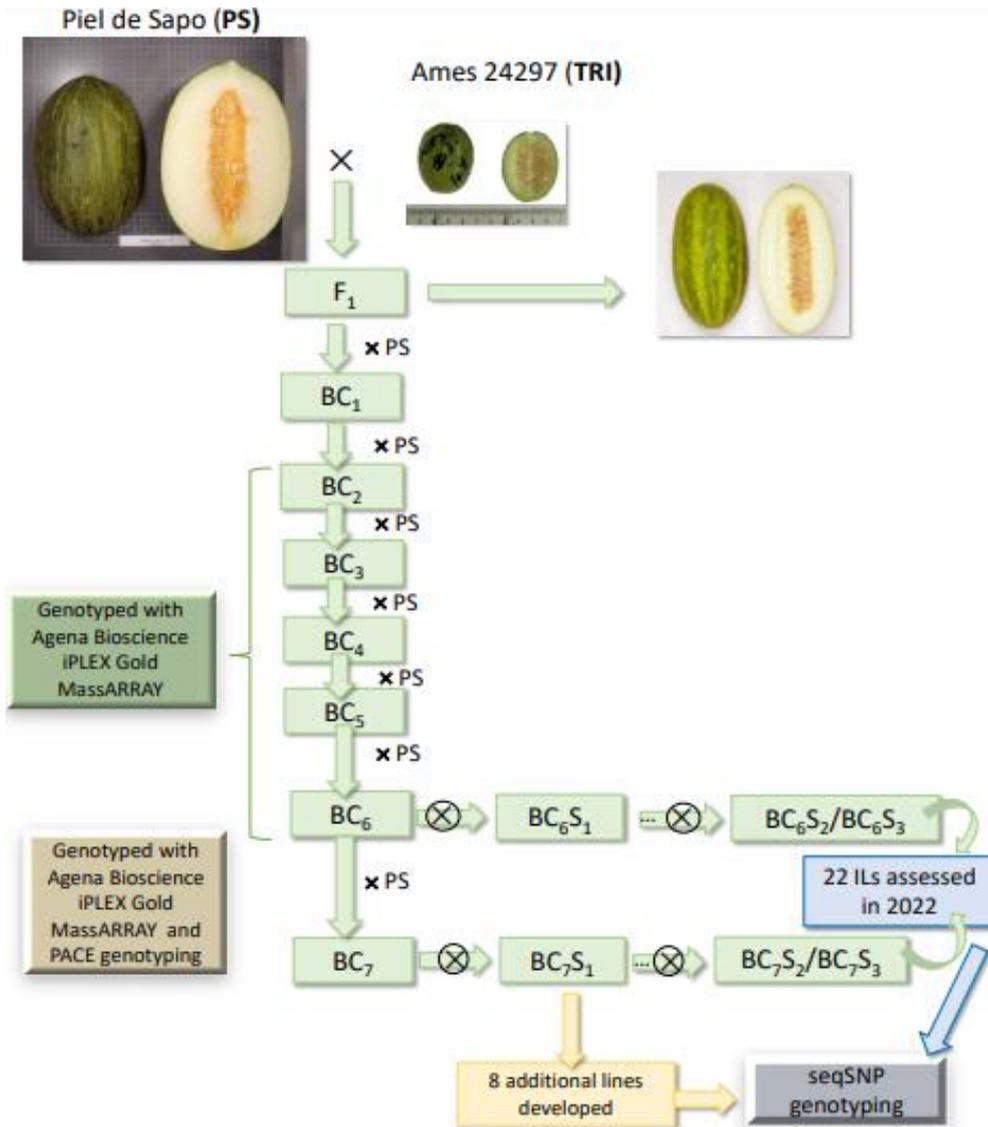
**Figura 6.** Secciones de parafina de ovarios representativos de los genotipos PS y CALC8-1 durante el inicio del primordio del ovulo.

## 1.8 Justificación y antecedentes

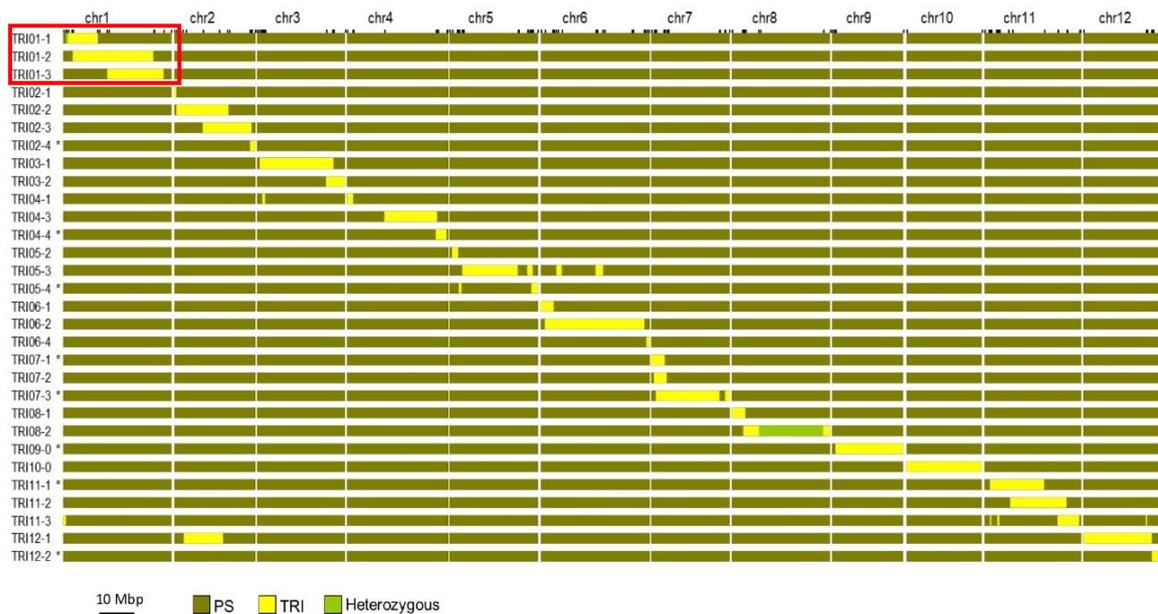
El presente trabajo se encuadra dentro de los trabajos de análisis de la morfología del fruto de melón llevados a cabo por el grupo “Genómica en Mejora Vegetal” del Instituto de biología molecular y celular de plantas (IBMCP).

Este trabajo parte de material vegetal obtenido en el estudio de Campos et al. (2023), en el que desarrollaron una colección de 30 líneas de introgresión (ILs) a partir de la accesión silvestre Ames 24297 (TRI) en el fondo genético Piel de Sapo (PS). Aunque esta accesión inicialmente ha sido clasificada como *Cucumis trigonus*, (Parthasarathy et al., 1980) confirmaron que en realidad pertenece a la misma especie que la variedad PS, siendo *Cucumis melo*.

El esquema de cruzamiento para obtener las ILs y el genotipo gráfico de la colección de 30 líneas de introgresión TRI se muestran en las **Figuras 7 y 8**, respectivamente.

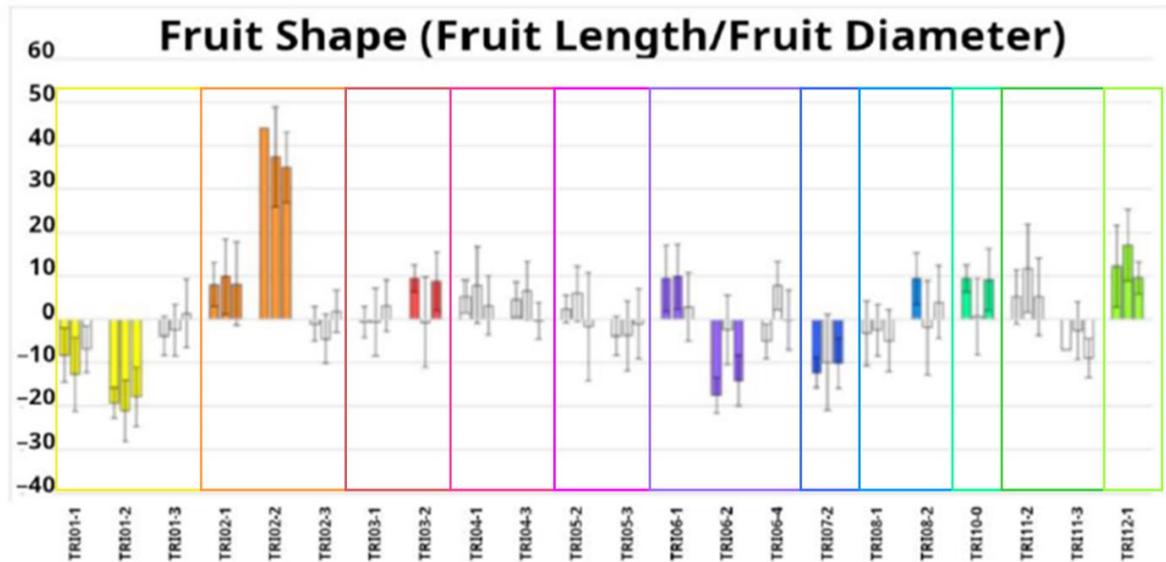


**Figura 7.** Esquema para el desarrollo de la población de líneas de introgresión (IL) TRI con el fondo genético PS. Se indica el número de generaciones de retrocruzamiento (BC) y autofecundación (S), junto con la plataforma de genotipado empleada para la selección asistida por marcadores (MAS) para obtener la colección de 30 ILs (Campos et al., 2023).



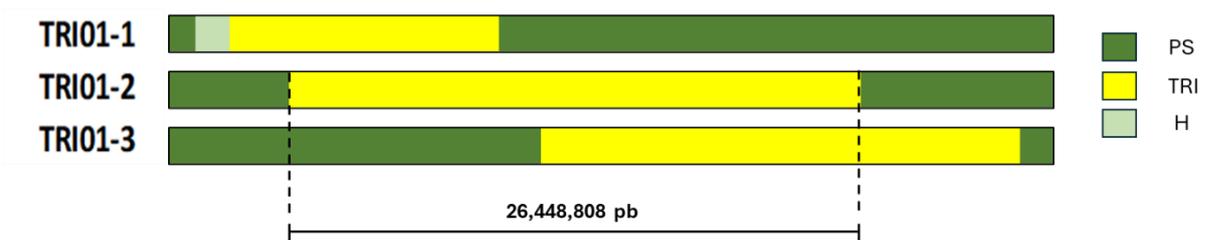
**Figura 8.** Genotipo gráfico de la colección de 30 líneas de introgresión (IL) TRI. Cada fila representa una IL, y las 12 columnas representan los cromosomas del melón. En amarillo, la región introgresada TRI, sobre fondo genético Piel de Sapo en verde (Campos et al., 2023). Las líneas relevantes para este estudio se destacan dentro del recuadro rojo.

Campos et al. (2023) estudiaron diferentes caracteres cuantitativos, algunos relacionados con la domesticación, entre los que se encuentra la forma de fruto. Este carácter se puede cuantificar a partir de los parámetros índice de forma del fruto (FSI), diámetro (D) y longitud (L). Se identificó en el cromosoma 1 un QTL implicado en la forma de fruto en la línea TRI01-2. En esta línea, la presencia de alelos del parental TRI produjo frutos significativamente más redondos en comparación con los frutos de PS, de fenotipo ovalado, incluso más que TRI01-1 en donde también se observaron diferencias significativas respecto a PS (**Figura 9**).



**Figura 9.** Variación en la forma del fruto en las líneas de introgresión (ILs) TRI. Los nombres de las ILs se muestran en la parte inferior, y las barras representan la diferencia porcentual en el valor promedio de cada IL con respecto al progenitor recurrente, Piel de Sapo (PS). Las barras coloreadas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la IL y PS según la prueba de Dunnett. El color de los recuadros que separan las barras señala el cromosoma dónde se localiza la introgresión. De izquierda a derecha, se incluyen los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12 (Campos et al., 2023).

En TRI01-2, la introgresión abarca una región extensa de 26,448,808 pb, que coincide parcialmente con las regiones introgresadas en TRI01-1 y TRI01-3 (**Figura 10**). Por esta razón, se busca acotar la región, con el objetivo de identificar el locus implicado en la forma del fruto.



**Figura 10.** Genotipo gráfico dónde se muestran las líneas de introgresión TRI01-1, TRI01-2 y TRI01-3. En amarillo, región de introgresión del alelo TRI, en verde, alelo PS, y en celeste, presencia de ambos alelos, heterocigoto (H).

## **1.9 Planteamiento de objetivos**

El objetivo principal de la tesis de máster es la caracterización de un QTL localizado en el cromosoma 1 e implicado en la forma de fruto en melón.

Teniendo en cuenta los resultados de los trabajos previos mencionados en el punto anterior se han planteado los siguientes objetivos:

- Mapeo fino de la región de la IL TRI01-2 donde se ha detectado el QTL para FSI localizado en el cromosoma 1.
- Determinar los momentos de desarrollo claves para la morfología del fruto de la IL TRI01-2, y de Piel de Sapo mediante un ensayo de desarrollo de fruto.

## 2. Material y Métodos

### 2.1 Efecto del QTL durante el desarrollo del fruto

#### 2.1.1 Material vegetal

El material vegetal de partida empleado en este estudio está formado por:

-PS: Variedad Piel de Sapo recurrente.

-TRI01-2: IL con introgresión de 26 Mb del cromosoma 1 de *Trigonus* en fondo genético Piel de Sapo (**Figura 11**).



**Figura 11.** Imagen de fruto representativo de la variedad Piel de Sapo y de la IL TRI01-2 respectivamente.

#### 2.1.2 Desinfección de semillas y siembra

Antes de la germinación y posterior siembra, las semillas pasaron por un proceso de desinfección. Las semillas se sumergieron en una solución de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  al 10% de concentración (100 g/l) manteniéndolas durante 3 horas en agitación. Transcurrido este tiempo se eliminaron los restos de la solución con agua destilada y se mantuvieron en una solución con lejía comercial (40g de cloruro activo/l) diluida al 30% por 1 hora en agitación. Se eliminaron los restos de lejía con agua destilada y se dejaron secar las semillas al menos durante 24 horas. Por último, con las semillas completamente secas se realizó un tratamiento de choque térmico a 80°C durante 24 horas para completar el proceso de desinfección.

Una vez desinfectadas, las semillas se abrieron ligeramente por la punta para facilitar la germinación y se colocaron 10-12 semillas en una placa Petri entre dos papeles de filtro autoclavados y sobre un algodón para retener la humedad. Los papeles y el algodón se

humectaron ligeramente y se incubaron en oscuridad a 37°C de 2 a 4 días hasta su germinación. Las semillas germinadas se sembraron en bandejas de alveolos que contenían una mezcla de tierra y perlita y se irrigaron con solución nutritiva. Las plántulas de melón se mantuvieron en fitotrón en unas condiciones de cultivo de 23°C durante el día, y a 20°C durante la noche, y fueron expuestas a 16 horas de luz y 8 de oscuridad hasta su trasplante a invernadero.

### **2.1.3 Análisis Parentales**

#### **2.1.3.1 Verificación de efectos del QTL**

Tras realizar el procedimiento anterior, y una vez que alcanzaron el tamaño adecuado, las plantas de la línea TRI01-2, y de la variedad Piel de Sapo fueron trasplantadas en los invernaderos del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (Málaga), con objeto de verificar las diferencias fenotípicas en la forma final del fruto entre ambos parentales.

Los frutos se recolectaron entre los 45-55 días tras la polinización. Una vez recogidos, se pesaron y se cortaron longitudinalmente para medir la longitud (L) y el diámetro (D). A continuación, se calculó el FSI como parámetro de la forma del fruto, que es la relación entre longitud y diámetro (Longitud/Diámetro). Posteriormente, se calcularon las medias de L, D, y FSI por parental, considerando todos los frutos de cada planta. Las medias de las plantas TRI01-2 se compararon con las medias de las plantas PS, utilizadas como control, mediante un test de Dunnett.

Asimismo, las medias de las plantas cultivados en La Mayora fueron comparadas con las medias de la UPV, con el objetivo de evaluar la variación genotípica y la estabilidad de los efectos del QTL en ambas localizaciones.

#### **2.1.3.2. Ensayo de desarrollo del fruto**

Tras realizar el procedimiento del apartado **2.1.2**, las plantas de la línea TRI01-2, y de la variedad Piel de Sapo fueron trasplantadas en los invernaderos del COMAV (Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana) en la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), para conocer el momento clave en el que se determina la forma definitiva del fruto.

Una vez trasplantadas, se podaron de manera que se dejaron dos ramas principales (pies) por planta, y así garantizar un fruto por cada pie o al menos un fruto por planta para conseguir mayor precisión y fiabilidad de los resultados. Las flores de cada línea se polinizaron manualmente y se midió la longitud y diámetro del ovario con un pie de rey los días 0 (antesis, día de polinización), 3, 5, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 25, 30, 35 y 40 (Días posteriores a la antesis, DPA). Posteriormente, se calculó el índice de forma de fruto (Fruit Shape Index, FSI) como la relación entre la longitud y el diámetro del fruto para cada uno de los días de medición. Asimismo, se consideró el porcentaje de variación relativa entre valores consecutivos ( $\Delta$  (%)) para la longitud, diámetro y FSI, utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta (\%) = \frac{x_2 - x_1}{x_1} \times 100$$

Donde:

·  $x_1$  representa el valor inicial.

·  $x_2$  representa el valor final.

Finalmente, las medias obtenidas por cada día de medición durante el ensayo de desarrollo del fruto fueron representados gráficamente utilizando Excel (Vargas & Hurtado, 2015).

#### 2.1.4 Análisis de datos

Las diferencias fenotípicas entre los parentales se estudiaron mediante un ANOVA de una vía. Además, con la finalidad de estudiar el efecto del ambiente, del genotipo, y la interacción entre el genotipo y el ambiente (GxA) en la morfología de los frutos, y la estabilidad de los efectos del QTL en ambas localizaciones se empleó una ANOVA de dos vías, con el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + E_j + GxA_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

- $Y_{ijk}$  es el valor observado de la longitud, diámetro y FSI.
- $\mu$  es la media general de todas las observaciones.
- $G_i$  es el efecto genotípico.
- $E_j$  es el efecto del ambiente.
- $GxA_{ij}$  es la interacción entre el efecto del genotipo y el ambiente.
- $\epsilon_{ijk}$  es el error aleatorio asociado a la observación.

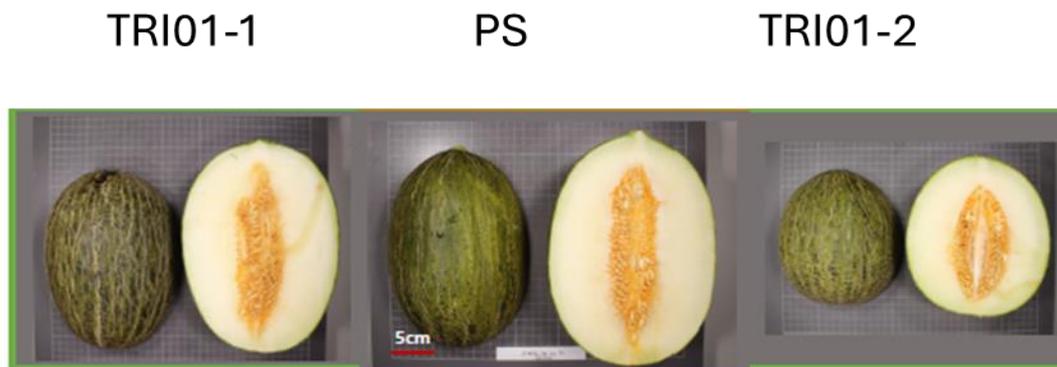
## 2.2 Mapeo fino del QTL

## 2.2.1 Material vegetal

Para la verificación del efecto en la forma del fruto del QTL localizado en el cromosoma 1 y el mapeo fino de la región donde se sitúa el QTL se desarrollaron dos poblaciones  $F_2$  derivadas del cruce entre TRI01-2 y PS que fueron analizadas en dos localizaciones diferentes, siguiendo el protocolo de desinfección y siembra especificado en el apartado 2.1.2.

En los invernaderos de la UPV (Valencia) se analizó una población  $F_2$ , con código 24M16. Además, en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (Málaga), se trasplantaron 200 semillas  $F_2$ , con código 24M19.

En ambas localidades se sembraron los parentales de la población  $F_2$  (Piel de Sapo y TRI01-2) para utilizarlos como controles de la forma del fruto. Adicionalmente, en La Mayora se incluyó la línea TRI01-1, que contiene una introgresión de 9 Mbp del cromosoma 1 de *Trigonus* en el fondo genético de Piel de Sapo (**Figura 12**), utilizándola también como control junto con los parentales anteriormente mencionados.



**Figura 12.** Comparación de frutos representativos de la IL TRI01-1, la variedad Piel de Sapo, y la IL TRI01-2 respectivamente.

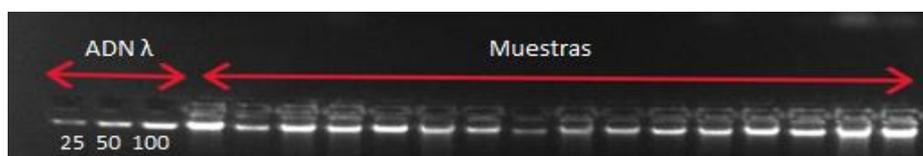
## 2.2.2 Selección de recombinantes

### 2.2.2.1 Extracción de ADN y cuantificación

La extracción de DNA se realizó a partir de hoja nueva o cotiledón de las plántulas sembradas, siguiendo el protocolo de Doyle. (1991) con modificaciones para placas de 96 tubos. Previamente a la extracción, se precalentó a 65°C 400  $\mu$ l/muestra de tampón CTAB (2% CTAB, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM (pH 8), Tris 100 mM (pH 8)). Las muestras fueron introducidas en tiras de 8 tubos de 1,1 ml junto con 2 bolas de acero inoxidable. A continuación, fueron congeladas en nitrógeno líquido para ser molidas en QIAGEN TissueLyser a 24 rpm durante 14 segundos. Más tarde, se añadió al CTAB justo antes de su uso  $\beta$ -mercaptoetanol al 0,2 % y se repartió a las muestras para evitar la degradación del ADN. Estas muestras se incubaron a 65°C por 40 minutos para que actúe el CTAB con el

ADN y se produzca la lisis de membranas celulares y nucleares. Durante este proceso, las muestras se agitaron repetidamente en un vortex para asegurar que el CTAB interactuara de manera homogénea con el ADN. Seguidamente, se añadió 400 µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se mezcló mediante inversión y se sometió a centrifugación a 3300 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este proceso, las muestras se separaron en dos fases, transfiriéndose la fase acuosa superior a tubos nuevos. Se añadieron 500 µl de isopropanol (almacenado a -20°C) a cada una de las muestras, se mezcló mediante inversión y se incubaron de 1 a 24 horas a -20°C para la precipitación de ADN. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 3300 rpm durante 20 minutos. El líquido sobrenadante se eliminó por inversión y se agregaron 400 µl de Washing buffer (Etanol al 76% v/v, Acetato de amonio 10 mM), se agitó con vortex hasta despegar el pellet y se centrifugó nuevamente a 3300 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó por inversión y se dejaron secar los tubos durante 10 minutos para terminar de evaporar el etanol. El ADN se resuspendió con 30 µl de TE (10 mM, EDTA 1 mM) con 0,2 µl de RNAsa a 10 mg/ml por muestra, incubándose para finalizar a 37°C durante 1 hora en agitación.

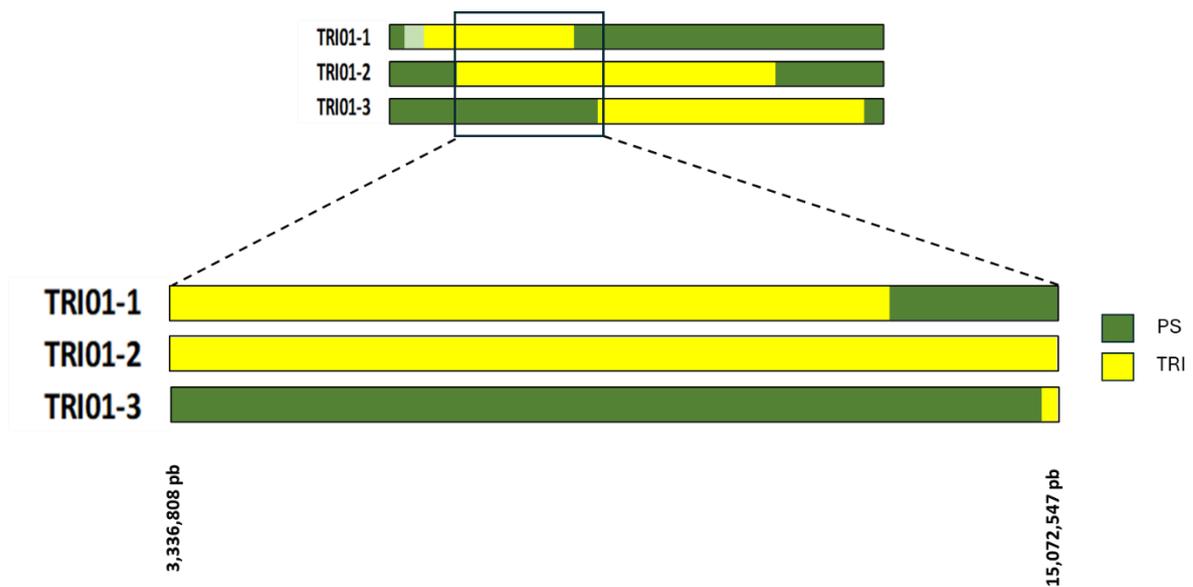
La calidad y concentración de DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,1) y teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Para las muestras, se mezclaron 2 µl del ADN extraído con 2,5 µl de tampón de carga 6x y 6 µl de agua Mili-Q. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel junto con cantidades conocidas (25 ng, 50 ng y 100 ng) de ADN Lambda como referencia. La electroforesis fue realizada a 90 V durante 40 minutos. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta (**Figura 13**), infiriendo la concentración de DNA de las muestras a partir de las concentraciones conocidas de lambda. Finalmente, el ADN se diluyó a 1 ng/µl en un volumen final de 50 µl.



**Figura 13.** Imagen de varias muestras de ADN a través de la luz ultravioleta en el transiluminador junto con las muestras de ADN Lambda patrón (25 ng, 50 ng y 100 ng) para la cuantificación.

### 2.2.2.2 Marcadores flanqueantes

A partir de las secuencias de Piel de (PS) y Trigonus (TRI), se identificaron SNPs en la región de introgresión del cromosoma 1. Para la selección de recombinantes se emplearon SNPs que abarcaban desde el inicio de la región de introgresión común entre TRI01-2 y TRI01-1, debido a que ambas líneas mostraron frutos significativamente más redondos que PS, hasta el inicio de la región común entre TRI01-2 y TRI01-3, ya que esta última línea no presentó diferencias significativas en la forma del fruto respecto a PS. De esta forma, se eligieron como marcadores flanqueantes Chr1\_3336808 y Chr1\_15072547, ubicados en las posiciones 3,336,808 y 15,072,547, respectivamente, cubriendo una región de aproximadamente 12 Mb (**Figura 14**).



**Figura 14.** Región de introgresión propuesta para la saturación con marcadores moleculares destinada a la selección de recombinantes. Se muestra en amarillo la región de introgresión de Trigonus (TRI) sobre fondo genético Piel de Sapo (PS), en verde. Se indican las posiciones en pares de bases (pb) de los marcadores seleccionados como flanqueantes, que abarcan desde la región compartida entre TRI01-2 y TRI01-1 hasta el inicio de la región común entre TRI01-2 y TRI01-3.

### 2.2.2.3 Diseño de cebadores

Una vez seleccionados los marcadores flanqueantes, se diseñaron los cebadores para realizar el genotipado por la técnica PACE®, basada en una discriminación alelo-específica para el análisis de SNPs, inserciones o deleciones (Shavrukov, 2023).

Para ello se diseñaron 3 oligonucleótidos: dos forwards y un reverse. El cebador forward consistía en 16-22 nucleótidos junto con el SNP, siendo este SNP el último nucleótido de la secuencia del cebador y distinto entre los dos oligos.

Forward 1: **GAAGGTGACCAAGTTCATGCTxxxxxxxxxxxxxxxxx1**

Forward 2: **GAAGGTCGGAGTCAACGGATTxxxxxxxxxxxxxxxxx2**

Nucleótido variable correspondiente al SNP [1/2]

La diferencia, es la variante del SNP que tiene cada uno de los Forward. Por último, el reverse es la secuencia reversa complementaria de la secuencia situada justo después del SNP (a una distancia de 1-4 nucleótidos preferentemente) y con una longitud de 28-30 nucleótidos. Es único para la reacción, no hay más de un reverse.

### 2.2.2.4 Genotipado



**Figura 16.** Ejemplo de gráfica generada por Thermo Fisher™ Cloud. Los individuos homocigotos para cada alelo se representan en azul y rojo, mientras que los heterocigotos, que presentan ambos alelos, se muestran en verde.

#### **2.2.2.5 Fenotipado**

Las plántulas recombinantes seleccionadas fueron trasplantadas en la primavera de 2024 al invernadero del COMAV en la Universidad Politécnica de Valencia. Las flores fueron embolsadas en pre-antesis para prevenir polinización cruzada y se autofecundaron. Los frutos se recolectaron entre los 45-55 días de la polinización. Una vez recogidos, se pesaron y se cortaron longitudinalmente para medir la longitud y el diámetro. A continuación, se calculó el FSI como parámetro de la forma del fruto, que es la relación entre longitud y diámetro (Longitud/Diámetro). Además, fueron fotografiados para la posterior caracterización, y se evaluó el número de carpelos presentes y la dehiscencia de estos. Finalmente, se guardaron las semillas para futuros ensayos.

En el caso del ensayo en La Mayora, se utilizaron polinizadores para asegurar el cuajado del fruto. Los frutos se recogieron cuando alcanzaron el estado de madurez y se fenotiparon tal como se indica anteriormente.

#### **2.2.2.6 Saturación de la región con nuevos marcadores**

Los nuevos marcadores fueron diseñados como se especifica en el apartado **2.2.2.3**. Estos se seleccionaron distribuidos a razón de 1Mb a lo largo de la región de introgresión elegida para la selección de recombinantes. Además, se seleccionaron los marcadores Chr1\_17002553 y Chr1\_17913491 posteriores a esta región, diseñando un total de 18 marcadores nuevos. De estos, Chr1\_14603738, Chr1\_14956485 y Chr1\_16000882 fueron descartados por no ser polimórficos.

Las secuencias de los marcadores seleccionados para este estudio se muestran en el **Anexo 1**.

Todas las plantas cultivadas en el invernadero del COMAV de la UPV, fueron sometidas a genotipado. Sin embargo, en el ensayo realizado en La Mayora, se utilizó la estrategia de *Selective Genotyping* (Darvasi & Soller, 1992), seleccionando aquellas plantas que mostraron los fenotipos más extremos en cuanto a la forma del fruto (más redondos y alargados) para su genotipado y análisis posterior.

#### **2.2.2.7 Mapa físico y genético.**

El mapa físico se generó a partir de la posición en el genoma v4.0 de referencia de los nueve marcadores empleados en la UPV, y se dibujó con la herramienta MapChart (Voorrips, 2002)

El mapa genético se realizó a partir de los datos de genotipado de las plantas F<sub>2</sub> seleccionadas de La Mayora con ICI mapping v4.2 (Meng et al., 2015), empleando la función de Kosambi y fue dibujado también con MapChart.

### 2.2.3 Análisis de datos

Los estadísticos básicos (medias, desviación estándar, distribución) para los parentales y la población  $F_2$  fueron calculados para los datos fenotípicos con el programa JMP 12.1 (Jones & Sall, 2011).

Por otro lado, para estudiar la asociación entre los marcadores y los caracteres fenotípicos se realizó un ANOVA de una vía.

El análisis de QTL se realizó mediante mapeo por intervalos compuestos (Composite Interval Mapping) utilizando el programa Q Gene v4.4 (Nelson, 1997). Se realizó una prueba de permutaciones 5000 veces con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , para establecer el umbral a partir del cual se consideraron significativos los QTL. El LOD score y el efecto aditivo fueron calculados también por el mismo programa.

### 3. Resultados

#### 3.1 Evaluación de los efectos del QTL en la forma y desarrollo del fruto

##### 3.1.1 Verificación de los efectos del QTL en la forma final del fruto

El análisis ANOVA, realizado con datos de 10 plantas de la línea TRI01-2 y 10 plantas de la variedad Piel de Sapo, mostró diferencias significativas entre ambos parentales para los tres caracteres medidos, longitud, diámetro y FSI al momento de la cosecha (**Tabla 2**). Entre estos, la longitud y el FSI presentaron diferencias altamente significativas. Además, el análisis estadístico se complementó con la prueba de Dunnett, donde también se observaron diferencias significativas entre PS y TRI01-2

Los resultados muestran que PS presenta un promedio de longitud (16.86 cm), diámetro (13.63 cm) y FSI (1.24) significativamente mayor que TRI01-2, que mostró valores promedio de 13.01 cm, 12.26 cm y 1.06, respectivamente

**Tabla 2.** Medias y desviaciones estándar de los genotipos para longitud, diámetro y FSI. Los valores con  $p < 0.05$ , considerados significativos según la ANOVA y el test de Dunnett, se resaltan en rojo.

Variable	Genotipo	Media (cm)	P-valor ANOVA	P-valor Dunnett
L	PS	16.86 ± 1.02	<0.0001	5.E-06
	TRI01-2	13.01 ± 1.51		
D	PS	13.63 ± 0.71	0,0014	0.001
	TRI01-2	12.26 ± 0.85		
FSI	PS	1.24 ± 0.05	<0.0001	4.E-06
	TRI01-2	1.06 ± 0.07		

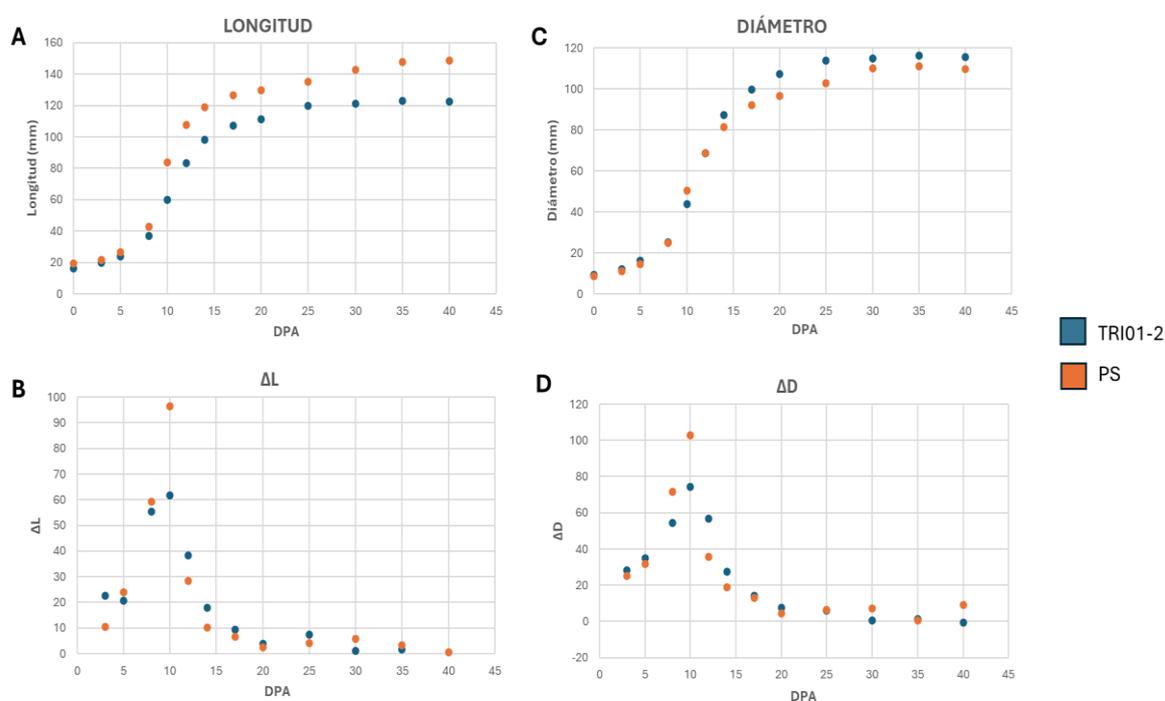
##### 3.1.2 Efectos del QTL durante el desarrollo del fruto

Las 15 plantas de la variedad Piel de Sapo y las 15 de la línea TRI01-2 fueron trasplantadas al invernadero del COMAV para estudiar los momentos clave en el desarrollo del fruto en ambos parentales para las tres variables de estudio.

La longitud del fruto aumentó rápidamente entre 5 y 10 días posteriores a la antesis (DPA) en la variedad Piel de Sapo (PS) (**Figura 17A**), observándose un pico de crecimiento entre 8 y 10 DPA, periodo en el que se duplicó su longitud (**Figura 17B**). A partir de 10 DPA, el

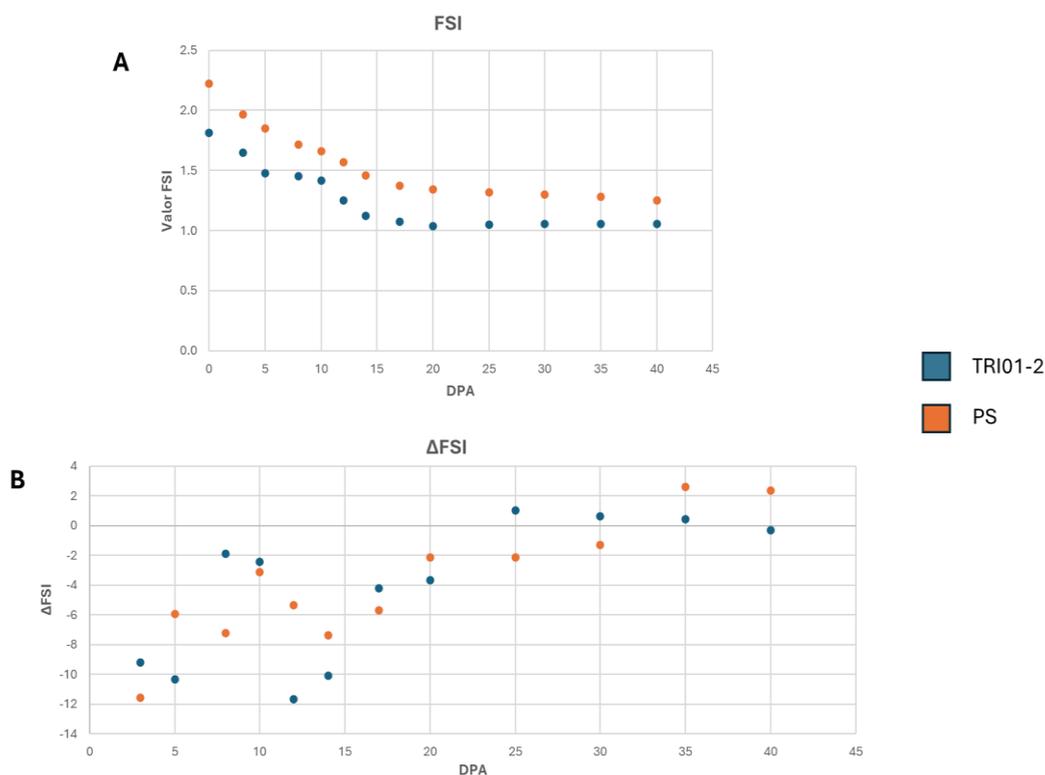
crecimiento se ralentiza y se estabiliza alrededor de 35 DPA. Por otro lado, la línea TRI01-2 muestra un patrón de crecimiento similar al de PS, con un pico entre los 8 y 10 DPA, debido al incremento del 62%. Posteriormente, el crecimiento se ralentiza y se estabiliza cerca de 25 DPA. Entre genotipos no se observan diferencias visibles en 0 DPA (antes de la polinización), sin embargo, a partir de 10 DPA comienzan a aparecer diferencias visibles entre ambos.

En cuanto al diámetro, la tendencia de la gráfica es similar a la de longitud. PS experimenta un rápido aumento entre 5 y 10 DPA (**Figura 17C**), observándose un pico entre 8 y 10 DPA, periodo en el que se duplica su diámetro (**Figura 17D**). A partir de 30 DPA el crecimiento se ralentiza y se estabiliza. Por otro lado, TRI01-2 muestra un crecimiento similar al de PS los mismos días, observándose un pico de crecimiento entre 8 y 10 DPA, debido al incremento del 74% del diámetro. A partir de 25 DPA el crecimiento se ralentiza y se estabiliza. Entre genotipos no se observan diferencias visibles en 0 DPA. No obstante, a partir de 14 DPA comienzan a aparecer ligeras diferencias visibles entre ambos.



**Figura 17.** Gráficos de longitud (A), diámetro (C), y de la variación de sus valores (B), (D) respectivamente a lo largo de los 40 días para TRI01-2 y PS. Los valores de longitud y diámetro están expresados en milímetros (mm).

El índice de forma del fruto (FSI) es el parámetro que mejor caracteriza la morfología del fruto. Durante los primeros DPA, el FSI de PS y TRI01-2 va disminuyendo gradualmente, alcanzando su punto más bajo alrededor de 25 y 20 DPA respectivamente (**Figura 18A**), momento en el que empieza a estabilizarse su valor (**Figura 18B**). Entre genotipos se observan diferencias visibles desde 0 DPA en adelante.



**Figura 18.** Gráficos del índice de forma del fruto (FSI) (A), y de la variación de sus valores (B) a lo largo de los 40 días para TRI01-2 y PS.

### 3.1.3 Estabilidad de los efectos del QTL y variación fenotípica entre localizaciones

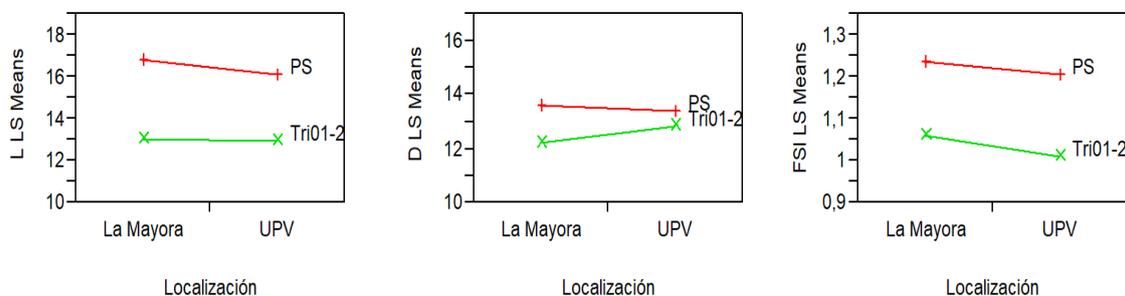
El análisis ANOVA mostró que el efecto del genotipo fue significativo para la longitud, diámetro y FSI. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ni en el efecto ambiental ni en la interacción Genotipo-Ambiente (GxA) entre localizaciones (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** p-valor del ANOVA de dos vías realizado para evaluar los efectos genotípicos, ambientales y la interacción entre ambos (GxA) sobre L, D, FSI en PS y TRI01-2. Los valores de  $p < 0.05$  se consideran significativos y se resaltan en rojo.

Efecto	L	D	FSI
Genotipo	<0.0001	0.0323	<0.0001
Ambiente	0.5052	0.6485	0.0642
Interacción GxA	0.5162	0.3398	0.6074

Los valores de longitud fueron consistentemente mayores en PS, independientemente de la localización, y esta variable fue la que mostró las mayores diferencias entre genotipos

en ambas localizaciones. En cuanto al diámetro, las diferencias entre PS y TRI01-2 fueron mínimas en la UPV, mientras que en La Mayora se evidenciaron mayores diferencias entre genotipos. Por último, los valores de FSI fueron superiores en PS, independientemente de la localización. (**Figura 19**).



**Figura 19.** Gráficos de la interacción Genotipo-Ambiente de los tres caracteres: L, D y FSI, para PS (rojo) y TRI01-2 (verde) en ambas localidades, UPV y La Mayora.

De esta forma, el estudio demuestra que las diferencias observadas en la longitud, diámetro y FSI se deben al genotipo, y no al ambiente, ni a la interacción entre ambos, confirmando la estabilidad del efecto del QTL a pesar de la localización.

## 3.2 Mapeo fino

### 3.2.1 Análisis de poblaciones F<sub>2</sub>

Para las 250 plantas F<sub>2</sub> cultivadas en la UPV, se calculó el porcentaje de germinación (Nº semillas sembradas/ nº plántulas germinadas):

$228/250 = 0.91$ , equivalente al 91%.

Tras el genotipado con los marcadores flanqueantes (Chr1\_3336808 y Chr1\_15072547) se obtuvieron un total de 64 recombinantes. A su vez, se calculó la frecuencia de recombinación, FR (Nº recombinantes/ gametos totales):

$FR = 64/456 = 0.140 = 14$  cM, equivalente al 14%.

Además, considerando que los 64 recombinantes se detectaron en una región de 12 Mb, se estimó la distancia promedio entre eventos de recombinación (Longitud de la región/ nº recombinantes):

$12 \text{ Mb} / 64 = 0.1875 \text{ Mb}$ , equivalente a un evento de recombinación cada 0.19 Mb.

Por último, se calculó la relación entre la distancia física y genética (Longitud de la región / FR):

12 Mb / 14 cM = 0.85 Mb/cM.

De las 64 plantas recombinantes, se fenotiparon los frutos de 50 plantas, descontando las muertas y las que no dieron frutos. Finalmente, el análisis se realizó con los datos de 41 de estas, descontando las plantas que presentaban frutos con bajo peso, o no desarrollados adecuadamente.

Por otro lado, en la población  $F_2$  de La Mayora, tras fenotipar los frutos de las 200 plantas, se seleccionaron 88 de ellas, cuyos frutos presentaban los fenotipos más extremos en cuanto a la forma del fruto, para su posterior genotipado.

### 3.2.2 Distribución fenotípica $F_2$

Se realizó la distribución de las variables longitud, diámetro y FSI, tanto de las plantas recombinantes seleccionadas en la UPV, como de la población  $F_2$  de La Mayora. Las distribuciones fueron compararon con los valores promedio de estas mismas variables para TRI01-2 y PS (**Tabla 4**). En el caso de La Mayora, también se incluyeron los valores promedio de la línea TRI01-1.

**Tabla 4.** Medias y desviaciones estándar de PS, TRI01-2 y de los recombinantes  $F_2$  cultivados en la UPV, así como, en el caso de La Mayora, de la población  $F_2$  para longitud, diámetro y FSI. En esta última localización también se incluyó el análisis de la línea TRI01-1.

Localización	Genotipo	L (cm)	D (cm)	FSI
UPV	$F_2$	14.93 ± 1.81	13.32 ± 0.20	1.12 ± 0.09
	PS	16.16 ± 1.91	13.41 ± 0.60	1.21 ± 0.05
	TRI01-2	13.00 ± 1.61	12.87 ± 0.38	1.01 ± 0.06
La Mayora	$F_2$	16.36 ± 2.00	13.70 ± 1.04	1.19 ± 0.10
	PS	16.86 ± 0.75	13.63 ± 0.71	1.24 ± 0.05
	TRI01-1	15.04 ± 1.32	12.87 ± 1.11	1.17 ± 0.05
	TRI01-2	13.01 ± 0.72	12.26 ± 0.85	1.06 ± 0.07

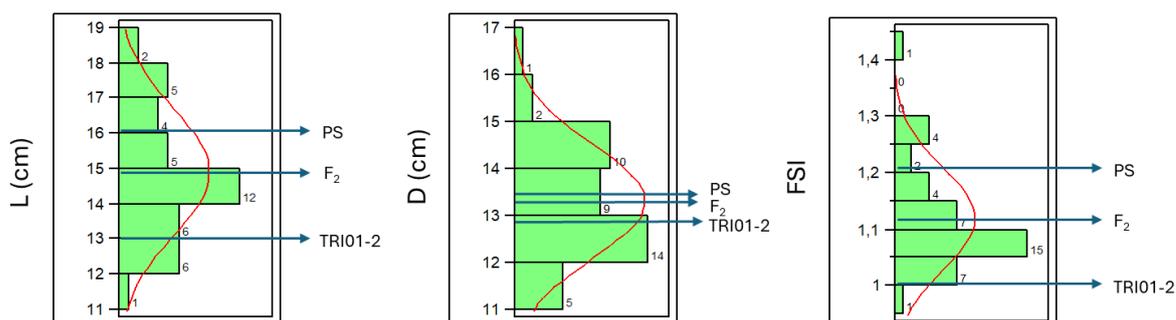
Para las 42 plantas recombinantes seleccionadas en la UPV (**Figura 20A**), los valores de longitud de los recombinantes seleccionados mostraron una distribución normal, con una mayor frecuencia de individuos entre 14-15 cm, donde también se sitúa la media de la población  $F_2$ . Esta media se encuentra entre los valores de ambos parentales, siendo un 15% superior al de TRI01-2 y un 8% inferior al de PS.

Para el diámetro, los valores presentan una distribución normal con un ligero desplazamiento hacia la derecha, con una mayor frecuencia de individuos entre 12-13 cm, donde se sitúa la media de TRI01-2. La media de la población  $F_2$  se encuentra entre las

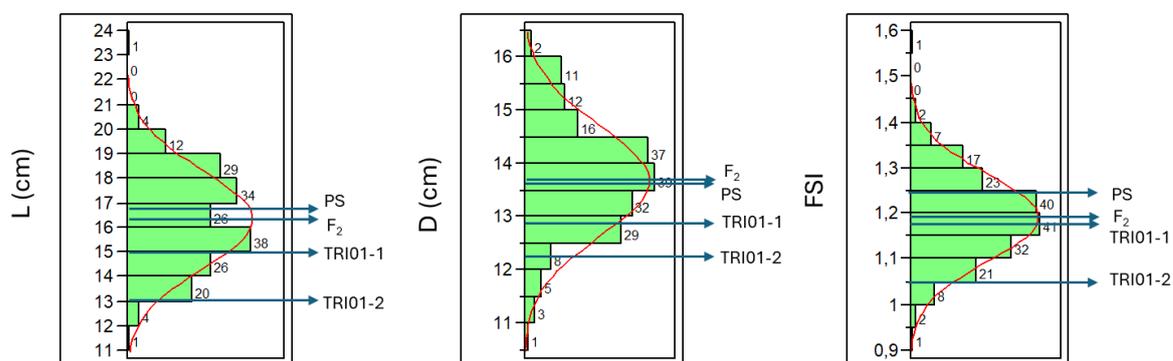
medias de ambos parentales, encontrándose más cerca de PS, siendo un 0,7 menor que este último, y un 3% mayor que TRI01-2.

Respecto el FSI, la distribución normal presenta un desplazamiento hacia la derecha, similar al observado para el diámetro, lo que indica que una mayor proporción de la población  $F_2$  presenta frutos más redondos que PS. La frecuencia máxima se encuentra en el intervalo de 1.05-1.1. La media de la  $F_2$  se sitúa entre los valores de ambos parentales, siendo un 11% superior a TRI01-2 y un 7% inferior a PS.

### A) UPV

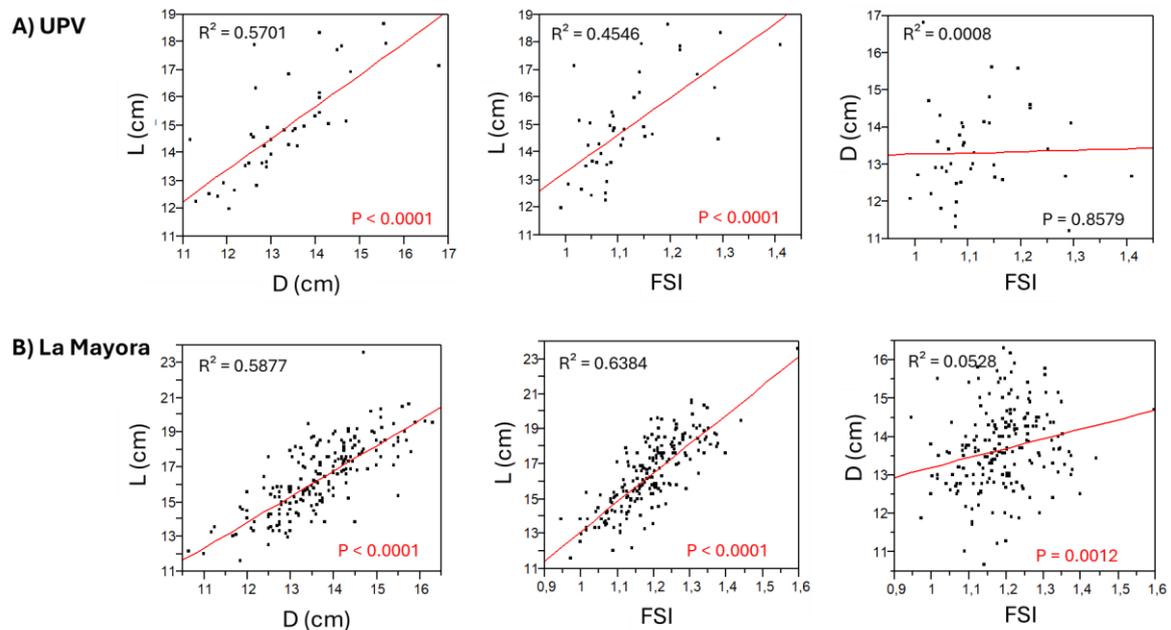


### B) La Mayora



**Figura 20.** Representación gráfica de la distribución de la longitud, diámetro, y FSI de las plantas recombinantes  $F_2$  en la Universidad Politécnica de Valencia (A), como de La Mayora (B). En esta última localización también se incluyó el análisis de la línea TRI01-1. Las gráficas muestran el número de plantas dentro de cada rango de medida. Los valores medios de longitud, diámetro y FSI para los genotipos PS,  $F_2$  y TRI01-2 están indicados en las distribuciones correspondientes.

El análisis de correlación (**Figura 21A**) muestra una relación lineal positiva y altamente significativa entre la longitud y el diámetro, así como entre la longitud y FSI. Sin embargo, la relación entre el diámetro y FSI, aunque también lineal y positiva, no es significativa, lo que sugiere que FSI está menos influenciado por el diámetro en comparación con la longitud.



**Figura 21.** Relación lineal entre longitud y diámetro, longitud y FSI, y diámetro y FSI en la UPV (A) y La Mayora (B). Los ajustes significativos, determinados mediante ANOVA con  $p < 0.05$ , se destacan en rojo. Asimismo, se presentan los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) correspondientes para cada relación.

En el caso de las 200 plantas  $F_2$  de la Mayora (**Figura 20B**), los resultados para la longitud muestran una distribución normal con un ligero desplazamiento hacia la derecha, con una mayor frecuencia de individuos entre 15-16 cm, donde se encuentra la media de TRI01-1. La media de la  $F_2$  es mayor que las ILs TRI01-1 y TRI01-2, sin embargo, menor que la de PS. Siendo la media de la  $F_2$  un 9% mayor que TRI01-1, un 26% mayor que TRI01-2, y un 3% más pequeña que PS.

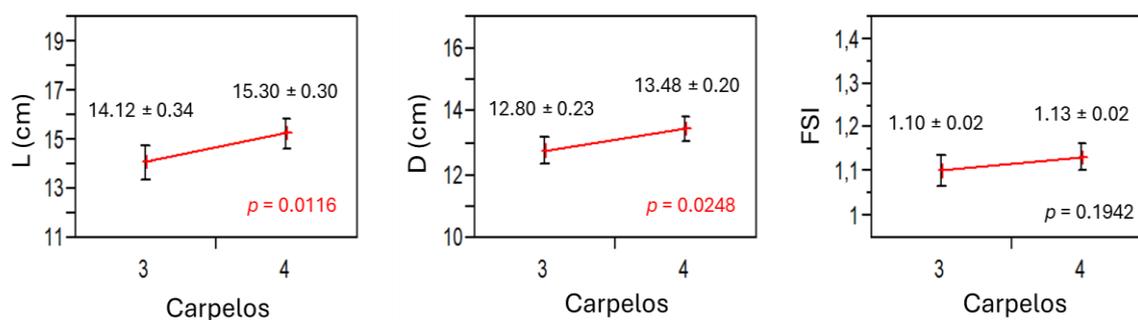
Los valores de diámetro de las plantas seleccionadas presentan una distribución normal, con una mayor frecuencia de individuos con 13.5-14 cm, donde se encuentra la media de la  $F_2$  como de PS. La media de la  $F_2$  es mayor que las ILs TRI01-1 y TRI01-2, pero prácticamente igual a la de PS. Siendo la media de la  $F_2$  un 6% mayor que TRI01-1, un 12% mayor que TRI01-2, y sólo un 0,5% mayor que la media de PS.

Respecto el FSI, la distribución muestra una distribución normal con desplazamiento ligeramente hacia la derecha, y presenta mayor frecuencia de individuos en el intervalo 1.15-1.2, donde también se encuentra la media para TRI01-1 y PS. La media de la  $F_2$  es mayor que las de ambas ILs, pero menor que la de PS. Siendo la media de la  $F_2$  un 12% mayor que TRI01-2, un 1.7% mayor que TRI01-1, y un 4% menor que PS.

El análisis de correlación (**Figura 21B**) muestra una relación lineal positiva y altamente significativa entre la longitud y el diámetro, como entre la longitud y FSI. La relación entre el diámetro y FSI, aunque también lineal, positiva y significativa, es significativamente más débil que las anteriores. Esto sugiere que FSI se encuentra principalmente influenciado por la longitud en comparación con el diámetro.

### 3.2.3 Efecto del número de carpelos en la morfología de fruto

El efecto del número de carpelos mostró diferencias significativas tanto en la longitud del fruto como en su diámetro (**Figura 22**), de tal forma que, los frutos con 4 carpelos presentan una media de longitud y diámetro mayor que los frutos que presentan 3 carpelos. Este efecto sin embargo no afectó a la forma final del fruto y no se observaron diferencias significativas en FSI en base al número de carpelos.



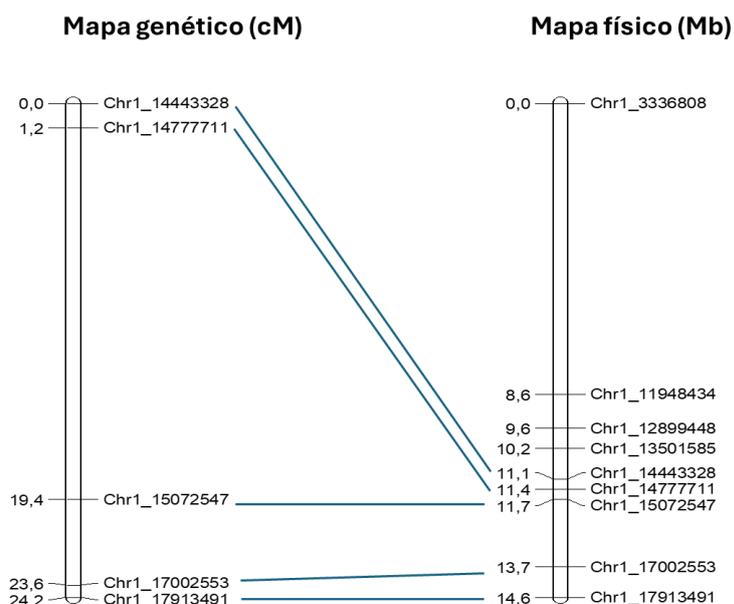
**Figura 22.** Gráficos que muestran la variación de la longitud (L), diámetro (D) y FSI en función del número de carpelos presentes en las plantas recombinantes  $F_2$  seleccionadas de la UPV. Se incluyen las medias y desviaciones estándar de estas variables para los frutos con 3 y 4 carpelos. Los valores de  $p < 0.05$  se consideran significativos y se resaltan en rojo.

### 3.2.4 Mapa genético y físico

Las plantas recombinantes de la población  $F_2$  cultivada en la UPV fueron genotipadas utilizando marcadores diseñados para saturar la región de introgresión de TRI01-2. El genotipo de las plantas  $F_2$  se presenta en el **Anexo 2**, mientras que en el **Anexo 4** se detalla la posición de los marcadores dentro de la región de introgresión. Los resultados revelaron una baja frecuencia de recombinación entre la mayoría de los marcadores, con la excepción del intervalo Chr1\_14443328-Chr1\_15072547, donde se detectó una mayor recombinación.

El mapa genético se construyó a partir de las distancias genéticas entre los cinco marcadores utilizados en el genotipado de la población  $F_2$  de La Mayora (**Anexo 3**), calculadas con el programa QTL IciMapping (Meng et al., 2015). El mapa final mostró una distancia total de 24.2 cM (**Figura 23**). La población  $F_2$  de La Mayora se utilizó como referencia para el mapa, ya que no había sido seleccionada por recombinación entre marcadores, a diferencia de la población  $F_2$  de la UPV, cuyo empleo podría generar distorsiones en el mapa genético.

El mapa físico (**Figura 23**) se construyó con las posiciones de los marcadores en el genoma de referencia v4.0 seleccionados para el ensayo en la Universidad Politécnica de Valencia y presentó una distancia total de 14.6 Mb.



**Figura 23.** Representación combinada del mapa genético y físico, indicando las distancias genéticas (cM) y físicas (Mb) respectivamente. El mapa genético fue elaborado a partir de los datos de genotipado de la población F<sub>2</sub> cultivada en La Mayora, mientras que el mapa físico se determinó con las posiciones de los marcadores en el genoma de referencia v4.0 seleccionados para el ensayo en la UPV.

La relación entre el número de recombinaciones y la distancia física osciló entre los intervalos de los marcadores (**Tabla 5**). El número de plantas recombinantes entre intervalos varió entre 0 en el tercer (Chr1\_12899448-Chr1\_13501585) y cuarto (Chr1\_13501585-Chr1\_14443328) intervalo hasta 43 en el sexto intervalo (Chr1\_14777711-Chr1\_15072547). El alto número de recombinaciones observado en este último intervalo se asocia con una relación kb/número de recombinaciones relativamente baja.

**Tabla 5.** Distancia física (pb) entre los marcadores seleccionados en la UPV, el número de plantas recombinantes identificadas entre dichos marcadores y la relación de Kb por cM en cada intervalo entre dos marcadores consecutivos.

Intervalo	Nº recombinantes	Distancia física (pb)	Ratio kb/nº recombinantes
Chr1_3336808-Chr1_11948434	4	8,611,626	2,153
Chr1_11948434-Chr1_12899448	1	951,014	951
Chr1_12899448-Chr1_13501585	-	602,137	-
Chr1_13501585-Chr1_14443328	-	941,743	-
Chr1_14443328-Chr1_14777711	3	334,383	111
Chr1_14777711-Chr1_15072547	43	294,836	7
Chr1_15072547-Chr1_17002553	5	1,930,006	386
Chr1_17002553-Chr1_17913491	2	910,938	455

La relación entre las distancias genéticas y físicas varió entre los intervalos de los marcadores (**Tabla 6**). La distancia genética entre marcadores varió entre 0.60 cM en el cuarto intervalo (Chr1\_17002553- Chr1\_17913491), hasta 18.20 cM en el segundo intervalo (Chr1\_14777711-Chr1\_15072547), debido a una alta frecuencia de eventos de recombinación ocurridos en esta región, presentando un ratio kb/cM más bajo en comparación con los otros intervalos. La distancia genética puede estar relacionada con la distancia física, sin embargo, en la tabla se observa como los valores oscilan, indicando que podría estar ocurriendo algún fenómeno en la región.

**Tabla 6.** Distancia genética (cM) y distancia física (pb) entre los marcadores seleccionados en La Mayora, y la relación de Kb por cada cM en un intervalo de dos marcadores consecutivos.

Intervalo	Distancia genética (cM)	Distancia física (pb)	Ratio kb/cM
Chr1_14443328-Chr1_14777711	1.20	334,383	279
Chr1_14777711-Chr1_15072547	18.20	294,836	16
Chr1_15072547-Chr1_17002553	4.20	1,930,006	460
Chr1_17002553-Chr1_17913491	0.60	910,938	1,518

En ambas poblaciones F<sub>2</sub>, el patrón de recombinación es consistente. Se observa una baja o nula recombinación en los intervalos anteriores a Chr1\_14777711, mientras que en el intervalo Chr1\_14777711-Chr1\_15072547, se identifican un alto número de recombinantes, lo que indica la presencia de un hotspot de recombinación. A partir de Chr1\_15072547, la proporción de recombinantes vuelve a reducirse.

### 3.2.5 Asociación de los marcadores y la forma de fruto

En el ensayo de la Universidad Politécnica de Valencia, ninguno de los distintos marcadores tuvo un impacto significativo sobre el índice de forma del fruto (FSI) (**Tabla 7**). No obstante, el marcador Chr1\_14777711 presentó la media más baja de FSI cuando el alelo TRI estaba presente (1.04).

**Tabla 7.** Resumen de las medias del valor de FSI por alelo de los marcadores utilizados en la Universidad Politécnica de Valencia. Los valores de  $p < 0.05$  se consideran significativos.

Marcador	Alelo	FSI	P-valor
Chr1_3336808	H	1.11 ± 0.09	0,2061
	PS	1.14 ± 0.09	
	TRI	1.07	
Chr1_11948434	H	1.11 ± 0.10	0,4034
	PS	1.13 ± 0.09	
	TRI	1.07	
Chr1_12899448	H	1.09 ± 0.06	0,1653
	PS	1.14 ± 0.10	
	TRI	1.07	
Chr1_13501585	H	1.09 ± 0.06	0,1223
	PS	1.15 ± 0.10	
	TRI	1.07	
Chr1_14443328	H	1.09 ± 0.06	0,1223
	PS	1.15 ± 0.10	
	TRI	1.07	
Chr1_14777711	H	1.09 ± 0.06	0,1158
	PS	1.15 ± 0.10	
	TRI	1.04	
Chr1_15072547	H	1.13 ± 0.08	0,1572
	PS	1.17 ± 0.14	
	TRI	1.08 ± 0.06	
Chr1_17002553	H	1.12 ± 0.08	0,1456
	PS	1.20 ± 0.14	
	TRI	1.09 ± 0.06	
Chr1_17913491	H	1.13 ± 0.09	0,1867
	PS	1.18 ± 0.15	
	TRI	1.09 ± 0.06	

Por otro lado, en el ensayo realizado en La Mayora, todos los marcadores mostraron un impacto significativo sobre el FSI (**Tabla 8**). Entre ellos, los marcadores Chr1\_14443328, Chr1\_14777711 y Chr1\_17913491 presentaron valores altamente significativos. Además, Chr1\_14443328 y Chr1\_14777711 mostraron los valores más altos de F ratio, y se asociaron con las medias más bajas de FSI cuando el alelo TRI estaba presente (1.05 y 1.04, respectivamente).

**Tabla 8.** Resumen de las medias del valor de FSI por alelo de los marcadores utilizados en La Mayora. Los valores de  $p < 0.05$ , considerados significativos, se destacan en rojo. También se muestra el F-ratio asociado a cada valor  $p$ .

Marcador	Alelo	FSI	P-valor	F ratio
Chr1_14443328	H	1.14±0.11	<0,0001	29.4809
	PS	1.30±0.11		
	TRI	1.05±0.04		
Chr1_14777711	H	1.14±0.10	<0,0001	30.0086
	PS	1.30±0.11		
	TRI	1.04±0.03		
Chr1_15072547	H	1.18±0.14	0,0035	6.0405
	PS	1.29±0.08		
	TRI	1.15±0.12		
Chr1_17002553	H	1.17±0.12	0,0005	8.4666
	PS	1.31±0.12		
	TRI	1.15±0.12		
Chr1_17913491	H	1.15±0.12	<0,0001	11.4870
	PS	1.31±0.11		
	TRI	1.16±0.13		

### 3.2.6 Análisis de QTL

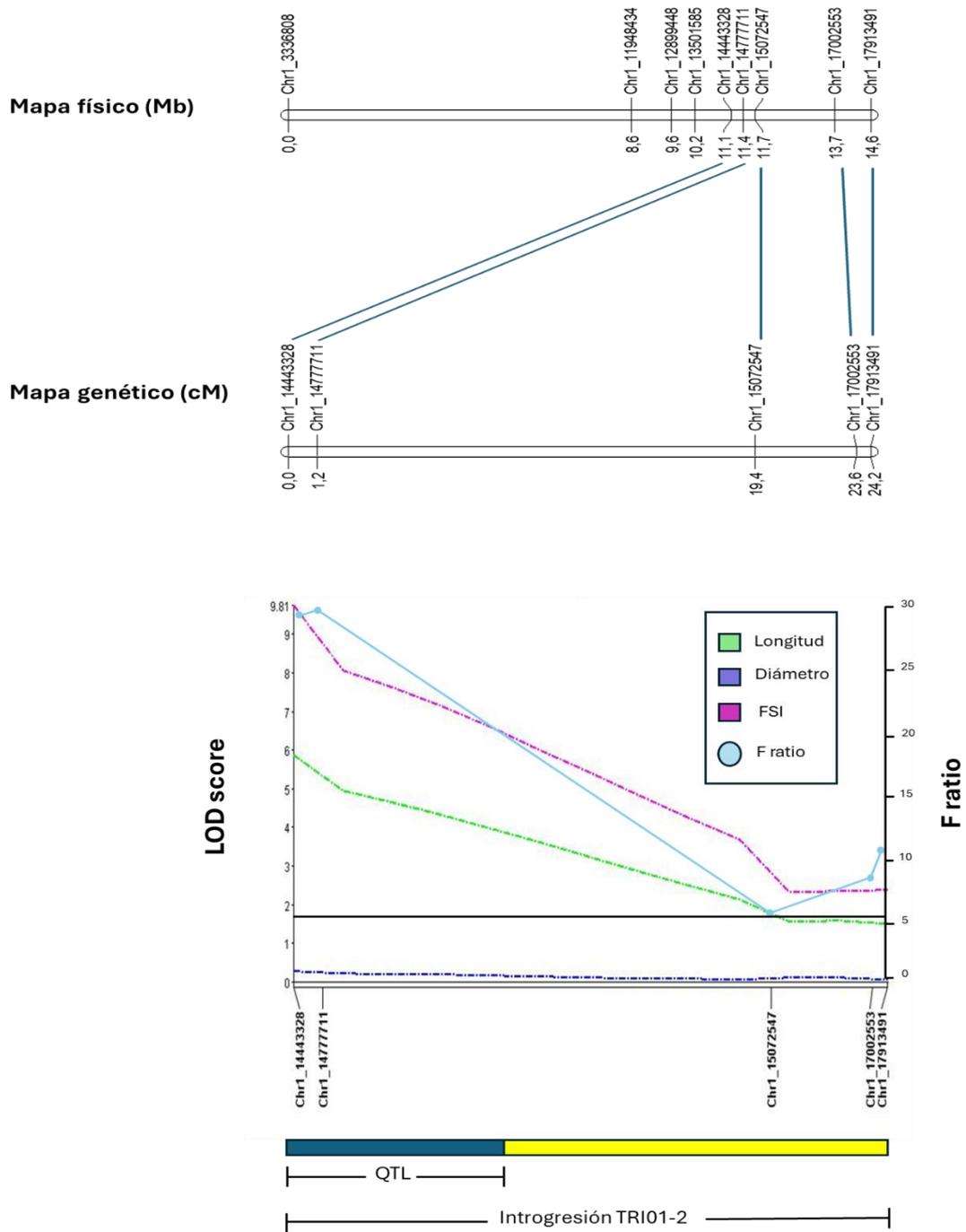
El análisis de QTLs con el programa QGene, identificó un QTL asociado al índice de forma del fruto (FSI) con un LOD score de 9.74 (**Tabla 9**), valor que supera ampliamente el umbral de LOD calculado por el test de permutación (1.83) (**Figura 24**). Este LOD score alto indica una fuerte asociación entre las diferencias en la forma del fruto observadas y la región genómica analizada, sugiriendo la presencia de uno o más genes responsables de la variación en el FSI. Además, se detectó un segundo valor de LOD score de 5.87, asociado a la longitud del fruto, respaldando la relación entre la longitud y la forma del fruto. En contraste, el análisis del diámetro no reveló una asociación significativa, ya que su LOD score fue de 0.26, insuficiente para superar el umbral de significancia, descartándose la presencia de un QTL para este rasgo.

**Tabla 9.** Datos de QGene que muestran el LOD score y el efecto aditivo de las variable FSI, y longitud, en el intervalo Chr1\_14443328-Chr1\_14777713.

Variable	Intervalo	LOD score	Efecto aditivo
L	Chr1_14443328-Chr1_14777713	5.87	2.02
D	Chr1_14443328-Chr1_14777714	0.26	0.18
FSI	Chr1_14443328-Chr1_14777713	9.74	0.13

La región genómica asociada al FSI se encuentra entre los marcadores Chr1\_14443328 y Chr1\_14777711, que también presentaron los valores de F ratio más altos para el FSI (29.48 y 30.01, respectivamente) (**Figura 24**). Esto indica que dichos marcadores están más fuertemente asociados con el carácter de forma del fruto en comparación con otros marcadores analizados.

Dentro del intervalo que presentó el valor de LOD score significativo, el efecto aditivo es positivo tanto para el FSI como para la longitud (**Tabla 9**), siendo el efecto de este último de mayor magnitud. Esto sugiere que la presencia del alelo PS incrementa el carácter longitud del fruto. Por su parte el FSI y el diámetro no muestran un aumento pronunciado por la presencia del alelo PS.



**Figura 24.** Representación de los cinco marcadores seleccionados en La Mayora en los mapas físico (en Mb) y genético (en cM), junto con el F ratio de FSI y el LOD score asociado a las variables de longitud (L), diámetro (D) y FSI. Adicionalmente, una representación de dónde se piensa que está el QTL, en amarillo, zona de introgresión TRI01-2, en azul oscuro, zona probable de QTL. El umbral de LOD se representa como la línea negra continua.

## 4. Discusión

### 4.1 Efectos del QTL durante el desarrollo del fruto

Este estudio tuvo como objetivo determinar los momentos de desarrollo claves para la morfología del fruto de la línea de introgresión TRI01-2, y de la variedad Piel de Sapo (PS). Según (Zhao et al. 2024), en *Cucumis sativus* (del mismo género que *Cucumis melo*), el crecimiento del fruto se divide en tres fases : división celular (menos de 4 días después de la antesis), expansión exponencial (alcanzando su máximo a los 8 días después de la antesis), y el crecimiento post-expansión (más de 12 días después de la antesis).

En el ensayo de desarrollo se observó que ambos parentales muestran un patrón de crecimiento similar entre sí. Presentan una rápida elongación tanto longitudinal como transversal entre 5 y 10 DPA. El máximo crecimiento para ambas variables se alcanzó entre 8 y 10 DPA, similar a *C. sativus*. Durante este periodo, PS duplica su longitud, marcando su predominio a lo largo del ensayo frente a TRI01-2, que solo incrementa su valor en un 62%. De manera similar, PS también duplica su diámetro en este intervalo, mientras que TRI01-2 solo lo incrementa en un 74%. Sin embargo, aunque las diferencias en la longitud entre ambos parentales fueron llamativas, las discrepancias en el diámetro resultaron poco destacables a lo largo del ensayo. Otra diferencia clave en los momentos de desarrollo entre ambos parentales reside en el tiempo de estabilización del crecimiento. En Piel de Sapo (PS), la estabilización ocurre en 35, 30 y 25 DPA para la longitud, el diámetro y el índice de forma del fruto (FSI), respectivamente. En contraste, TRI01-2 alcanza sus valores finales en 25, 25 y 20. Estos resultados indican que PS presenta una estabilización más tardía en todas las variables asociadas a la forma del fruto en comparación con TRI01-2. La presencia del QTL podría estar relacionada con este fenómeno, participando en la regulación génica que interviene en la síntesis de hormonas involucradas en la maduración de los frutos.

En cuanto al índice de la forma del fruto (FSI), PS mostró valores más altos que TRI01-2 a lo largo del ensayo en la UPV, comenzando con valores iniciales de 2.22 y 1.82, respectivamente, y alcanzando valores en el día 40 de 1.25 y 1.05 (**Figura 18A**). Este hecho también se refleja, en la cosecha de los frutos del ensayo ubicado en La Mayora (**Tabla 2**), donde se observan diferencias significativas para los tres parámetros de estudio entre parentales, siendo altamente significativas para la longitud y FSI. Estos resultados sugieren, como se concluye en Eduardo et al. (2007), que la forma final del fruto está bastante correlacionada con la longitud del fruto, lo que implica que el crecimiento longitudinal es el principal factor determinante de la forma.

Además, se puede concluir que las diferencias entre parentales, y por lo tanto la forma final del fruto debe fijarse en etapas anteriores a la antesis, como se expone en el estudio de Périn et al., (2002), debido a que desde antesis (0 DPA), ambos parentales presentan diferencias entre sus valores de FSI. Martínez-Martínez et al. (2022), observaron que las diferencias en la forma de fruto, debidas al gen *CmOFP13*, entre la variedad PS y la línea casi isogénica CALC8-1 se establecen durante pre-antesis, en el inicio del primordio del óvulo, momento en el que comienzan a formarse las estructuras que originarán los óvulos dentro del ovario. Por su parte, en el estudio de Boualem et al. (2022), se observa

que el gen *CmACS7*, responsable de la producción de etileno, juega un papel clave en la determinación de la forma del fruto, actuando después de la determinación sexual y antes de la antesis. Este gen se expresa en la etapa 8 del desarrollo floral, y su ARNm se acumula en las células centrales del ovario. La expresión de *CmACS7* favorece la elongación celular en el carpelo, al mismo tiempo que inhibe los genes que promueven la división celular, lo que da lugar a frutos alargados. Esta función se ha confirmado en mutantes como *rf1*, donde la supresión de *CmACS7* provoca frutos más redondos.

Para determinar con mayor precisión el momento concreto cuando se determina la forma en la línea TRI01-2 se deberían realizar futuros estudios del desarrollo del ovario en pre-antesis. Asimismo, se propone analizar la expresión génica en los puntos clave del desarrollo para identificar los genes involucrados en la determinación de la forma final del fruto.

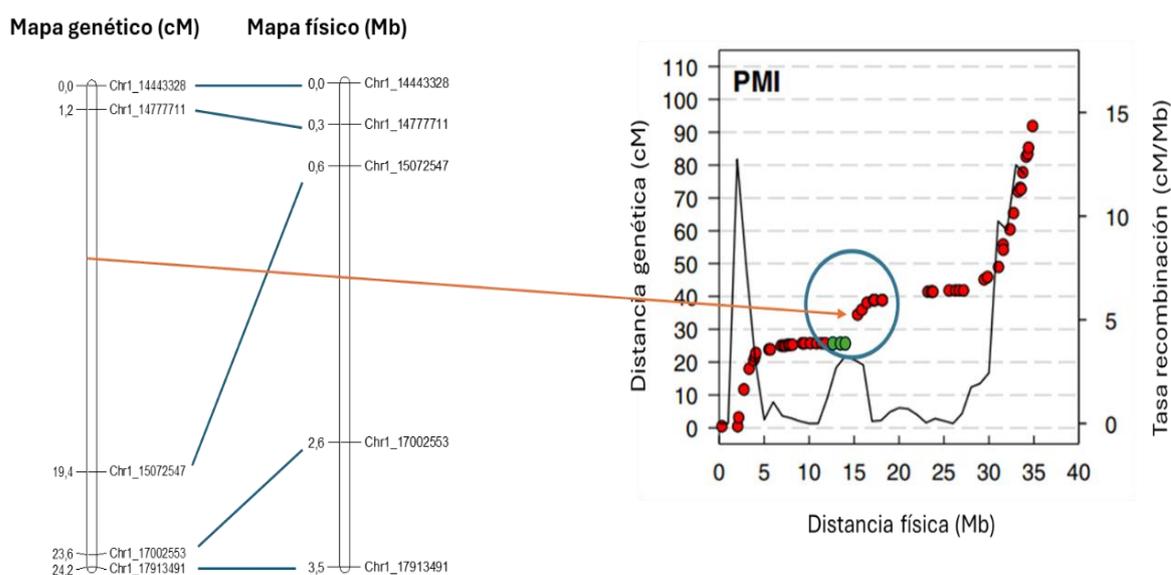
## 4.2 Mapeo fino

Se construyó un mapa genético con 5 SNPs distribuidos en el extremo derecho de la introgresión, región donde se encontró una mayor presencia de recombinación. El mapa presentó una longitud de 24.2 cM (**Figura 23**), y entre intervalos se encontraron variaciones entre la distancia genética y física.

En la **Tabla 5** se observa que los intervalos Chr1\_3336808-Chr1\_14777711, y Chr1\_15072547 -Chr1\_17913491, presentan una baja frecuencia de plantas recombinantes. Sin embargo, en la región comprendida entre ambas, es decir, en el intervalo Chr1\_14777711-Chr1\_15072547, se detectó una elevada distancia genética (**Tabla 6**), lo que sugiere la presencia de un posible hotspot de recombinación. En este intervalo se registró una distancia genética de 18.20 cM, la más alta de todos los intervalos, asociada con un bajo ratio kb/cM. En contraste, en los demás intervalos, las distancias genéticas fueron considerablemente más bajas. Por ejemplo, en el intervalo chr1\_17002553-chr1\_17913491, se encontró una distancia de apenas 0.6 cM, a pesar de que los marcadores están separados por 910,938 pb, lo que refleja un bajo porcentaje de recombinación en esa región y está relacionado con un alto ratio kb/cM. Para estudiar si la frecuencia de recombinación se mantiene constante entre intervalos, analizamos el ratio Kb/cM. La distancia genética en principio debe estar asociada a la distancia física, ya que, a mayor distancia física, mayor probabilidad de que se produzcan eventos de recombinación. Sin embargo, en la **Tabla 6** se observa que la relación Kb/cM varía a lo largo de los intervalos, lo que indica que la generación de los quiasmas que intercambian el material genético entre cromátidas no es homogénea en esta región. La variación de frecuencia de recombinación a lo largo del genoma está bien documentada en otras especies (Stapley et al., 2017), alguno de los fenómenos descritos pudiera provocar estos cambios.

La presencia de un hotspot de recombinación entre los marcadores Chr1\_14777711 y Chr1\_15072547 se confirma en el estudio de Argyris et al. (2015), donde se reporta recombinación en la región comprendida entre las posiciones 15 y 17 Mb en el cromosoma 1 de *C.melo* (**Figura 25**). En contraste, las regiones adyacentes presentan ausencia de recombinación, tal como ocurre en los intervalos Chr1\_3336808-Chr1\_14777711 y Chr1\_15072547-Chr1\_17913491 de este estudio. Estas zonas de baja recombinación coinciden con ubicaciones propuestas para los centrómeros y con

regiones heterocromáticas asociadas al rDNA 45S y 5S, las cuales están relacionadas con la supresión de la recombinación. Estas observaciones podrían explicar las diferencias observadas entre las distancias genética y física en los distintos intervalos analizados. Asimismo, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten completar la **Figura 25**, mediante una aproximación de la relación entre la distancia genética y la distancia física en el intervalo de 12 a 13 Mb. De esta manera, se destacan en verde las posiciones 11,948,434, 12,899,448 y 13,501,585 pb, donde se observa una frecuencia de recombinación escasa o nula.



**Figura 25.** Relación entre las distancias y físicas genéticas de los 5 SNPs empleados en el estudio de La Mayora con el trabajo de Argyris et al. (2015). En la gráfica de la derecha se muestra la relación entre las distancias genéticas (eje y izquierda), físicas (eje x) y la frecuencia de recombinación (eje y derecha) en la pseudomolécula PMI de melón. Para cada marcador SNP (círculo rojo relleno) en el mapa genético se trazó la distancia genética en centimorgans (cM) según su posición física en megabases (Mb) en la pseudomolécula (PM). Adicionalmente, se muestra la tasa de recombinación mediante una línea continua. Un intervalo físico coincidente entre ambos estudios se destaca mediante un círculo, mientras que la flecha naranja señala una región específica caracterizada por una alta distancia genética y una elevada tasa de recombinación. Por otro lado, los círculos verdes rellenos destacan una aproximación a las distancias genéticas de los marcadores Chr1\_11948434, Chr1\_12899448 y Chr1\_13501585, ubicados en las posiciones físicas 11,948,434; 12,899,448; y 13,501,585 pb en este estudio, donde se registra una frecuencia de recombinación baja o nula.

Por otro lado, la asociación de los marcadores con la forma del fruto mostró diferencias significativas entre las medias por alelo en La Mayora (**Tabla 8**), mientras que en la UPV no se observaron diferencias significativas (**Tabla 7**). Estas discrepancias entre localizaciones podrían estar relacionadas con el tamaño muestral, ya que en La Mayora se analizaron el doble de plantas  $F_2$  que en la Universidad Politécnica de Valencia. En ambas localizaciones, el marcador asociado a las medias más bajas para el alelo TRI fue

Chr1\_14777713; además, en La Mayora también destacó el marcador Chr1\_14443328. Al analizar el F ratio (**Figura 24**), los mismos marcadores presentaron los valores más altos, reforzando los resultados del análisis previo. Adicionalmente, el análisis del QTLs reveló la presencia de un QTL asociado al FSI alrededor del marcador Chr1\_14443328, con un valor de LOD score de 9,74. Este resultado se complementa con un LOD score de 5,87 para la longitud del fruto, lo cual es consistente, ya que ambos parámetros están relacionados, como se ha demostrado en el estudio.

Para futuros estudios, se sugiere aumentar la densidad de marcadores a ambos lados de la posición 14,443,328 pb, dado que su marcador asociado presentó el LOD score más alto. Esto permitiría una localización más precisa del QTL. Sin embargo, si el QTL se encontrase en una región con ausencia de recombinación, su identificación podría ser inviable. Por el contrario, si se ubicara dentro de la región hotspot de recombinación, sería posible delimitarlo con mayor precisión.

### **4.3 Asociación del número de carpelos con la forma final del fruto**

En el estudio de Périn et al. (2002), los frutos con cinco carpelos presentaron una forma casi esférica, a diferencia de los frutos con tres carpelos que presentaron una forma más alargada. En nuestro experimento se observa que el efecto del número de carpelos (3 o 4) mostró diferencias significativas tanto en la longitud del fruto como en su diámetro (**Figura 22**), este efecto sin embargo no produjo diferencias significativas en la forma final del fruto entre parentales. Con nuestro estudio no podemos asociar que con 4 carpelos los frutos sean más redondos que con 3 carpelos. Sin embargo, sí se puede concluir que los frutos con 4 carpelos presentan una longitud y diámetro significativamente mayor que los frutos que presentan 3 carpelos, y por ende más grandes que estos. Estos resultados sugieren que, para generarse esas diferencias significativas en la forma, al menos el fruto debe presentar 5 carpelos en comparación con 3.

## 5. Conclusiones

Los principales resultados obtenidos en esta tesis de máster nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- 1) El efecto del QTL en la forma final del fruto ha sido verificado en la IL TRI01-2. Esta línea presentó en la cosecha un FSI significativamente menor que PS, produciendo frutos más redondos que esta variedad.
- 2) Las diferencias en la forma final del fruto entre los parentales ocurren en distintos momentos según cada variable: para la longitud, en 8 DPA; para el diámetro, en 14 DPA; y para el FSI, desde antesis (0 DPA).
- 3) La forma del fruto se establece en la etapa de pre-antesis del desarrollo del ovario.
- 4) La relación lineal, positiva y significativa entre la longitud y FSI, pone de manifiesto que la longitud, es el principal parámetro que define la forma final del fruto.
- 5) Los frutos con 4 carpelos presentan una mayor longitud y diámetro que los de 3 carpelos, y por ende un mayor tamaño que estos. No obstante, la diferencia en el número de carpelos en este caso no influye en la forma del fruto.
- 6) La variación en el ratio Kb/cM a lo largo de los intervalos se atribuye a la presencia de un hotspot de recombinación en el intervalo Chr1\_14777711-Chr1\_15072547, el cual está rodeado por intervalos de supresión de recombinación asociados a posibles regiones centrómero.
- 7) El análisis del QTL indicó la presencia de un QTL asociado al FSI alrededor de la posición 14,443,328 pb. Aunque no se ha determinado la posición exacta, la región inicial ha sido reducida, situando el QTL en el extremo superior de la región de introgresión.

## 6. Bibliografía

- Argyris, J. M., Ruiz-Herrera, A., Madriz-Masis, P., Sanseverino, W., Morata, J., Pujol, M., Ramos-Onsins, S. E., & Garcia-Mas, J. (2015). Use of targeted SNP selection for an improved anchoring of the melon (*Cucumis melo* L.) scaffold genome assembly. *BMC Genomics*, *16*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12864-014-1196-3/FIGURES/3>
- Boualem, A., Berthet, S., Devani, R. S., Camps, C., Fleurier, S., Morin, H., Troadec, C., Giovino, N., Sari, N., Dogimont, C., & Bendahmane, A. (2022). Ethylene plays a dual role in sex determination and fruit shape in cucurbits. *Current Biology*, *32*(11), 2390-2401.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.031>
- Boualem, A., Fergany, M., Fernandez, R., Troadec, C., Martin, A., Morin, H., Sari, M. A., Collin, F., Flowers, J. M., Pitrat, M., Purugganan, M. D., Dogimont, C., & Bendahmane, A. (2008). A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science*, *321*(5890), 836–838. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1159023/SUPPL\\_FILE/BOUALEM-SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1159023/SUPPL_FILE/BOUALEM-SOM.PDF)
- Campos, M., Gonzalo, M. J., Díaz, A., Picó, B., Gómez-Guillamón, M. L., Monforte, A. J., & Esteras, C. (2023). A Novel Introgression Line Library Derived from a Wild Melon Gives Insights into the Genetics of Melon Domestication, Uncovering New Genetic Variability Useful for Breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(12), 10099. <https://doi.org/10.3390/IJMS241210099/S1>
- Castro, G., Perpiñá, G., Monforte, A. J., Picó, B., & Esteras, C. (2019). New melon introgression lines in a Piel de Sapo genetic background with desirable agronomical traits from dudaim melons. *Euphytica*, *215*(10), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S10681-019-2479-1/FIGURES/7>
- Cavalcante, A. L. A., Negreiros, A. M. P., Tavares, M. B., Barreto, É. D. S., Armengol, J., & Júnior, R. S. (2020). Characterization of Five New *Monosporascus* Species: Adaptation to Environmental Factors, Pathogenicity to Cucurbits and Sensitivity to Fungicides. *Journal of Fungi* 2020, Vol. 6, Page 169, 6(3), 169. <https://doi.org/10.3390/JOF6030169>
- Chakrabarti, M., Zhang, N., Sauvage, C., Muñoz, S., Blanca, J., Cañizares, J., Diez, M. J., Schneider, R., Mazourek, M., McClead, J., Causse, M., & Van Der Knaap, E. (2013). A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(42), 17125–17130. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1307313110/SUPPL\\_FILE/ST07.DOCX](https://doi.org/10.1073/PNAS.1307313110/SUPPL_FILE/ST07.DOCX)
- Chikh-Rouhou, H., Abdedayem, W., Solmaz, I., Sari, N., & Garcés-Claver, A. (2023). Melon (*Cucumis melo* L.): Genomics and Breeding. *Smart Plant Breeding for Vegetable Crops in Post-Genomics Era*, 25–52. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-5367-5\\_2/TABLES/2](https://doi.org/10.1007/978-981-19-5367-5_2/TABLES/2)

- Choudhary, B., & Pandey, S. (2016). *13 Muskmelon Genetics, Breeding, and Cultural Practices*. [https://www.researchgate.net/profile/B-Choudhary/publication/296835410\\_Muskmelon\\_genetics\\_Breeding\\_and\\_Cultural\\_Practices/links/5fc9f6f392851c00f84ce40d/Muskmelon-genetics-Breeding-and-Cultural-Practices.pdf](https://www.researchgate.net/profile/B-Choudhary/publication/296835410_Muskmelon_genetics_Breeding_and_Cultural_Practices/links/5fc9f6f392851c00f84ce40d/Muskmelon-genetics-Breeding-and-Cultural-Practices.pdf)
- Darvasi, A., & Soller, M. (1992). Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theoretical and Applied Genetics*, *85*(2–3), 353–359. <https://doi.org/10.1007/BF00222881/METRICS>
- Diaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J. E., Zalapa, J. E., Cuevas, H. E., Dace, G., Oliver, M., Boissot, N., Dogimont, C., Pitrat, M., Hofstede, R., van Koert, P., Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., ... Monforte, A. J. (2011). A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-111>
- Díaz, A., Zarouri, B., Fergany, M., Eduardo, I., Álvarez, J. M., Picó, B., & Monforte, A. J. (2014). Mapping and Introgression of QTL Involved in Fruit Shape Transgressive Segregation into ‘Piel de Sapo’ Melon (*Cucumis melo* L.). *PLOS ONE*, *9*(8), e104188. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104188>
- Dogimont, C. (2011). 2011 Gene list for melon. *Report - Cucurbit Genetics Cooperative*, 104–133. <https://hal.inrae.fr/hal-02643629>
- Doyle, J. (1991). DNA Protocols for Plants. *Molecular Techniques in Taxonomy*, 283–293. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18)
- Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A. J., Obando, J., Fernández-Trujillo, J. P., Martínez, J. A., Alarcón, A. L., Álvarez, J. M., Van Der Knaap, E., Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A. J., Obando, J., Fernández-Trujillo, J. P., Martínez, J. A., Alarcón, A. L., Álvarez, J. M., & Van Der Knaap, E. (2007). Estimating the genetic architecture of fruit quality traits in melon using a genomic library of near isogenic lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *132*(1), 80–89. <https://doi.org/10.21273/JASHS.132.1.80>
- Endl, J., Achigan-Dako, E. G., Pandey, A. K., Monforte, A. J., Pico, B., & Schaefer, H. (2018). Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. *American Journal of Botany*, *105*(10), 1662–1671. <https://doi.org/10.1002/AJB2.1172>
- FAO. (2022). FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., Heñaff, E., Cañara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., Alioto, T., Capella-Gutiérrez, S., Blancae, J., Cañizares, J., Ziarsolo, P., Gonzalez-Ibeas, D., Rodríguez-Moreno, L., Droege, M., Du, L., ... Puigdomènech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(29), 11872–11877. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1205415109/SUPPL\\_FILE/SD06.XLS](https://doi.org/10.1073/PNAS.1205415109/SUPPL_FILE/SD06.XLS)
- Gonzalo, M. J., Díaz, A., Dhillon, N. P. S., Reddy, U. K., Picó, B., & Monforte, A. J. (2019). Re-evaluation of the role of Indian germplasm as center of melon diversification

- based on genotyping-by-sequencing analysis. *BMC Genomics*, 20(1).  
<https://doi.org/10.1186/S12864-019-5784-0>
- Guo, M., & Simmons, C. R. (2011). Cell number counts – The fw2.2 and CNR genes and implications for controlling plant fruit and organ size. *Plant Science*, 181(1), 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2011.03.010>
- Hasan, N., Choudhary, S., Naaz, N., Sharma, N., & Laskar, R. A. (2021). Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1).  
<https://doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1>
- Jones, B., & Sall, J. (2011). JMP statistical discovery software. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(3), 188–194. <https://doi.org/10.1002/WICS.162>
- Kesh, H., & Kaushik, P. (2021). Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. *Scientia Horticulturae*, 282, 110045. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110045>
- Kirkbride, J. (1993). *Biosystematic monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons*.  
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=-6rIPLDYg\\_4C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Biosystematic+Monograph+of+the+Genus+Cucumis&ots=nJZcGr8PK0&sig=TKaVFcjuBx0SKU10KYJQR6pPcHk](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=-6rIPLDYg_4C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Biosystematic+Monograph+of+the+Genus+Cucumis&ots=nJZcGr8PK0&sig=TKaVFcjuBx0SKU10KYJQR6pPcHk)
- Martínez-Martínez, C., Gonzalo, M. J., Sipowicz, P., Campos, M., Martínez-Fernández, I., Leida, C., Zouine, M., Alexiou, K. G., Garcia-Mas, J., Gómez, M. D., Tornero, P., Pérez-Amador, M. Á., Esteras, C., Picó, B., Romero, C., & Monforte, A. J. (2022). A cryptic variation in a member of the Ovate Family Proteins is underlying the melon fruit shape QTL fsqs8.1. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(3), 785–801.  
<https://doi.org/10.1007/S00122-021-03998-6/FIGURES/6>
- Martos-Fuentes, M., Lizarzaburu, J. A., Aguayo, E., Martinez, C., & Jamilena, M. (2017). Pleiotropic effects of CmACS7 on fruit growth and quality parameters in melon (*Cucumis melo*). *Acta Horticulturae*, 1151, 115–120.  
<https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2017.1151.19>
- Meng, L., Li, H., Zhang, L., & Wang, J. (2015). QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The Crop Journal*, 3(3), 269–283.  
<https://doi.org/10.1016/J.CJ.2015.01.001>
- Monforte, A. J., Diaz, A., Caño-Delgado, A., & Van Der Knaap, E. (2014). The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: lessons from tomato and melon. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4625–4637. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERU017>
- Muños, S., Ranc, N., Botton, E., Bérard, A., Rolland, S., Duffé, P., Carretero, Y., Paslier, M., C. Le, Delalande, C., Bouzayen, M., Brunel, D., & Causse, M. (2011). Increase in Tomato Locule Number Is Controlled by Two Single-Nucleotide Polymorphisms Located Near WUSCHEL. *Plant Physiology*, 156(4), 2244–2254.  
<https://doi.org/10.1104/PP.111.173997>
- Nelson, J. C. (1997). QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding*, 3(3), 239–245. <https://doi.org/10.1023/A:1009604312050>

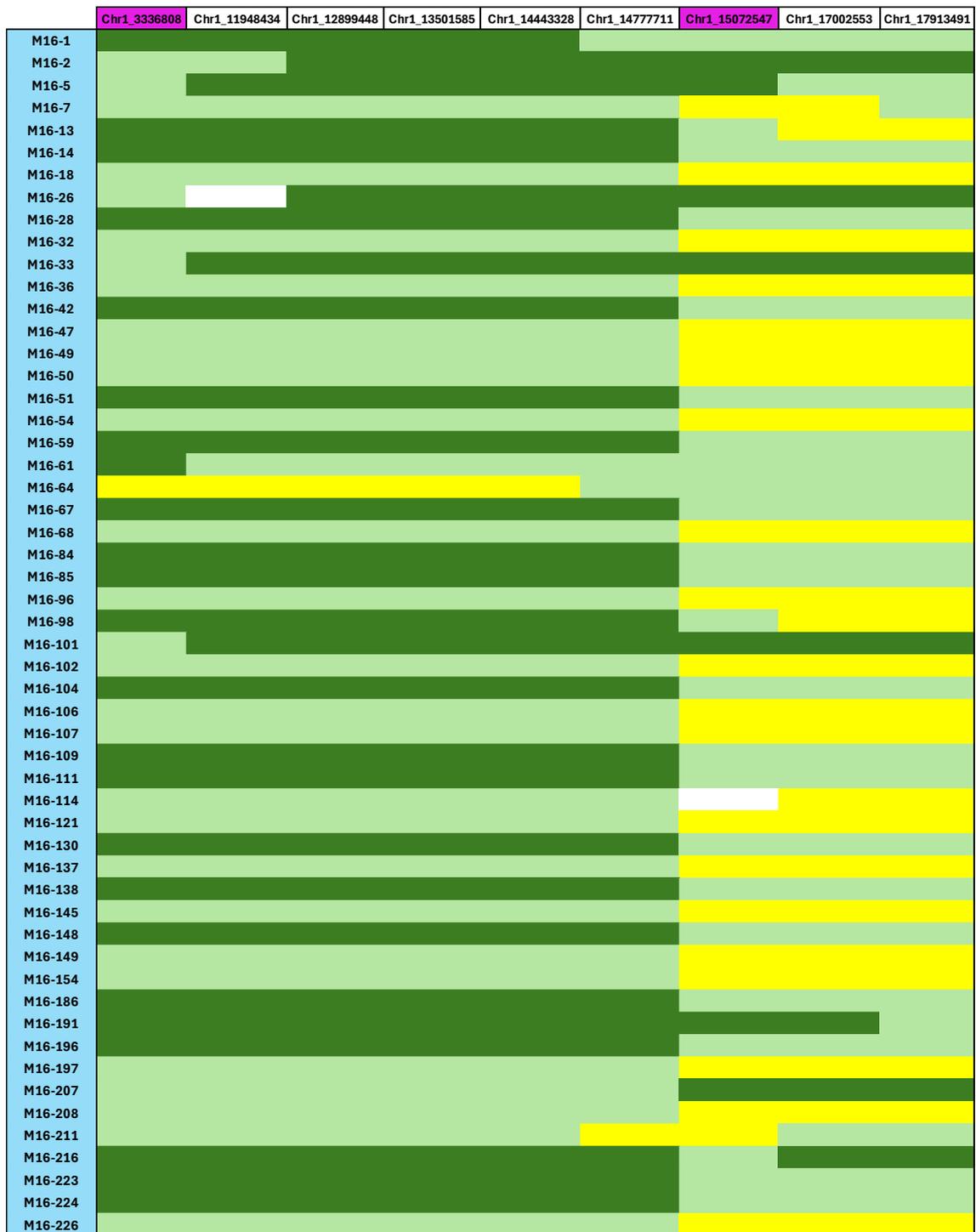
- Parthasarathy, V., Cooperative, C. S.-C. G., & 1980, undefined. (1980). Taxonomy of *Cucumis callosus* (Rottl.) Cogn.-the wild melon of India. *Ars.Usda.GovVA Parthasarathy, CN SambandamCucurbit Genetics Cooperative, 1980•ars.Usda.Gov*. [https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/60800500/CGC/CGC%203%20\(1980\).pdf#page=61](https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/60800500/CGC/CGC%203%20(1980).pdf#page=61)
- Périn, C., Hagen, L. S., Giovinazzo, N., Besombes, D., Dogimont, C., & Pitrat, M. (2002). Genetic control of fruit shape acts prior to anthesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 266(6), 933–941. <https://doi.org/10.1007/S00438-001-0612-Y/METRICS>
- Phan, N. T., & Sim, S. C. (2017). Genomic Tools and Their Implications for Vegetable Breeding. *Horticultural Science and Technology 2017 35:2*, 35(2), 149–164. <https://doi.org/10.12972/KJHST.20170018>
- Pitrat, M. (2016). *Melon Genetic Resources: Phenotypic Diversity and Horticultural Taxonomy*. 25–60. [https://doi.org/10.1007/7397\\_2016\\_10](https://doi.org/10.1007/7397_2016_10)
- Rodríguez, G. R., Muños, S., Anderson, C., Sim, S. C., Michel, A., Causse, M., McSpadden Gardener, B. B., Francis, D., & van der Knaap, E. (2011). Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the Tomato Germplasm and the Relationship to Fruit Shape Diversity. *Plant Physiology*, 156(1), 275–285. <https://doi.org/10.1104/PP.110.167577>
- Rolnik, A., & Olas, B. (2020). Vegetables from the Cucurbitaceae family and their products: Positive effect on human health. *Nutrition*, 78, 110788. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2020.110788>
- Ruggieri, V., Alexiou, K. G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., Nonaka, S., Ezura, H., Latrasse, D., Boualem, A., Benhamed, M., Bendahmane, A., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., Puigdomènech, P., Casacuberta, J. M., & Garcia-Mas, J. (2018). An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26416-2>
- Santo Domingo, M., Mayobre, C., Pereira, L., Argyris, J., Valverde, L., Martín-Hernández, A. M., Garcia-Mas, J., & Pujol, M. (2022). Fruit Morphology and Ripening-Related QTLs in a Newly Developed Introgression Line Collection of the Elite Varieties ‘Védrantais’ and ‘Piel de Sapo.’ *Plants*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11223120>
- Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14269–14273. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1005338107/SUPPL\\_FILE/ST01.DOC](https://doi.org/10.1073/PNAS.1005338107/SUPPL_FILE/ST01.DOC)
- Shavrukov, Y. (Ed.). (2023). *Plant Genotyping*. 2638. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2>
- Sierra-Orozco, E., Shekasteband, R., Illa-Berenguer, E., Snouffer, A., van der Knaap, E., Lee, T. G., & Hutton, S. F. (2021). Identification and characterization of GLOBE, a major gene controlling fruit shape and impacting fruit size and marketability in

- tomato. *Horticulture Research*, 8(1). [https://doi.org/10.1038/S41438-021-00574-3/42044829/41438\\_2021\\_ARTICLE\\_574.PDF](https://doi.org/10.1038/S41438-021-00574-3/42044829/41438_2021_ARTICLE_574.PDF)
- Stapley, J., Feulner, P. G. D., Johnston, S. E., Santure, A. W., & Smadja, C. M. (2017). Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: patterns and processes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1736). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2016.0455>
- Vargas, N. A., & Hurtado, T. A. (2015). *Excel aplicado al manejo de datos*. <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/11933>
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1), 77–78. <https://doi.org/10.1093/JHERED/93.1.77>
- Wang, L., Wang, Y., Luan, F., Zhang, X., Zhao, J., Yang, Z., & Liu, S. (2022). Biparental genetic mapping reveals that CmCLAVATA3 (CmCLV3) is responsible for the variation in carpel number in melon (*Cucumis melo* L.). *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 135(6), 1909–1921. <https://doi.org/10.1007/S00122-022-04083-2>
- Wu, S., Zhang, B., Keyhaninejad, N., Rodríguez, G. R., Kim, H. J., Chakrabarti, M., Illa-Berenguer, E., Taitano, N. K., Gonzalo, M. J., Díaz, A., Pan, Y., Leisner, C. P., Halterman, D., Buell, C. R., Weng, Y., Jansky, S. H., van Eck, H., Willemsen, J., Monforte, A. J., ... van der Knaap, E. (2018). A common genetic mechanism underlies morphological diversity in fruits and other plant organs. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-07216-8>
- Zeven, A., & Wet, J. De. (1982). *Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity: excluding most ornamentals, forest trees and lower plants*. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/350203>
- Zhang, B., Li, Q., Keyhaninejad, N., Taitano, N., Sapkota, M., Snouffer, A., & van der Knaap, E. (2023). A combinatorial TRM-OFP module bilaterally fine-tunes tomato fruit shape. *New Phytologist*, 238(6), 2393–2409. <https://doi.org/10.1111/NPH.18855>
- Zhang, X., Wu, J., Yu, Q., Liu, R., Wang, Z. Y., & Sun, Y. (2020). AtOFPs regulate cell elongation by modulating microtubule orientation via direct interaction with TONNEAU2. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, 292. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2020.110405>
- Zhao, J., Song, W., & Zhang, X. (2024). Genetic and molecular regulation of fruit development in cucumber. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/NPH.20192>

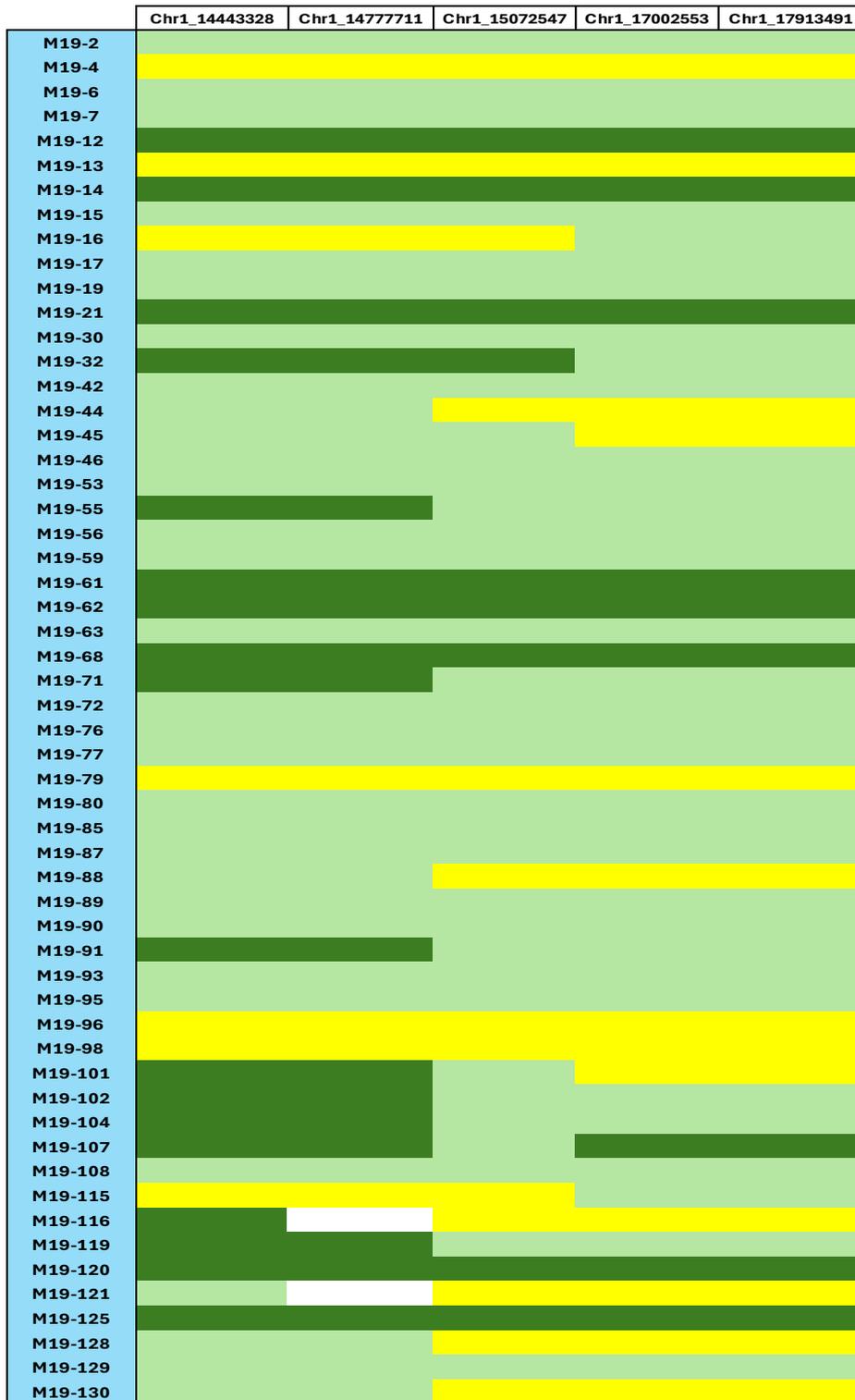
# ANEXO

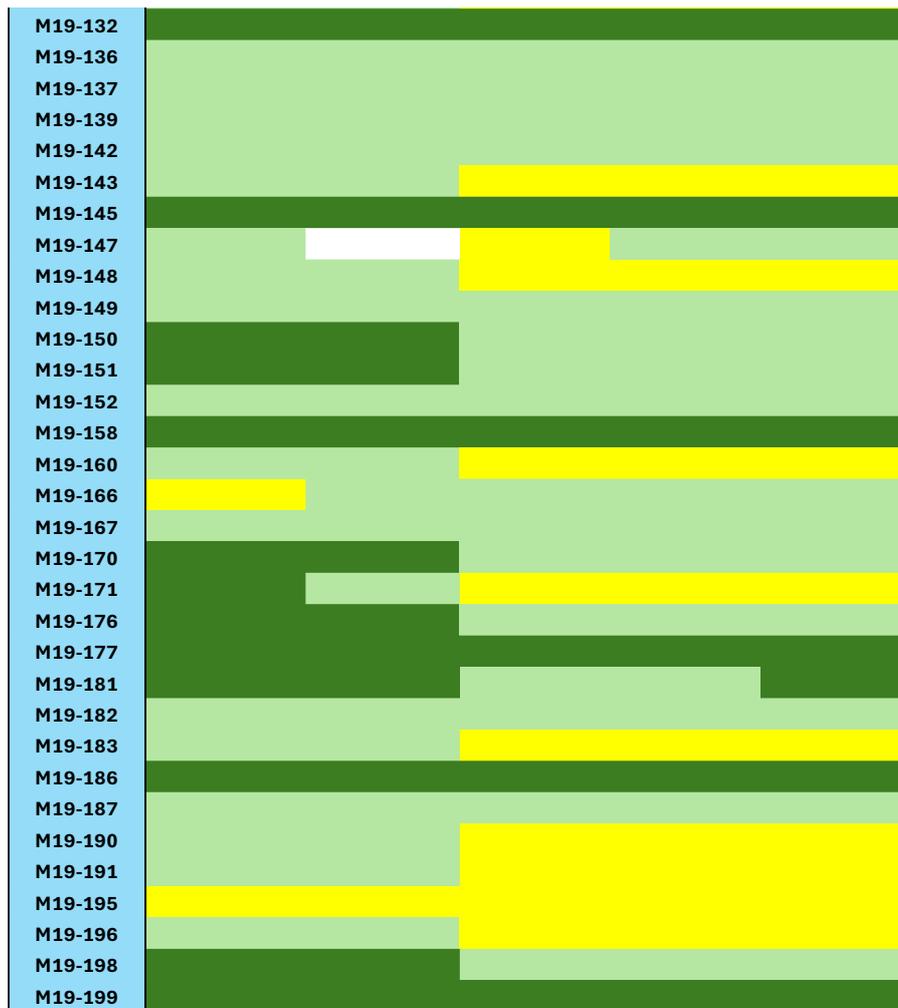
Nombre de la secuencia	Secuencia
Chr1_3336808 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAACGTAACCCOCCATTTCT
Chr1_3336808 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTCCAACGTAACCCOCCATTTCA
Chr1_3336808 R	TTTGGCATCCAGTAGGTGAAATCAAAGAA
Chr1_4290073 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCTACATCATAACCGTGGTTTGTGTA
Chr1_4290073 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCTACATCATAACCGTGGTTTGTGTC
Chr1_4290073 R	CTGCTAGGTCAACAAGTCAGTCGTA
Chr1_5468514 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAAGTAAAGTAAACGATATAAATCACCTG
Chr1_5468514 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGAAGTAAAGTAAACGATATAAATCACCTA
Chr1_5468514 R	CCITTAACGATCATTACATGACTCATCATT
Chr1_6447595 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAGACATTTGGGAGTGAAGTTTATGG
Chr1_6447595 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATTAGACATTTGGGAGTGAAGTTTATGT
Chr1_6447595 R	CACCGATCTATAGAAATCCACAGTGATAT
Chr1_7416098 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGAGTAAACATGATCCTTAGTCTTTTAT
Chr1_7416098 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAGTAAACATGATCCTTAGTCTTTTAT
Chr1_7416098 R	CAAACTGATGAAAAAATCAGAGAAGCAT
Chr1_8167731 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATGACATGGTTTCTGACCTATTGG
Chr1_8167731 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGATGACATGGTTTCTGACCTATTGA
Chr1_8167731 R	TGTAAGTCACTGCTGGAGGAAGTA
Chr1_9087202 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATTGTCACTTCTTATCCTAAATCC
Chr1_9087202 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCATTGTCACTTCTTATCCTAAATCCA
Chr1_9087202 R	CGACTGATTTGACCTTGTCTGCTCAA
Chr1_10180510 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCATGATGGAACGGAGACATCA
Chr1_10180510 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCATGATGGAACGGAGACATCG
Chr1_10180510 R	GTCCGGGAAGATTAACCAATCCCAT
Chr1_10856249 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTGGAGTGGCCGGAGC
Chr1_10856249 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTGGAGTGGCCGGAGC
Chr1_10856249 R	GAATGGACTAGAATAATTGTGGTGATA
Chr1_11948434 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGTGTGAACCAAGCCGACGAT
Chr1_11948434 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGATGTAACCAAGCCGACGAC
Chr1_11948434 R	AACCTGTGGCCAAAGCTCGACCAA
Chr1_12899448 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTAAGAAATCAAAGAAATCAAACCTAACA
Chr1_12899448 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAAGAAATCAAAGAAATCAAACCTAACA
Chr1_12899448 R	GATGGCTGATTTCCAAAGCCTCTT
Chr1_13501585 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTAATATTGCTGTGACAGATCACAAGA
Chr1_13501585 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAATATTGCTGTGACAGATCACAAGG
Chr1_13501585 R	GCCTACAAATTTTCAAGCTCTCAAGTTCIT
Chr1_14443328 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAATCCAGTTTCCAGCATCCTCC
Chr1_14443328 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATCAATCCAGTTTCCAGCATCCTCT
Chr1_14443328 R	GGGGGCCAAACTGTGAACCTCT
Chr1_14603738 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTGTAACCTGATATTAACCTAAGTGTCA
Chr1_14603738 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTAACCTGATATTAACCTAAGTGTG
Chr1_14603738 R	CACGCTATGCAGCCAAACCGAA
Chr1_14777711 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGCTTAGTCAATGTTTATCTATCAGATGA
Chr1_14777711 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCTTAGTCAATGTTTATCTATCAGATGG
Chr1_14777711 R	CTATGGCTATCATGCTGGATAAATGATTT
Chr1_14956485 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCAGAGGAGACACGGTTCTA
Chr1_14956485 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCAGAGGAGACACGGTTCTG
Chr1_14956485 R	TTTCTACAATCAAGGCAGTAACATCAATTT
Chr1_15072547 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAATGGCATTACTTCAGGATACGAC
Chr1_15072547 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGAATGGCATTACTTCAGGATACGAT
Chr1_15072547 R	GAAGAACATATTCTGCCAAACCCATTT
Chr1_16000882 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTTTATTATACCATCAATTTGTTGAGGC
Chr1_16000882 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAATTTTATTATACCATCAATTTGTTGAGGT
Chr1_16000882 R	GCCCAACATATCAGTTGACGGTACAT
Chr1_17002553 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATGGGTGGAAGCATTATAGCCTT
Chr1_17002553 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGGGTGGAAGCATTATAGCCTC
Chr1_17002553 R	GCTCGGTGTTTGTACGTATCCTT
Chr1_17913491 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGGACATCGAGTGGATGAACAA
Chr1_17913491 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCGACATCGAGTGGATGAACAC
Chr1_17913491 R	CAGGCTGCATAGAGTGCATTCTCAA

**Anexo 1.** Cebadores PACE diseñados, utilizados en la genotipificación durante diferentes etapas del ensayo en Valencia y La Mayora. En amarillo, marcadores no polimórficos entre parentales (Chr1\_14603738, Chr1\_14956485 y Chr1\_16000882).



**Anexo 2.** Genotipo de las plantas recombinantes F<sub>2</sub> cultivadas en la Universidad Politécnica de Valencia. Los colores indican: morado para los marcadores flanqueantes a la región de introgresión compartida entre TRI01-2 y TRI01-1 hasta el inicio de la región común entre TRI01-2 y TRI01-3, verde oscuro para el genotipo homocigoto PS, amarillo para el genotipo homocigoto TRI01-2, verde claro para la presencia de ambos alelos y blanco para los genotipos no determinados.





**Anexo 3.** Genotipo de las plantas  $F_2$  cultivadas en La Mayora. Los colores indican: verde oscuro para el genotipo homocigoto PS, amarillo para el genotipo homocigoto TRI01-2, verde claro para la presencia de ambos alelos y blanco para los genotipos no determinados.

Physical position	TRI01-1	TRI01-2	TRI01-3	
				14,443,328
				14,777,711
				15,072,547
				15,114,395
				15,232,805
				15,330,312
				16,052,859
				16,162,407
				17,002,553
				17,913,491
				18,113,656
				18,708,299
				19,800,067
				19,896,981
				19,986,608
				20,403,102
				20,588,000
				20,763,625
				20,873,127
				21,070,991
				21,298,781
				22,045,134
				22,270,682
				22,348,605
				22,550,496
				22,762,123
				23,155,991
				23,859,677
				24,049,326
				24,437,461
				24,570,723
				24,870,307
				25,043,992
				25,144,824
				25,386,353
				25,501,986
				25,641,191
				25,742,355
				25,882,652
				26,253,700
				26,973,027
				27,114,009
				27,458,609
				27,637,446
				27,828,736
				28,089,194
				28,383,667
				28,538,460
				29,056,717
				29,461,072

**Anexo 4.** Región de introgresión de TRI01-2 en común con TRI01-1 (izquierda) y TRI01-3 (derecha). Los colores indican: En morado para los marcadores flanqueantes entre la región de introgresión compartida entre TRI01-2 y TRI01-1 hasta el inicio de la región común entre TRI01-2 y TRI01-3, azul para los marcadores seleccionados para saturar la región, verde oscuro para el alelo homocigoto PS, y amarillo para el alelo homocigoto TRI01-2.