



MÁSTER UNIVERSITARIO OFICIAL EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL



Universidad Politécnica de Valencia

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV)

Universidad Politécnica de Madrid

Universidad Politécnica de Cataluña

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Cucumis melo var flexuosus* (L. Naudin) PROCEDENTES DE TURQUÍA



Mercè Paradís Mayals

Directora: Belén Picó Sirvent

Noviembre 2009



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

Dr./Dra. Belén Picó Sirvent, profesor/a del Máster Oficial Interuniversitario en Mejora Genética Vegetal en calidad de tutor/director de Trabajo Fin de Máster por la presente,

RECONOCE:

Que el Trabajo Fin de Máster realizado por la alumna: Mercè Paradís Mayals, con el título ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENETICA DE CUCUMIS MELO VAR FLEXUOSUS PROCEDENTES DE TURQUÍA y dirigido por Belén Picó Sirvent, reúne las condiciones necesarias para completar la formación del alumno y por tanto

AUTORIZA:

La presentación del citado Trabajo Final de Máster para su defensa ante el correspondiente Tribunal.

Y para que conste a los efectos oportunos así lo firma,

Dr./Dra. _____

Máster Oficial Interuniversitario
en Mejora Genética Vegetal

Valencia, a 30 de Noviembre de 2009



FORMULARIO DEPÓSITO TESIS MÁSTER

AUTOR	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE
	Paradis	Mayals	Mercè	20461626K
DIRECTOR TESIS				
	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE	
	Picó	Sirvent	Belén	
UNIVERSIDAD		MÁSTER		
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA		Máster en mejora genética vegetal		
TÍTULO DE LA TESIS				
ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENETICA DE CUCUMIS MELO VAR FLEXUOSUS PROCEDENTES DE TURQUÍA				



<p>RESUMEN</p>	<p>El melón es una hortaliza de importancia mundial, siendo Asia el continente de mayor producción. Dentro de Asia, Turquía es el mayor país con mayor producción.</p> <p>Pertenece a la familia <i>Cucurbitaceae</i>, género <i>Cucumis</i>, subgénero <i>Melo</i>. Tiene un número cromosómico básico de $x=12$. Presenta elevada variabilidad de color, forma, color de la pulpa y tamaño. Pitra <i>et al.</i>, (2002) realizaron una clasificación intraespecífica, de <i>Cucumis melo L.</i> en 15 variedades: <i>conomon</i>, <i>makuwa</i>, <i>chinensis</i>, <i>momordica</i>, <i>acidulus</i>, <i>dudaim</i>, <i>cantalupensis</i>, <i>reticulatus</i>, <i>adana chito</i>, <i>chandalak</i>, <i>ameri</i>, <i>inodorus</i>, <i>flexuosus</i> y <i>chate</i>.</p> <p>Harlan (1951) describió Turquía como un microcentro de diversidad de Cucurbitáceas. Se considera que Turquía es uno de los países con mayor diversidad en el cultivo de <i>Cucumis melo var flexuosus</i>, una de las variedades botánicas admitidas por casi todos los estudios. Los recursos genéticos de melón de tipo <i>flexuosus</i> pertenecientes al National Gene Bank se recogieron en la región del Sudeste de Anatolia en 1992 y el material fue evaluado según los caracteres de la planta y del fruto (Besirli y Yanmaz 1999). Actualmente hay un proyecto en curso para comparar la diversidad morfológica y molecular del snakemelon.</p> <p>Debido a la disponibilidad de material procedente de la universidad de Çukurova, se decidió realizar un ensayo con el objetivo de caracterizar molecularmente las entradas previamente clasificadas como <i>flexuosus</i> y estudiar la variabilidad existente dentro de este grupo.</p> <p>Se emplearon entradas <i>flexuosus</i> de la universidad de Çukurova y otras con otros orígenes. Se emplearon también entradas de otros grupos de melón para estudiar la distribución del grupo <i>flexuosus</i> respecto a los otros grupos de melón.</p> <p>Se emplearon marcadores moleculares AFLP, que fueron bastante informativos a pesar de su dominancia. Con los datos obtenidos se pudo concluir que la variación en las entradas de <i>flexuosus</i> de Turquía es elevada y superior a la de los países representados como controles. Algunas de las entradas previamente clasificadas como <i>flexuosus</i> han resultado pertenecer a otros grupos.</p>
----------------	--



The melon is a vegetable of worldwide importance and Asia was the place where most of it was produced. Turkey is the country in Asia with the highest melon production.

The melon belongs to the *Cucurbitaceae* family and within it, to the *Cucumis* species. The melon has a Basic $x=12$ chromosome number. It has a high variability in colour, shape, pulp colour and size. Pitrat *et al.*, (2002) carried out an intraspecific classification of *Cucumis melo* L. in 15 varieties: *conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *momordica*, *acidulus*, *dudaim*, *cantalupensis*, *reticulatus*, *adana chito*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus* y *chate*.

Harlan (1951) described Turkey as a microcenter of variety in Cucurbitáceas. Turkey is considered to be one of the countries with the highest number of varieties in the cultivation of *Cucumis melo var flexuosus*, one of the botanical varieties admitted by almost all the studies is the *flexuosus* variety and. The genetic resources belonging to the *flexuosus* type from the National Gene Bank were collected in the region in South-east Anatolia in 1992 and the material was assessed according to the plant and fruit characteristics (Besirli y Yanmaz 1999). At present there is a project which is comparing the morphological and molecular variety of the Turkish and world snakemelon.

Because of the availability of material from Çukurova University, it was decided to make a test aimed at characterizing molecularly the entries previously classified as *flexuosus* and to study the variability in this group.

In order to do this Çukurova University entries were used as well as other entries of *flexuosus* with different origins. Entries of other types of melons were also used in order to study the distribution of the *flexuosus* group in contrast to the other types of melon groups.

Molecular AFLP markers were used. They were quite informative in spite of their dominance. With the data obtained one could conclude that there is little variability within the *flexuosus* group from Turkey. However, regarding the total number of *flexuosus* studied entries it has been noticed that there is some variety. Some of the entries previously classified as *flexuosus* have turned out to belong to other groups.



PALABRAS CLAVE	DESCRIPTORES EN ESPAÑOL												
	Cucumis ; <i>flexuosus</i> ; AFLPs												
	DESCRIPTORES EN INGLÉS												
	Cucumis ; <i>flexuosus</i> ; AFLPs												
CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO	URL MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN: http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&id=6&contenido=/files/portada.jsp												
	<table border="1"><thead><tr><th>CAMPO</th><th>DISCIPLINA</th><th>SUBDISCIPLINA</th></tr></thead><tbody><tr><td>31</td><td>3107</td><td>310706</td></tr><tr><td>24</td><td>2409</td><td>240992</td></tr><tr><td>24</td><td>2417</td><td>241714</td></tr></tbody></table>	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA	31	3107	310706	24	2409	240992	24	2417	241714
	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA										
	31	3107	310706										
24	2409	240992											
24	2417	241714											
(máximo tres áreas de conocimiento)													

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias por el apoyo y ayuda recibidos durante la realización de este trabajo.

A Belén Picó, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo.

A Alicia Sifres, que me ayudó con los programas informáticos, con el tratamiento de los datos y con muchas otras cosas, pequeñas, pero necesarias.

A Cristina Esteras “el angelito” del laboratorio, por estar siempre al otro lado del correo, con las fotos, artículos y demás cosas que le fui pidiendo.

A Eva, por todo y más. Gracias.

A toda la gente que ha estado en el día a día, Montse, Inma, Santi, Julio, Cristina Roig, Miguel, Ana Pérez, Javi, Carolina, Estela...y al resto de gente del COMAV e invernaderos, gracias por todo.

Agradecer el apoyo, el cariño y los buenos momentos a mis amigas de Moncófar, ha valido la pena estar fines de semana sin vernos.

A Mónica y Noa, por los cafés de los sábados y las “charretas” paseando.

A Cari, por animarme en todo momento, por hacerme reír como poca gente y por estar siempre dispuesta a aguantarme.

A mi amiga Mari, ha sido un año duro, pero todo pasa y es para bien.

A Ana, por esos correos por las noches y los fines de semana, por las cenas, por los consejos y escucharme siempre.

A mis compañeros de máster: Maria, Carmen, Blasco, Pablo, Kike, Jose, Toni, Juan Pablo, Sandra, Carlos, Carles, Georg, Ángel y Patricia. Viva los monos titis, viva James, viva Pankun! Y 2pq!

Finalmente, a mis padres y hermano, mis tíos, mi prima y mi abuela, por su comprensión y confianza.

Gracias.

ÍNDICE GENERAL	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE MELÓN.....	2
1.1.1. El melón en el mundo.....	2
1.1.2. El melón en Turquía	2
1.1.2. El melón en España.....	5
1.2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>CUCUMIS</i>	8
1.3. RECURSOS GENÉTICOS EN TURQUÍA.....	14
1.3.1. <i>Cucumis melo</i> var. <i>flexuosus</i>	17
1.3.2. Diversidad genética de <i>Cucumis melo</i> var. <i>flexuosus</i>	18
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	25
3.2. ANÁLISIS MOLECULAR.....	27
3.2.1 Extracción y cuantificación del ADN genómico.....	28
3.2.2. Marcadores AFLP	29
3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	34
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1 GRADO DE POLIMORFISMO DETECTADO CON LOS MARCADORES AFLPs.....	37
4.2 RELACIÓN DE LAS ENTRADAS DE FLEXUOSUS CON EL RESTO DE GRUPOS BOTÁNICOS.....	39
4.3 DIVERSIDAD ENTRE LAS ENTRADAS DE FLEXUOSUS.....	52
5. CONCLUSIONES.....	59
6. BIBLIOGRAFÍA.....	62
7. ANEXOS.....	71

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE MELÓN

1.1.1. El melón en el mundo

El melón pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, en la que también se encuentran otros cultivos de importancia, como son: sandía, pepino, calabaza y calabacín.

En el Anuario de producción de la FAO (FAOSTAT, 2007) se agrupan los datos relativos a melones (Tabla 1.1). La producción mundial en el año 2007 fue superior a los 26 millones de toneladas. El continente con mayor producción fue Asia, superando los 19 millones de toneladas, seguido de Europa. La superficie total cultivada fue de 1.257.951 hectáreas, siendo también en esta ocasión Asia el continente que destinó más superficie al cultivo.

Tabla 1.1: Producción y superficie de melón en todo en todo el mundo en el año 2007 (FAOSTAT, 2007)

Producción (tm)	2007	Superficie cultivada (ha)	2007
África	1.506.068	África	68.172
América del Norte	1.164.500	América del Norte	47.600
América Central	1.457.385	América Central	76.135
América del Sur	933.293	América del Sur	52.716
Asia	19.199.198	Asia	898.709
Europa	2.303.717	Europa	109.091
Oceanía	76.743	Oceanía	5.528
Total	26.640.904	Total	1.257.951

1.1.2. El melón en Turquía

Como se ha descrito anteriormente la producción de melones en Asia en 2007 fue superior a los 19 millones de toneladas, con una superficie de 898.709 hectáreas (FAO, 2007). Turquía fue el segundo país productor de melón, con casi 2 millones de toneladas producidas en 100.000 hectáreas cultivadas, muy por detrás del primer productor, que es China (Tabla 1.2). Así, Turquía es el segundo país productor de Asia y del mundo.

Tabla 1.2: Producción y superficie cultivada de melón en Asia en el año 2007 (FAO, 2007).

Producción (tm)	2007	Superficie cultivada (ha)	2007
Arabia Saudita	208.569	Arabia Saudita	11.528
China	13.652.590	China	556.531
Corea RPD	110.000	Corea RPD	11.000
India	645.000	India	31.500
Irán	1.230.000	Irán	80.000
Irak	210.000	Irak	23.000
Japón	225.000	Japón	10.500
Kazajstán	185.060	Kazajstán	12.000
Pakistán	265.000	Pakistán	18.000
Siria	105.000	Siria	10.500
Turquía	1.770.000	Turquía	103.000
Otros	382.979	Otros	30.520
Total	19.199.198	Total	898.079

La producción de melones en Turquía ha seguido una tendencia ligeramente descendente en los últimos años (Tabla 1.3). Así, en el año 2006, la producción de hortalizas cultivadas por sus frutos fue de 21.167.582 toneladas, correspondiendo a melón 1.765.605 toneladas (8,32%). En el año 2007, la producción total se vio disminuida en más de 350.000 toneladas, viéndose también disminuida la producción de melones en más de 100.000 toneladas. En cualquier caso la producción de esta hortaliza sigue siendo aproximadamente un 10% del total y ocupa el 4º lugar, detrás del tomate, la sandía y el pepino.

Tabla 1.3: Producción de hortalizas en Turquía en 2006-2007. (Turkish Statistical Institute,2008).

	Producción (tm)	
	2006	2007
Hortalizas cultivadas por sus frutos	21.167.582	20.799.063
Tomate	9.854.877	9.945.043
Sandía	3.805.306	3.796.680
Pepino	1.799.613	1.674.580
Melón	1.765.605	1.661.130
Berenjena	924.165	863.737
Pimiento (verde)	775.577	727.190
Leguminosas (total)	718.193	665.085
Guisante verde	89.632	87.743
Habichuelas	563.763	519.968
Judía verde	16.077	14.101
Haba	48.721	43.273
Pimiento (para salsa)	673.981	674.788
Pimiento (para relleno)	392.617	357.246
Calabaza	288.336	267.142
Calabacín	76.632	70.740
Otra	36.843	36.992

En Turquía el uso de los melones es mayoritariamente doméstico, principalmente para el consumo humano, con un consumo medio de 20,5 kilogramos por persona y año (Tabla 1.4). En esta tabla se observa que se producen unas pérdidas de cosecha del 2%. Apenas el 0,5% se destina a exportación, y la mayor parte se exporta a la unión europea.

Tabla 1.4: Producción de sandía y melón en Turquía en 2007-2008 (Turkish Statistical Institute 2008).

	Sandía	Melón
Producción (tm)	3.796.680	1.661.130
Pérdidas de la cosecha	102.510	44.851
Uso		
Doméstico	3.661.289	1.608.901
Consumo humano	3.295.160	1.448.011
Pérdidas	366.129	160.890
Exportaciones	38.992	7.495
EU 27	31.308	6.037
Consumo humano per cápita (Kg)	46,68	20,51

1.1.3 El melón en España

España fue el principal productor de melón de Europa en 2007 con un total de 1.141.900 toneladas, lo que supone más del 50% del total anual. También es el país con mayor superficie cultivada, 38.600 hectáreas, siendo un 43% del total, y se encuentra muy por delante de los países que le siguen en importancia como Italia, Francia o Grecia (tabla 1.5).

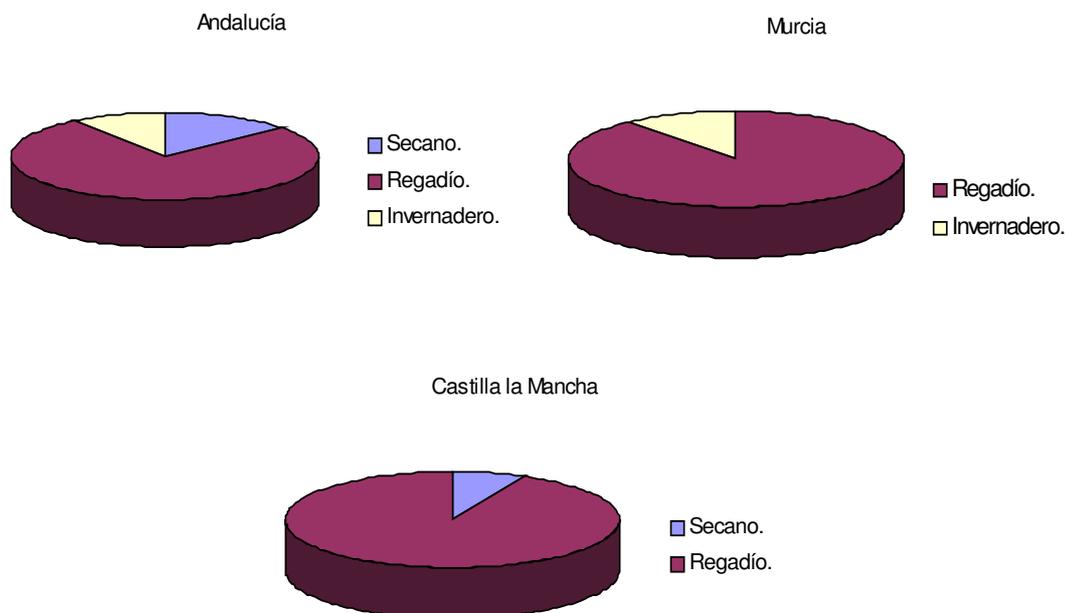
Tabla 1.5: Producción y superficie cultivada de melón en Europa en el año 2007 (FAO, 2007).

Producción (Tm)	2007	Superficie cultivada (ha)	2007
Chipre	10.070	Chipre	190
Eslovaquia	1.097	Eslovaquia	146
España	1.141.900	España	38.600
Francia	295.000	Francia	15.000
Grecia	143.500	Grecia	6.300
Hungría	14.200	Hungría	1.100
Italia	512.247	Italia	22.109
Malta	4.600	Malta	250
Países Bajos	2.300	Países Bajos	70
Portugal	22.000	Portugal	3.100
Rumania	33.437	Rumania	3.430
Total	2.180.351	Total	90.295

Según datos de FAOSTAT, se ha observado una tendencia creciente en la producción de melón en los últimos años. Así, la producción total de melones en España fue de 1.141.900 toneladas en el año 2007, lo que supone un aumento de casi 40.000 toneladas respecto al año 2006 (1.087.917 tm).

Las estadísticas publicadas en el Anuario Nacional de Estadística Agraria del año 2008 (MAPA, 2008) demuestran que en España las dos principales áreas de cultivo son la zona centro, de cultivo extensivo al aire libre, y la zona este, de cultivo intensivo en invernadero. La principal comunidad en superficie en el cultivo de melones es Murcia, seguida de Castilla la Mancha y Andalucía. Siendo la mayor parte de la superficie total cultivo de regadío (16.787 ha.) (Figura 1.1).

Fig 1.1: Superficie de cultivo de melón Andalucía, Murcia y Castilla la Mancha en el año 2008 (MAPA, 2009).



La Comunidad Valenciana ocupa el 5º lugar, por detrás de Murcia, Castilla la Mancha, Andalucía y Extremadura (Tabla 1.6).

Tabla 1.6 Principales áreas de cultivo de melón en España en el año 2007 (MAPA, 2008).

Melón	Hectáreas
Andalucía	2.844
Aragón	21
Baleares	205
C.Valenciana	1.135
Extremadura	2.367
Murcia	7.977
Castilla la Mancha	4.620
Madrid	501
Castilla León	75
Cataluña	69
Total	19.814

Los datos anteriores indican la importancia del cultivo de melón, tanto a nivel mundial, como en Asia y Europa, y concretamente, en Turquía y España, que son segundo y quinto países productores a nivel mundial. La importancia económica del melón justifica los estudios llevados a cabo en el mismo, que podrán conducir a una mejora más eficiente de esta hortaliza (Tabla 1.7).

Tabla 1.7: Producción mundial de melón en al año 2007 (FAOSTAT, 2008) .

Producción (Tm)	2007
China	13.625.590
Turquía	1.770.000
Irán	1.230.000
Estados Unidos	1.150.000
España	1.141.900
Marruecos	734.265
India	645.000
Egipto	550.000
México	543.336
Italia	512.247
Brasil	495.323

1.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Cucumis*

La familia *Cucurbitaceae* pertenece al orden *Cucurbitales*, superorden *Violanae*, de la clase *Magnoliopsida* (subclase *Dilleniidae*). Según los últimos estudios taxonómicos (Jeffrey, 2005) la familia incluye 130 géneros y 800 especies. La familia está dividida en dos subfamilias: *Nhandioboideae*, con 19 géneros y 60 especies sin valor económico, y *Cucurbitoideae*, con 111 géneros y 740 especies. La subfamilia *Cucurbitoideae* se compone de 7 tribus, una de las cuales es *Benincaseae* a la cual pertenece el género *Cucumis* (Jeffrey, 2005).

El género *Cucumis* se divide en dos subgéneros fácilmente diferenciables por el número cromosómico básico de las especies que contienen. En el subgénero *Cucumis* el número básico es $x=7$, mientras que el subgénero *Melo*, donde se incluye el melón, tiene un número cromosómico básico de $x=12$.

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie diploide, $2n=2x=24$. Es una planta herbácea, de porte rastrero o trepador, con un tallo recubierto de formaciones pilosas. Presentan nudos en los que se desarrollan hojas, zarcillos y flores. La hoja tiene el limbo orbicular aovado, reniforme o pentagonal, dividido en 3-7 lóbulos con los márgenes dentados. Las flores son solitarias, de color amarillo y pueden ser masculinas (que suelen aparecer en primer lugar sobre los entrenudos más bajos), femeninas o hermafroditas (que aparecen más tarde en las ramificaciones de segunda y tercera generación). La combinación de distintos tipos de flores en una misma planta da lugar a variedades andromonoicas, monoicas (los dos tipos más frecuentes) y también ginoicas y hermafroditas. La polinización es entomófila. El fruto tiene forma variable (esférica, elíptica, ovalada, etc.). La corteza de color verde, amarillo, anaranjado, blanco, etc., puede ser lisa, reticulada o estriada. La pulpa puede ser blanca, amarilla, cremosa, anaranjada, asalmonada o verdosa. Esta gran variabilidad hace al melón una de las hortalizas más estudiadas, tanto desde el punto de vista teórico, para la generación de nuevo conocimiento, como desde el punto de vista práctico, para la diversificación de tipos y el desarrollo de nuevas variedades (Nuez *et al.*, 2002; Pitrat, 2008; Ezura *et al.*, 2008)

El centro de origen del melón probablemente sea el este de África. Los melones silvestres presentan frutos pequeños, menores de 50 gramos, que se encuentran en el este y oeste de África, pero también en Asia Central y la India (Kirkbride, 1993). Al principio puede que se domesticara por sus semillas, que tienen un elevado valor

nutricional, pero en la actualidad se aprovecha fundamentalmente por sus frutos. Debido a la variabilidad existente en la especie se han realizado numerosas clasificaciones taxonómicas de la misma. Robinson y Decker-Walters (1997) clasificaron los melones en 2 grandes grupos, *Cucumis melo* L. subsp. *agrestis* (Naud.) Pangalo y *Cucumis melo* subsp. *melo*.

Pitrat, (2008), realizando una síntesis de las clasificaciones descritas, propone una clasificación intraespecífica de *Cucumis melo* L. en 13 variedades, cinco de las cuales se incluyen en la subsp. *agrestis* y las restantes en la subsp. *melo* (Tabla 1.8). Sin embargo esta clasificación no está formalmente aceptada y muchos autores han sugerido cambios a raíz de nuevos estudios moleculares, como incluir las variedades *dudaim* y *chito* dentro de la subsp. *agrestis* (Monforte *et al.*, 2003) e incluir dentro de esta misma subespecie la var. *texanus* Naudin, que incluiría tipos de melón norteamericanos muy relacionados con la variedad *dudaim* (Decker-Walter *et al.*, 2002).

Tabla 1.8: Variedades botánicas (Pitrat *et al.*, (2008),

Subespecie	Variedad Botánica
	Var. <i>conomon</i> Thunberg
<i>agrestis</i>	Var. <i>makuwa</i> Makino
Jeffrey (pelos	Var. <i>chinensis</i> Pangalo
cortos en el	Var. <i>momordica</i> Roxburgh
ovario)	Var. <i>acidulus</i> Naudin
	Var. <i>inodorus</i> Jacquin
	Var. <i>cantalupensis</i> Naudin
	Var. <i>reticulatus</i> Seringe
<i>melo</i> Jeffrey	Var. <i>ameri</i> Pangalo
(pelos largos	Var. <i>chate</i> Hasselquist
en el ovario)	Var. <i>tibish</i>
	Var. <i>dudaim</i> ^a Linné
	Var. <i>flexuosus</i> Linné

^aSegún Monforte *et al.*, 2003 y Decker-Walters *et al.*, 2002 esta variedad pertenece a la subespecie *agrestis*.

Independientemente de algunas discrepancias en la clasificación, la mayoría de los autores coinciden en describir a la especie como muy variable. Las diferentes

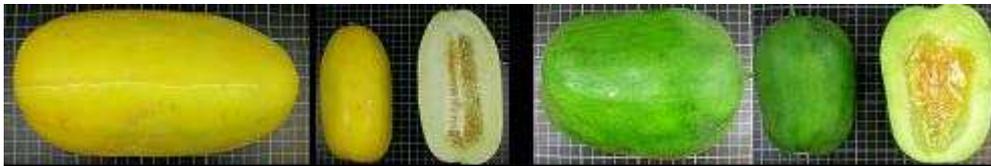
variedades botánicas difieren en muchas características, pero principalmente en el tipo sexual, en la condición climatérica o no climatérica de frutos y en distintos aspectos relacionados con la calidad externa e interna del mismo (Pitrat, 2008).

A continuación se resumen las principales características de las variedades botánicas descritas por Pitrat, 2008:

- Subespecie *agrestis*: este de Asia, India, Japón. Con pelos largos en el ovario.

Incluye las siguientes variedades botánicas.

- *conomon* (Thunberg) Makino: follaje verde oscuro, andromonoico, frutos alargados, piel lisa, carne blanca, no aromático, no climatérico. Este de Asia.



Se representan las entradas Freeman's cucumber y Tokio mammoth, ambas de Japón.

- *makuwa* (Thunberg): follaje verde oscuro, andromonoico, frutos alargados-redondeados, piel lisa, blanca, amarilla o verde, dulce, algo aromático, climatérico. Este de Asia.



Se representa la entrada Ginsen makuwa, de Japón.

- *chinensis* (Pangalo): follaje verde oscuro, andromonoico, en ocasiones hermafrodita, con forma de pera, fruto verde, con puntos, carne verde o naranja, poco aromático, climatérico o no. China, Corea.



Se representa la entrada Songwhan Charmi, utilizada como parental exótico para elaborar el mapa genético español de melón en fondo genético Piel de sapo.

- *momordica* (Roxburgh) Duthie&Fuller: monoico, alargado, acostillado, piel fina, bajo contenido en azúcar, poco aroma, climatérico. India.



Se representa la entrada PI124112, de la India.

- *acidulus* (Naudin): monoico, ovalado, liso, verde o naranja con o sin puntos, blanco, sin azúcar, sin aroma. India.



Se han representado las entradas PI505602 procedente de Zambia y la PI482429, procedente de Zimbawe.

Además de las variedades botánicas anteriores en esta subespecie se incluyen los tipos africanos silvestres de fruto pequeño, probablemente origen de la domesticación del melón.



- Subespecie *melo*: India, Europa y América. Con pelos cortos
 - *inodorus* (Jacquin): andromonoico, redondo o elíptico, piel desde blanca a verde oscuro, color uniforme o con puntos, a veces arrugado, dulce, no aromático, no climatérico.



Se representan variedades tradicionales españolas de distintos tipos

- *cantalupensis* (Naudin): andromonoico, ovalado, ribeteado, piel lisa, carne naranja, aromático, climatérico, dulce.



Se representa la variedad de tipo cantalupo Prescott fond blanc

- *reticulatus* (Seringe): andromonoico, redondo u ovalado, piel reticulada, aromático, climatérico, dulce. Europa, Asia, América.



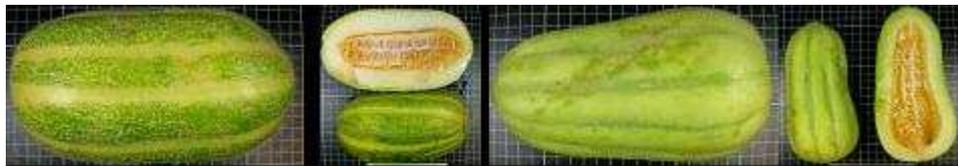
Se encuentra representada la entrada SUD-C-2, procedente de Guatemala y la entrada CUM294 procedente de Libia.

- *ameri* (Pangalo): andromonoico, alargado, piel amarilla o verde claro, sin costillas, poco aromático, climatérico. Asia.



Se ha representado la entrada PI288233 procedente de Egipto y la entrada CUM355, de Irak.

- *chate* (Hasselquist): monoico, en ocasiones andromonoico, redondo u ovalado, acostillado, verde, carne blanca o naranja, sin azúcar, no aromático, climatérico. Mediterráneo y Asia.



Se han representado las entradas Carosello barese y CUM363, ambas italianas.

- *tibish* (Mohamed): andromonoico, ovalado, grande, verde oscuro, con puntos o bandas, carne blanca, sin azúcar, sin aroma, se come como pepino. Sudan



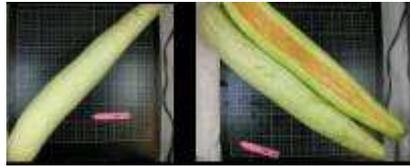
Se han representado dos entradas de Sudán, Tibish Djebel Kordofan y Tibish Khurtagat15.

- *dudaim* (L. Naudin): andromonoico, redondo, maduran en color rojizo con rallas amarillas, aroma intenso, carne blanca, sin azúcar, climatérico. Asia central.



Se ha representado la entrada CUM254 procedente de Afganistán.

- *Flexuosus* (L. Naudin): monoico, alargado, verde claro, sin azúcar, no aromático. Norte de África, Turquía, Irak, India.



Las entradas representadas son PI167057, de Turquía y Snakemelon, procedente de Arabia Saudí.

1.3 RECURSOS GENÉTICOS EN TURQUÍA

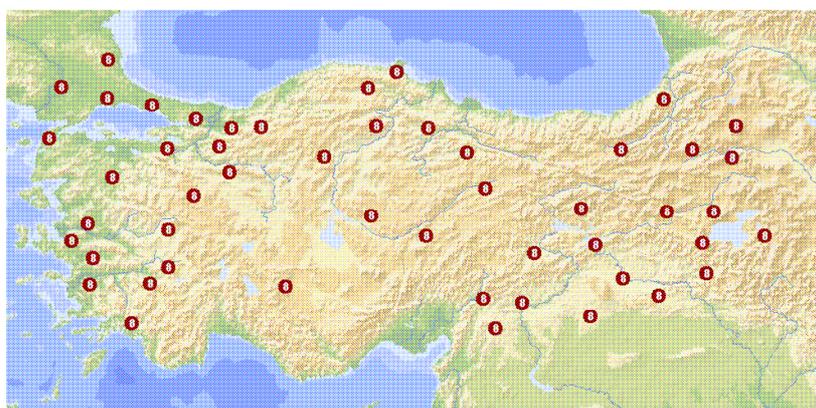
Harlan (1951) describió Turquía como un microcentro de diversidad de muchos cultivos, incluyendo la mayoría de las Cucurbitáceas de interés económico: *C. melo* (originario de África subtropical y tropical), *C. lanatus* (originario de África subtropical y tropical), *C. sativus* (originario de Asia Central y Himalaya), *C. moschata* (originario de Sudamérica) y *C. pepo* (originario de América Central y el sur de Norte América). Pitrat *et al.*, 1999 y Jeffrey, 2001 han descrito a Turquía como un centro secundario de diversidad genética. Se ha observado que los genotipos locales son muy diversos. De hecho Oriente Medio (Irán, Irak y Turquía) muestran uno de los mayores niveles de variación en los tipos pertenecientes a las variedades botánicas *cantalupensis*, *inodorus* y *flexuosus*. Esta área se ha descrito como la zona de origen de los tipos *inodorus*, siendo también relevante para la difusión de los mismos al resto de Europa. También se piensa que los tipos *cantalupensis* se difundieron por Europa a partir del Este de Turquía (Zhukovsky, 1951; Gunay, 1993 Sensoy *et al.*, 2007).

En Turquía, como en otros centros, han ocurrido severos procesos de erosión genética que han resultado en graves pérdidas de la diversidad existente. Para evitar la

pérdida definitiva de estos recursos esenciales para la mejora de las Cucurbitáceas, se han desarrollado numerosas actividades de recolección de recursos genéticos.

En 1920 empezaron las actividades de recolección. En el año 1963 se fundó el Agricultural Research Institute, y se fusionó con el Plant Research and Introduction Center en 1967. En el año 1987 sufrió una remodelación y recibió su nombre actual, Aegean Agricultural Research Institute (AARI). Este instituto adquirió la responsabilidad de coordinar todas las colectas y estudios relacionados con el germoplasma de Cucurbitáceas y otras especies, tales como la viabilidad de las semillas, calidad, certificación de semillas, búsqueda de cultivares resistentes... (Figura 1.2).

Figura 1.2: Colecciones *ex situ* de AARI de *Cucumis melo* en Turquía (AARI, 2009)



Es aquí donde se encuentran la mayor parte de los recursos genéticos de la familia Cucurbitáceas recogidos en Turquía. El número total de accesiones es aproximadamente de 2000 entradas, entre las cuales se incluyen sandía, melón, pepinos y calabazas. La tabla 1.9 muestra el número de entradas de Cucurbitáceas en el National Gene Bank (NGB, banco de Turquía).

Tabla 1.9: Entradas en el NGB (National Gene Bank) (AARI, 2009)

Especie	Nombre turco	Lugares de recolecta	Número de entradas
<i>C. melo</i>	Kavun	54	571
<i>C. melo flexuosus</i>	Acur	28	74
<i>C. sativus</i>	Hiyar	58	297
<i>Cucumis spp.</i>	-	6	8

Especie	Nombre turco	Lugares de recolecta	Número de entradas
<i>C. lanatus</i>	Karpuz	45	358
<i>C. pepo</i>	Yazlik kabak, Uzun kabak	47	160
<i>C. moschata</i>	Kislik kabak, (bal kabagi)	25	93
<i>C. maxima</i>	Kislik kabak, (kestane kabagi)	9	29
<i>Cucurbita spp.</i>	-	58	455
<i>L. siceraria</i>	Su kabagi	15	172
<i>E. elaterium</i>	Esek hiyan, it kelegi	5	5
<i>B.dioica</i>	Ak asma	1	1
Total			2223

En el AARI tienen la infraestructura necesaria para poder conservar el material recogido a 4°C. Las entradas que tienen baja germinación, o de las que se dispone poca semilla, se someten a un programa de regeneración y multiplicación. En el año 2000 se empezó un programa de regeneración, y desde entonces se han regenerado todas las entradas. También se ha iniciado un programa de conservación “*in situ*”.

A partir del año 1990 la Facultad de Agricultura de la Universidad de Çukurova también empezó a realizar colectas, consiguiendo más de 300 entradas de especies de Cucurbitáceas (Küçük *et al.*, 2002) (tabla 1.10).

Tabla 1.10: Entradas en la Universidad de Çukurova (AARI, 2009)

Género	Número de entradas
<i>Citrullus vulgaris</i>	45
<i>Cucumis melo</i>	301
<i>Cucurbita spp.</i>	14
<i>Cucurbita spp.</i>	10
<i>Luffa spp.</i>	6
<i>Momordica</i>	1
Otros	10
Total	387

Estos genotipos locales de melón mantenidos en los bancos de germoplasma turcos (el AARI y en la Facultad de Agricultura de la Universidad de Çukurova) son de

enorme interés para la mejora de esta especie y su caracterización es básica para optimizar su uso.

1.4.CUCUMIS MELO VAR. FLEXUOSUS

Una de las variedades botánicas admitidas por casi todos los estudios es la variedad *flexuosus*. Los melones pertenecientes a este grupo reciben también el nombre de alficoce o melones serpiente, del inglés Snake melon, por su forma característica alargada y retorcida (Figura 1.3).

Esta variedad se considera originaria de Asia, donde se encuentra en estado silvestre. La planta tiene diversos usos, siendo el principal el aprovechamiento de los frutos como hortaliza, tanto crudos como cocidos, ya que tienen un sabor parecido al pepino, aunque miden bastante más, en ocasiones más de 1 metro. El uso de las semillas crudas, por su elevado contenido en aceite es otro de los aprovechamientos de este fruto, pero en menor medida que el uso del fruto.

Figura 1.3: Foto de melón tipo *flexuosus* en estado inmaduro.



Turquía es uno de los países con mayor diversidad genética de *Cucumis melo* var *flexuosus*. Su cultivo se localiza en la región del Sudeste, Egea y Mediterránea. Como se ha comentado anteriormente existen numerosas entradas de este tipo en los bancos de germoplasma Turcos. Los tipos flexuosos del NGB se recogieron en la región del Sudeste de Anatolia en 1992. Parte de este material fue evaluado según los caracteres de la planta y del fruto (Besirli y Yanmaz 1999). Existe además en la

actualidad un proyecto en curso en la Universidad de Çukurova (Sari *et al.* 2006) orientado a comparar la diversidad morfológica y molecular del snakemelon turco y mundial.

1.4.1. Diversidad genética de *Cucumis melo* var. *flexuosus*

Debido a la gran variabilidad existente en la especie son numerosos los trabajos de caracterización de la diversidad genética en melón. En la mayoría de los casos se realiza una caracterización morfológica y/o agronómica que se combina con una caracterización molecular que permite una mejor discriminación entre genotipos y una estima más precisa del grado de diversidad genética (Meglic and Staub, 1996). En melón se han empleado muchos tipos distintos de marcadores, desde isozimas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple sequence repeats), (Esquinas-Alcazar, 1981; Perl-Treves *et al.*, 1985; Staub *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 2002; Neuhausen, 1992; Silberstein *et al.*, 1999; García *et al.*, 1998; Stepansky *et al.*, 1999; Silberstein *et al.*, 1999; Staub *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 2004; Garcia-Mas *et al.*, 2000; Katzir *et al.*, 1996; Mliki *et al.*, 2001; Danin-Poleg *et al.*, 2001; Monforte *et al.*, 2003; Zhuang *et al.*, 2004; Fantaccione *et al.*, 2008; Chiba *et al.*, 2003; Ritschel *et al.*, 2004; Fernandez-Silva *et al.*, 2008) hasta los marcadores más novedosos, SNPs (Single nucleotide polymorphisms) derivados de la reciente disponibilidad de secuencia en la especie, incluso la secuencia genómica (Morales *et al.*, 2004; González-Ibeas *et al.*, 2007; Deleu *et al.*, 2009; <http://www.melogen.upv.es>; www.icugi.org)

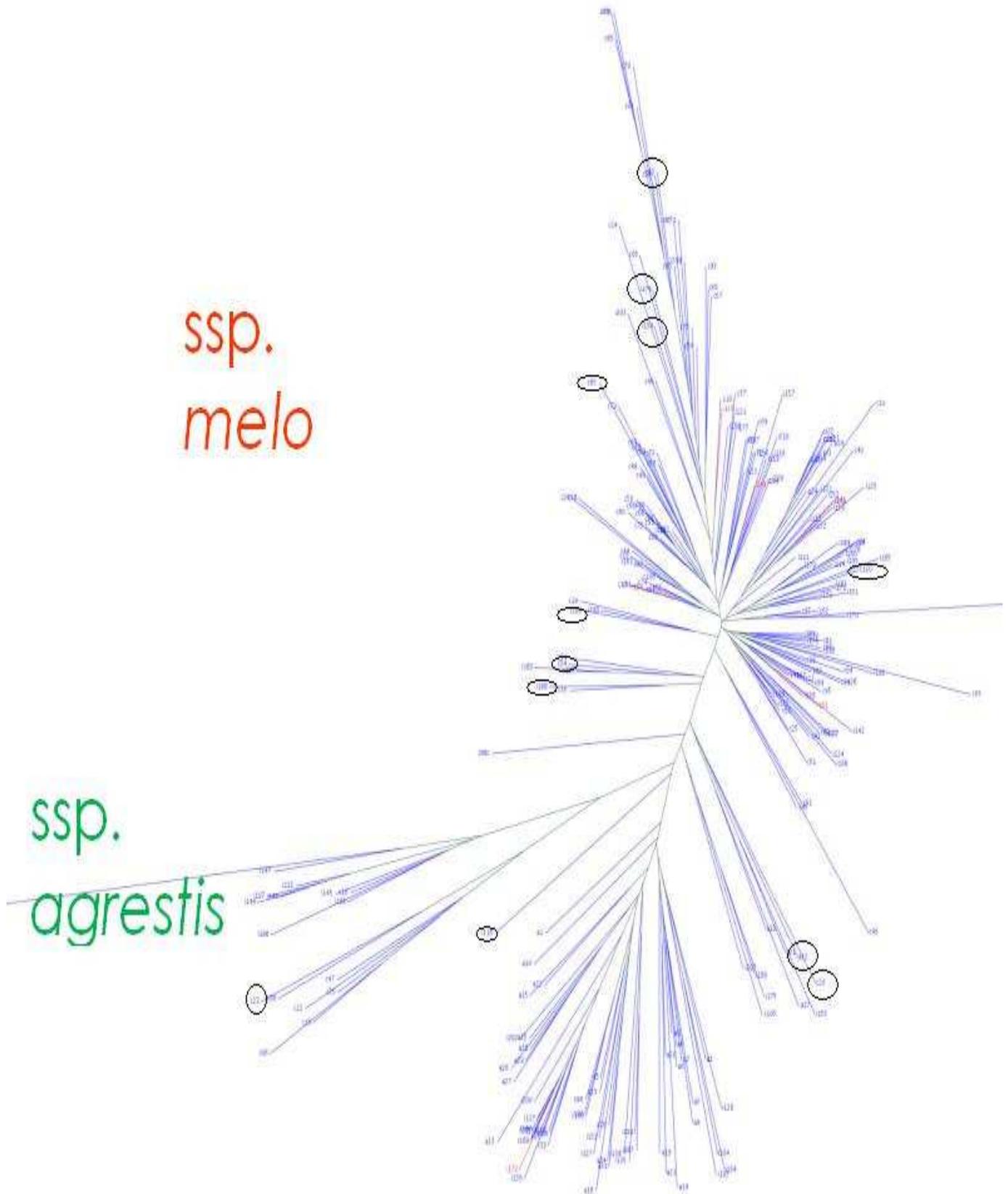
La identificación genética mediante estos marcadores ha hecho posible la clasificación de los diferentes genotipos. En general, se han encontrado clasificaciones similares con los distintos sistemas de marcadores. La mayoría de los estudios apoyan la división subespecífica *melolagrestis*.

Uno de los estudios más completos que incluye entradas representativas de la mayoría de grupos botánicos es el llevado a cabo por Stepansky *et al.* (1999). Estos autores combinan la caracterización morfológica con el empleo de RAPDs and ISSRs para genotipar y fenotipar un conjunto de entradas de 23 países, representando la zona de origen y los centros de diversificación primaria y secundaria. Los tipos dulces *cantalupensis* e *inodorus* se agrupan, separándose de las variedades no dulces, *agrestis*, *conomon* y *momordica*. Existen discrepancias en la clasificación de algunos grupos

botánicos, entre ellos el tipo *flexuosus* que se agrupa con los tipos no dulces fenotípicamente, y con los dulces en el árbol molecular. Tradicionalmente, los tipos *flexuosus* se han considerado perteneciente a la subespecie *melo*. Esta subespecie se caracteriza por tener pelos largos en el ovario, sin embargo los frutos de *flexuosus* caracterizados en este estudio presentan variación para este carácter de interés taxonómico.

Esteras *et al.*, (2009), en un análisis reciente llevado a cabo con AFLPs, utilizando una colección nuclear de melón de 212 entradas ha encontrado resultados similares, siendo los tipos *flexuosus* muy variables y encontrándose mezclados entre distintos grupos botánicos (Figura 1.4).

Figura 1.4: Cluster de las entradas empleadas en el artículo Esteras *et al.*,(2009). Se representa con un círculo la posición de los *flexuosus* empleados.



No existen estudios de diversidad centrados exclusivamente en el grupo *flexuosus*, aunque entradas de este grupo se han ido empleando como controles en muchos estudios, que han proporcionado cierta información acerca de la variación regional. López-Sesé *et al.*, (2003) y Deleu *et al.*, (2009) estudian la diversidad de tipos españoles. Aunque los tipos *flexuosus* se parecen morfológicamente a los griegos, difieren molecularmente de éstos (Staub *et al.*, 2000) y de los empleados en otros países europeos. Fanourakis *et al.*, (2000) y Staub *et al.*, (2004), estudian la diversidad de melones en Grecia, encontrando que el grupo *flexuosus* es uno de los más variables y que presentan afinidad molecular con los tipos *conomon* del oeste de Asia. Se ha sugerido que algunas entradas españolas y griegas pueden tener su origen a partir de melones de esta zona. En cualquier caso, la mayor diversidad genética descrita para este grupo es la encontrada en Turquía (Abak *et al.*, 2006; Sensoy *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El grupo botánico de melón *flexuosus* es de mucho interés, dada su enorme variabilidad y su situación intermedia entre el grupo *melo* y el grupo *agrestis*. No se han realizado hasta la fecha estudios centrados en este grupo botánico. Turquía es un importante centro de diversidad genética debido a su posición estratégica, ya que limita con la Unión Europea en el oeste, Asia Central en el este, Rusia en el norte y Oriente Medio en el sur. El cultivo de *Cucumis melo var flexuosus* se localiza en la región del Sudeste, egea y mediterránea. La mayor variabilidad del mismo se encuentra en este país. La presente tesina de máster se encuadra en el marco de un proyecto desarrollado en colaboración con la Universidad de Çukurova, orientado a estudiar la diversidad genética de los melones turcos pertenecientes al grupo *flexuosus* en relación con melones de este tipo procedentes del resto del mundo. Para ello se proponen los siguientes objetivos:

1- Caracterizar molecularmente las entradas de *flexuosus* de la colección de la Universidad de Çukurova.

2- Comparar su variabilidad con una colección de entradas de distintas partes del mundo.

3-Confirmar la descripción fenotípica realizada en la Universidad de Çukurova.

MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal objeto de este estudio son 58 entradas (Figura 3.1). Por un lado, las entradas codificadas AC y procedentes de Turquía son tipos clasificados como *flexuosus* por los Bancos de germoplasma correspondientes y se han colectado en distintas zonas de Turquía. Se escogieron estas entradas en función de su variabilidad y su disponibilidad en el banco de la universidad de Çukurova. El resto de entradas con código AC son mayoritariamente entradas de *flexuosus* procedentes de distintos países proporcionadas mayoritariamente por Michel Pitrat. Las entradas codificadas como KAV se han empleado como controles y pertenecen a distintos grupos botánicos. El origen de estas entradas se detalla en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Relación de las entradas escogidas.

Número	Código	Nombre utilizado en los análisis	Nombre/tipo	Origen	Banco de origen
1	AC 1	AC1F	Beyaz Acur Kisa Meyve	Turquia	TAEK, Ankara
2	AC 2	AC2F	Beyaz Acur Uzun Meyve	Turquia	TAEK, Ankara
3	AC 3	AC3F	Siyah Acur Yuva Tipi	Turquia	TAEK, Ankara
4	AC 4	AC4F	Siyah Acur Kirkağac Tipi	Turquia	TAEK, Ankara
5	AC 5	AC5F	Hitta	Turquia	Birecik, Şanhurfa
6	AC 7	AC7F	Kizilören 1	Turquia	Incesu, Kayseri
7	AC 14	AC14F	Midyat 1	Turquia	Midyat, Mardin
8	AC 15	AC15F	Midyat 2	Turquia	Midyat, Mardin
9	AC 16	AC16F	Adana	Turquia	Karşiyaka, Adana
10	AC 18	AC18F	Diyarbakir 2	Turquia	KTAE, Kahramanmaraş
11	AC 20	AC20F	Minehöyük	Turquia	KTAE, Kahramanmaraş
12	AC 21	AC21F	Urfa	Turquia	KTAE, Kahramanmaraş
13	AC 25	AC25F	TR 48637	Turquia	ETAE, Izmir
14	AC 31	AC31F	TR 40517	Turquia	ETAE, Izmir
15	AC 32	AC32F	TR 47782	Turquia	ETAE, Izmir
16	AC 33	AC33F	TR 47808	Turquia	ETAE, Izmir
17	AC 38	AC38F	TR 40328	Turquia	ETAE, Izmir
18	AC 41	AC41F	TR 48643	Turquia	ETAE, Izmir
19	AC 44	AC44F	TR 26439	Turquia	ETAE, Izmir
20	AC 47	AC47F	TR51559	Turquia	ETAE, Izmir

Número	Código	Nombre utilizado en los análisis	Nombre/tipo	Origen	Banco de origen
21	AC 51	AC51F	Hitta	Turquia	Birecik, Şanhurfa
22	AC 54	AC54F	Adsiz	Turquia	Gözpınar-Kurtalan, Siirt
23	AC 55	AC55F	Adsiz	Turquia	Nusaybin-Cizre, Mardin
24	AC 56	AC56F	Adsiz	Turquia	Niğde-Nevşehir arası
25	AC 60	AC60F	Tüylü Acur	Turquia	Birecik, Şanhurfa
26	AC 61	AC61F	Ames 20443	India	INRA, Francia
27	AC 62	AC62F	Ames 20836	India	INRA, Francia
28	AC 63	AC63F	Cohombro	España	INRA, Francia
29	AC 67	AC67F	Damascus Long Gren	Siria	INRA, Francia
30	AC 69	AC69F	Fagus	Libia	INRA, Francia
31	AC 70	AC70F	Fakouss	Túnez	INRA, Francia
32	AC 71	AC71F	Fakouss Syrie 1	Siria	INRA, Francia
33	AC 73	AC73F	Fqus	Túnez	INRA, Francia
34	AC 78	AC78F	PI 525133	Egipto	INRA, Francia
35	AC 79	AC79F	Saudi	Ara. Saudí	INRA, Francia
36	AC 80	AC80F	Shendi	Sudán	INRA, Francia
37	AC 81	AC81F	Silka	Sudán	INRA, Francia
38	AC 82	AC82F	Sm	Egipto	INRA, Francia
39	Kav 34	Kav34I	---/inodorus	Argelia	Konya
40	Kav 35	Kav35I	---/inodorus	Argelia	Konya
41	Kav 63		---/inodorus	Egipto	Urfa-Birecik
42	Kav 64	Kav64DU	Şemamok/dudaim	Egipto	Sürekli-Kiziltepe/Mardin
43	Kav 66	Kav66I	Yabani Kavun/inodorus	Egipto	Yaylak/Bozova/Urfa
44	Kav 105	Kav105I	Kirkagac 637/inodorus	Turquía	ETAE, Izmir
45	Kav 171	Kav171AC	90625/ acidulus	India	INRA, Francia
46	Kav 173	Kav173CHA	Carosello/ chate	Italia	INRA, Francia
47	Kav 174	Kav174AM	Chandaljak/ameri	Rusia	INRA, Francia
48	Kav 175	Kav175CHI	Cuba 1/chito	Cuba	INRA, Francia
49	Kav176	Kav176MO	Fazaizabadi/momordica	India	INRA, Francia
50	Kav 177	Kav177I	Honeydew GF/inodorus	USA	INRA, Francia
51	Kav 179	Kav179AM	Khatoni/ ameri	Irán	INRA, Francia
52	Kav 180	Kav180MO	MR1/ momordica	India	INRA, Francia
53	Kav 187		ShiroUri Okay/conomon	Japón	INRA, Francia

Número	Código	Nombre utilizado en los análisis	Nombre/tipo	Origen	Banco de origen
54	Kav188	Kav188F	Snakemelon/ <i>flexuosus</i>	Ara Saudí	INRA, Francia
55	Kav190	Kav190CA	Vedrantais/ <i>cantalupensis</i>	Francia	INRA, Francia
56	Kav183	Kav183MO	PI414723/ <i>momordica</i>	India	INRA, Francia
57	Kav186	Kav186DU	Queen's Pocket/ <i>dudaim</i>	Afganistán	INRA, Francia
58	Kav185	Kav			

Figura 3.1: mapa de los bancos de Turquía de donde proceden las entradas empleadas.



3.2 ANÁLISIS MOLECULAR

Se dispusieron en placas Petri unas 10 semillas por entrada. Las placas se trataron con un fungicida de amplio espectro y se colocaron en una cámara de germinación. Una vez germinadas las semillas se sembraron en bandejas de 96 alveolos en un panel de invernadero. A los 10-15 días de la siembra, cuando las plántulas habían desarrollado la primera hoja verdadera, se tomaron las muestras de tejido. Se tomó

muestra de 2 o 3 plantas por entrada, según la disponibilidad debido a la germinación, siempre que fuera posible. Se tomó muestra que se liofilizó durante 48 horas, y se tomó muestra que se conservó a -80°C .

3.2.1. Extracción y cuantificación del ADN genómico.

Una vez cogidas las muestras de hoja joven (la primera o segunda hoja verdadera), se pesaron 50-60 mg del tejido que se congelaron en tubos eppendorf, empleando nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

El protocolo de extracción de ADN seguido fue el método del CTAB modificado:

Triturar el tejido.

Añadir 700 μl de tampón de extracción (2% CTAB, EDTA 20 mM, Tris 100 mM, NaCl 1,42 M, pH 8) y 1,4 μl de β -mercaptoetanol al tejido triturado. El β -mercaptoetanol se adiciona al tampón de extracción en la campana y justo antes de empezar las extracciones.

Tras agitar las muestras con el tampón, añadir 100 μl de cloroformo: alcohol isoamílico (24/1), también en la campana.

Agitar e incubar durante 30 minutos a 65°C .

Añadir cloroformo: alcohol isoamílico (24/1) hasta llenar el tubo (unos 650 μl) y agitar.

Centrifugar a 11.000 rpm durante 5 minutos.

Recuperar la fase acuosa, que es la que contiene los ácidos nucleicos.

Añadir etanol absoluto a cada tubo hasta llenarlo y agitar suavemente.

Precipitar 10 minutos a -20°C .

Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.

Eliminar el sobrenadante.

Lavar el precipitado con 500 μl de etanol 70%.

Agitar suavemente y centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.

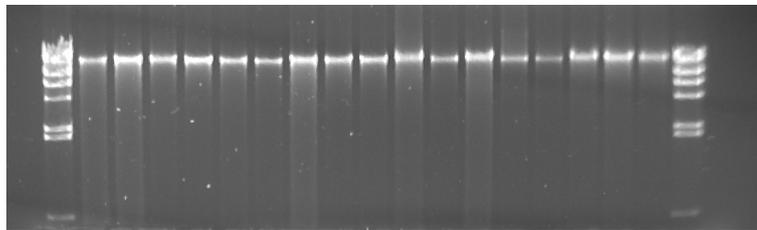
Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado al aire.

Resuspender en 50-100 μl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

Almacenar en el congelador a -20°C .

Para cuantificar el ADN extraído se prepararon geles de agarosa al 0.8% (en tampón TBE 1X) (Tris Borato 0,089 M pH 8,3, EDTA 2 mM). Las muestras se prepararon con 1 µl de ADN genómico, 5 µl H₂O miliQ y 1.5 µl de tampón de carga. Una vez finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 minutos. Las imágenes de los geles se procesaron mediante el programa Scion Image (1998). Cada muestra se cuantificó comparando la intensidad de las bandas con las del marcador Lambda *Hind*III 2 (Figura 3.2).

Figura 3.2: Gel de cuantificación de ADN genómico (al 0,8% de agarosa). En los extremos se observan las bandas del marcador Lambda *Hind*III2.



Una vez cuantificadas las muestras se procedió a su dilución, de manera que todas las muestras estuvieran a la misma concentración (40 ng DNA genómico/µl).

3.2.2. Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

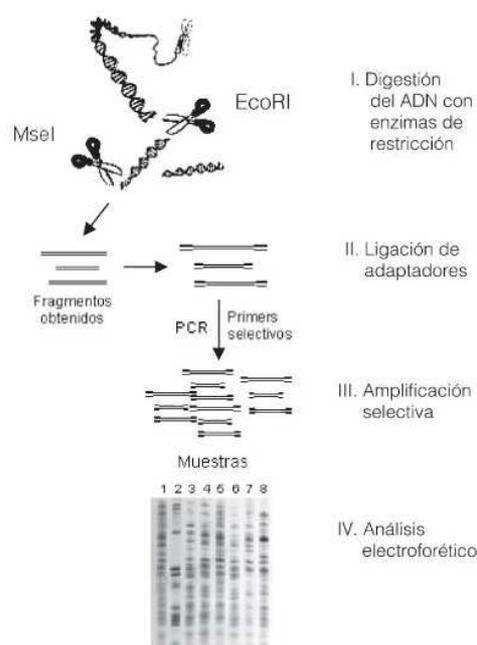
Los marcadores AFLP (Vos *et al.*, 1995), son dominantes, es decir, no permiten distinguir un heterocigoto de un homocigoto. A pesar de esta limitación, son marcadores ampliamente empleados en estudios de diversidad genética. Sus principales ventajas son que no requieren información previa sobre la especie y que permiten analizar un elevado número de *loci* por reacción.

Se basan en la amplificación vía PCR de fragmentos de ADN previamente digeridos por dos enzimas de restricción (una de corte poco frecuente y otra de corte frecuente) y ligados a dos adaptadores específicos de los enzimas empleados. Puesto que se originan muchos fragmentos en la digestión, la amplificación de todos ellos daría lugar a demasiados fragmentos y su interpretación e individualización se haría prácticamente imposible. Por ello, los cebadores utilizados en la PCR selectiva son extendidos en dos o tres nucleótidos en el extremo 3'. Así se obtiene un número de

fragmentos manejable. Las endonucleasas empleadas habitualmente son *EcoRI* (corte poco frecuente) y *MseI* (corte frecuente).

Las reacciones AFLP se llevaron a cabo según describe Ferriol *et al.* (2004). El protocolo consiste esencialmente en cuatro pasos: digestión, ligación, amplificación y separación de los productos amplificados. Se utilizó un kit comercial en los pasos de digestión y ligación (Invitrogen "AFLP® Core Reagent" N° Cat.:10482-016) (figura 3.3)

Figura 3.3: Esquema de la técnica AFLP. (Vos *et al.*, 1995)



Se realizó la digestión de 120 ng de cada muestra de ADN genómico en un volumen final de 10 μ l, con 1 unidad de *EcoRI/MseI* en tampón 1 \times (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgAc₂ 10 mM y KAc 50 mM). Se incubó durante 2 horas y 30 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C para inactivar los enzimas.

El ADN digerido se ligó a unos adaptadores específicos de las endonucleasas empleadas. Estos adaptadores tienen la peculiaridad de que una vez ligados no pueden volver a ser digeridos por los mismos enzimas. Los adaptadores empleados fueron:

Adaptador *EcoRI*: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC

CATCTGACGCATGGTTAA-5'

Adaptador *MseI*: 5'-GACGATGAGTCCTGAG

TACTCAGGACTCAT-5'

Para la ligación se añadió al volumen total de la reacción de digestión 9,6 µl de la solución de ligación de adaptadores (ATP 0,4 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgAc₂ 10 mM, KAc 50 mM) y 0,4 unidades de ligasa T4, incubándose la mezcla durante 3 horas a 20°C.

Para la amplificación preselectiva de los fragmentos flanqueados por los adaptadores *EcoRI/MseI* se utilizaron dos cebadores complementarios de cada uno de los adaptadores, a los que se añadió un nucleótido adicional. Los cebadores empleados fueron:

Cebador *EcoRI*+A: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'

Cebador *MseI*+C: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'

Se amplificó, en un volumen total de 25 µl, 5 µl de la reacción de ligación diluida (1:10) con los cebadores anteriores (20 µM), 100 µM de cada dNTP, 1 mM MgCl₂ y 0,8 unidades de *Taq* polimerasa en tampón de PCR (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,001% glicerol).

El programa de amplificación preselectiva fue el siguiente:

- 1 ciclo de 2 minutos de desnaturalización a 94°C.
- 20 ciclos de:
 - 20 segundos de desnaturalización a 94°C.
 - 30 segundos de hibridación a 56°C.
 - 25 segundos de extensión a 72°C.
- 1 ciclo de extensión final de 30 minutos a 60°C.

Los cebadores utilizados para la amplificación selectiva son idénticos a los de la preamplificación, pero con dos nucleótidos selectivos añadidos al extremo 3'. Se emplearon 3 combinaciones de cebadores. Se utilizó el cebador *EcoRI* marcado con los fluorocromos NED, FAM y HEX (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Cebadores empleados en la amplificación selectiva.

Combinación de cebadores	Fluoróforo	Longitud de onda
<i>EcoRI</i> -ACA <i>MseI</i> -CA	FAM	azul
<i>EcoRI</i> - AGG <i>MseI</i> -CA	HEX	verde
<i>EcoRI</i> -ACG <i>MseI</i> -CA	NED	amarillo

Combinación de cebadores	Fluoróforo	Longitud de onda
<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CA	FAM	azul
<i>EcoRI</i> - AGC <i>MseI</i> -CA	HEX	verde
<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CA	NED	amarillo

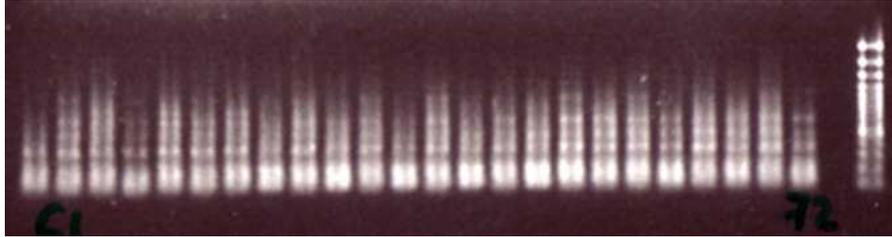
Se amplificó, en un volumen total de 25 μ l, 2 μ l de la reacción de amplificación preselección diluida (1:10) con 200 μ M del cebador *EcoRI* y 1 mM del cebador *MseI*, 100 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1 mM y 0,8 unidades de *Taq* polimerasa en tampón de PCR (Tris-HCl 10mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,001% glicerol). La concentración fue diferente para ambos cebadores de manera que la reacción de amplificación termine cuando el cebador marcado queda totalmente consumido.

El perfil térmico de la amplificación selectiva fue el siguiente:

- 1 ciclo de 2 minutos de desnaturalización a 94°C.
- 10 ciclos de:
 - 20 segundos de desnaturalización a 94°C.
 - 30 segundos de hibridación a 66°C, disminuyendo 1°C la temperatura en cada ciclo.
 - 25 segundos de extensión a 72°C.
- 20 ciclos de:
 - 20 segundos de desnaturalización a 94°C.
 - 30 segundos de hibridación a 56°C.
 - 25 segundos de extensión a 72°C.
- 1 ciclo de 30 minutos de extensión final a 60°C.

Los resultados de la amplificaciones se comprobaron en un gel de agarosa antes de cargarlos en el secuenciador (Figura 3.4).

Figura 3.4: Gel al 1,2 % de agarosa que muestra los productos de una de las amplificaciones selectivas.



Para la separación de los productos amplificados se utilizó un secuenciador automático ABI/PRISM 310 (PE Biosystems) basado en electroforesis capilar. Los fluoróforos son excitados por un láser de forma que son detectados por un sistema de lectura, que permite detectar 4 fluoróforos diferentes en una única reacción. De esta manera, en cada reacción puede resolverse el producto de la amplificación de tres cebadores marcados con fluoróforos que emitan en distinta longitud de onda, más el fluoróforo correspondiente al patrón de pesos moleculares (ROX).

Las muestras se prepararon en 12 μ l de formamida, añadiendo 0,75 μ l de cada una de las reacciones de amplificación selectiva marcadas con FAM y HEX, 1,5 μ l de la marcada con NED (por la menor sensibilidad a este fluoróforo) y 0,5 μ l de marcador de peso molecular GeneScan-400HD marcado con el fluoróforo ROX que emite en el color rojo. Para la desnaturalización, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos, colocándolas inmediatamente en hielo y a continuación se cargaron en el secuenciador. Los fragmentos amplificados se visualizaron en forma de picos, cada uno correspondiente a un fragmento de ADN amplificado, mediante el programa de análisis GeneScan (v.3.1.2) (Figura 3.5). Estos picos se convirtieron en bandas utilizando el programa Genographer (v.1.6.0) (Benham *et al.*, 1999) (Figura 3.6).

Figura 3.5. Electroferograma en el que se observan los productos de amplificación de las 3 combinaciones de cebadores AFLP para una muestra. Cada color se corresponde con una combinación, marcada con un fluoróforo diferente. En rojo aparece el marcador de pesos moleculares.

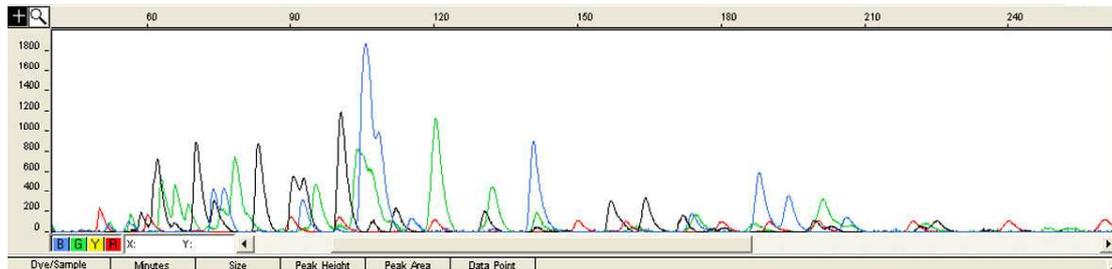
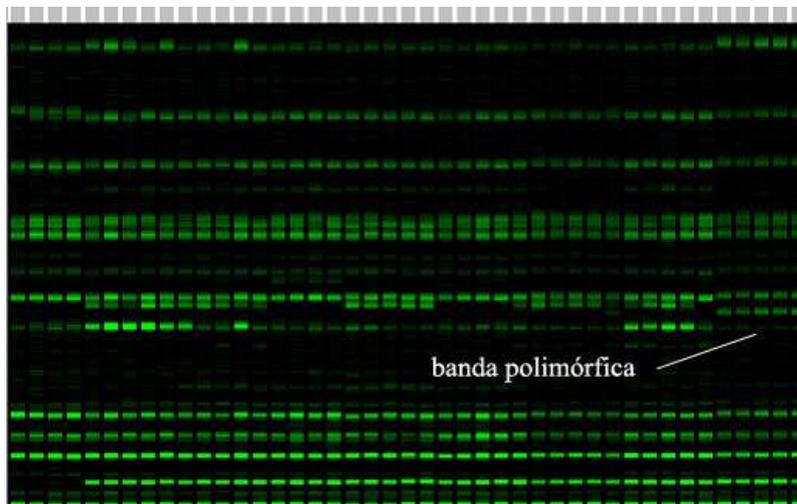


Figura 3.6. Imagen obtenida con el programa Genographer al importar los archivos GeneScan de las muestras analizadas cuya combinación de cebadores estaba marcada con HEX. Se señala una banda polimórfica.



3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las plantas germinadas se transplantaron a invernadero para confirmar el fenotipo proporcionado por los bancos turcos y corregir errores. Debido al reducido número de semillas y a la estación del año (otoño) no fue posible obtener fruto de todas las entradas, pero al menos se pudo caracterizar el ovario de las mismas. En melón la forma del fruto viene predeterminada desde el ovario, así que se pudieron detectar aquellas que, estando clasificadas como *flexuosus* no presentan este morfotipo. Puesto que la caracterización morfológica realizada ha sido solo parcial, los datos de interés se comentan en resultados y discusión, mientras que el resto de datos se incluirán en

anexos. En el marco del presente proyecto la caracterización morfológica de todas las entradas se llevará a cabo en Turquía.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los fragmentos amplificados con las 6 combinaciones de cebadores AFLP para cada una de las plantas de cada entrada se evaluaron según presencia (1) y ausencia (0) empleando el programa Genographer (v.1.6.0). A partir de la matriz de 1 y 0 se estimó el coeficiente de similitud de Dice (1945), $S_{ij}=2a/(2a+b+c)$, donde S_{ij} es la similitud entre dos individuos i y j , a es el número de bandas compartidas, b y c es el número de bandas amplificadas exclusivamente en i y j , respectivamente. Con las matrices de similitudes se realizó un análisis de coordenadas principales (ACP) responsables de la variación (NTSYSpc v.2.02). Estas matrices fueron empleadas para obtener matrices de similitudes utilizando el mismo coeficiente. Con ellas se realizó un análisis “cluster” empleando el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) y se obtuvo el árbol consenso utilizando el paquete PHYLIP (v.3.5c). Los dendrogramas se obtuvieron con el programa TreeViewPPC (v.1.6.6).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los AFLPs son marcadores altamente reproducibles. Sin embargo, cuando se trabaja con un elevado número de muestras es necesario distribuir las mismas en distintas placas de análisis. En nuestro caso, analizamos entre 2 y 3 plantas por genotipo, lo que supuso unas 150 muestras, que se repartieron en 2 placas. Cuando se analizaron los resultados conjuntamente se observó un “efecto placa”, es decir la separación de las entradas en función de la placa de origen. Este efecto es frecuente y puede tener su origen en variaciones ligeras, por ejemplo, en el sistema de detección. Cuando ocurre es mejor analizar por separado los resultados de las distintas placas, ya que si no podemos distorsionar los mismos. En cualquier caso, la distribución de muestras por placa se hizo de forma que todos los genotipos estuvieran representados en cada una de las placas.

4.1. GRADO DE POLIMORFISMO DETECTADO CON LOS MARCADORES AFLPS.

Los marcadores AFLPs fueron eficientes a la hora de detectar polimorfismo en la colección ensayada. Las distintas combinaciones detectaron un porcentaje de polimorfismos que varió entre el 53,3% y el 74,6% en la colección total (Tabla 1). El número total de bandas amplificadas fue de 889, siendo 593 el número de bandas polimórficas, observándose una variación de bandas para cada combinación entre 47 y 193. García-Mas *et al.* (2000) obtuvieron un 23,1% de polimorfismo total, siendo el número medio de bandas por combinación de 15. Este valor es mucho menor que el obtenido con nuestros datos, que es de 65% de polimorfismo total.

Combinación	N° bandas polimórficas amplificadas	% polimorfismo total	% polimorfismo <i>flexuosus</i> total	% polimorfismo <i>flexuosus</i> Turquía
<i>EcoRI</i> -ACA <i>MseI</i> -CA	47	74.6	68.3	57.1
<i>EcoRI</i> - AGG <i>MseI</i> -CA	48	53.3	52.2	47.8
<i>EcoRI</i> -ACG <i>MseI</i> -CA	193	73.4	71.9	66.9
<i>EcoRI</i> -ACC <i>MseI</i> -CA	80	66.7	55.8	46.7
<i>EcoRI</i> - AGC <i>MseI</i> -CA	51	56.7	43.3	41.1
<i>EcoRI</i> -AAC <i>MseI</i> -CA	174	66.2	59.3	57.4
TOTAL	593	65.1	58.5	52.8

Tabla 1: grado de polimorfismo

El grado de polimorfismo de los tipos *flexuosus* es bastante alto, siendo similar al grado de polimorfismo total para la mayoría de los marcadores. El grado de polimorfismo entre las entradas de *flexuosus* de Turquía fue también bastante elevado, variando entre el 41 y el 67%.

4.2. RELACION DE LAS ENTRADAS DE *FLEXUOSUS* CON EL RESTO DE GRUPOS BOTÁNICOS

Se empleó el coeficiente de similitud de Dice (1945) y el método UPGMA para construir un árbol con todas las entradas (Figuras 1 y 2).

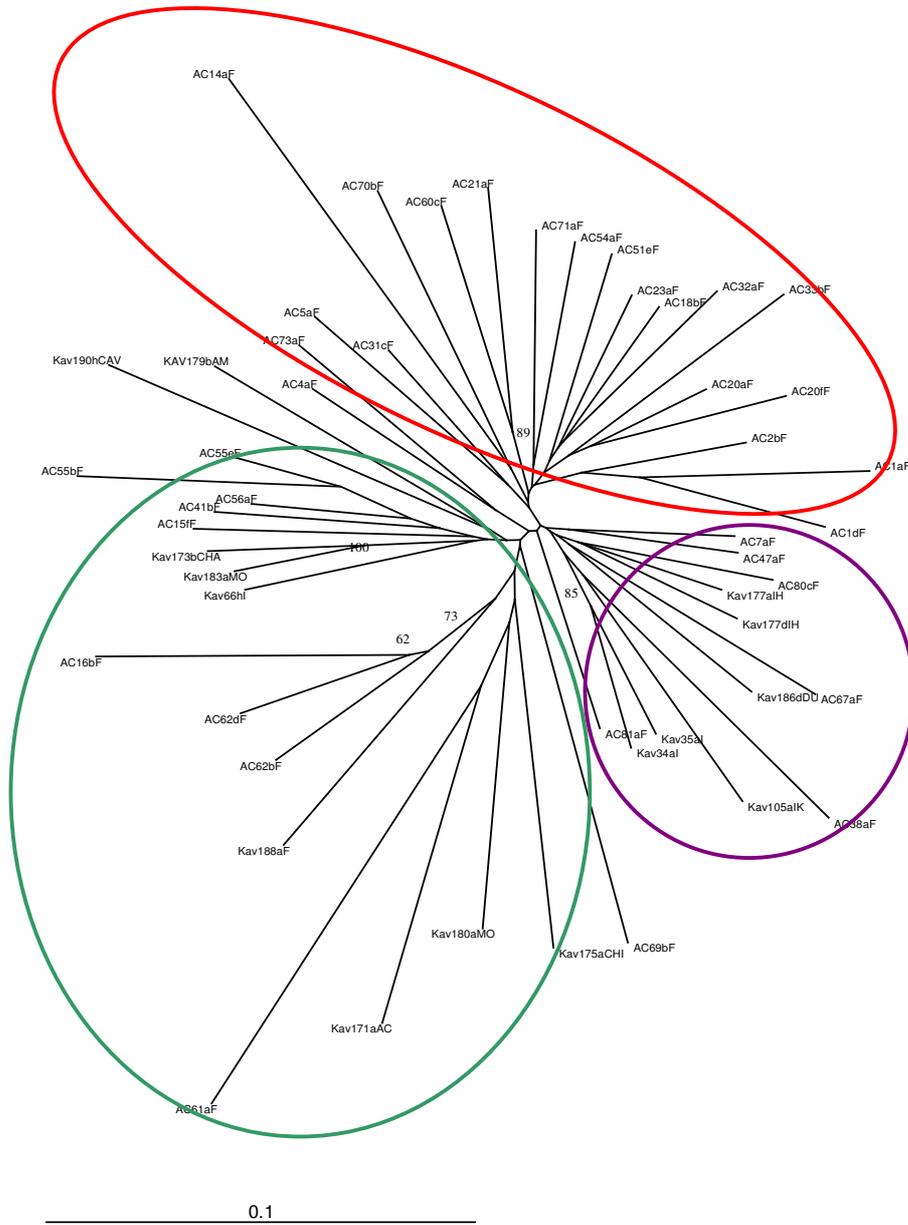


Figura 1: dendrograma (UPGMA) obtenido a partir de los datos AFLP para el ensayo con todas las entradas empleadas en la placa 1.

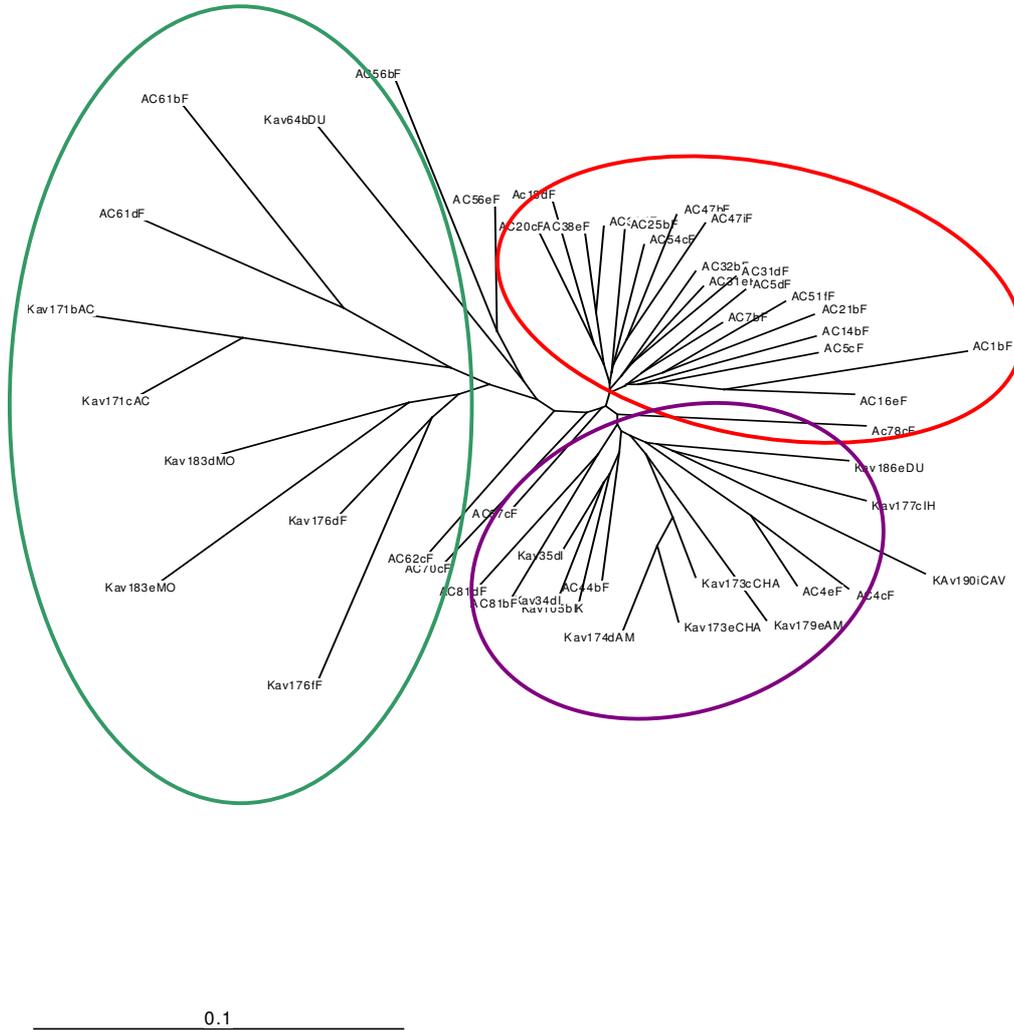


Figura 2: dendrograma (UPGMA) obtenido a partir de los datos AFLP para el ensayo de la placa 2.

Los resultados de ambas placas son consistentes, agrupando el conjunto de las entradas en 3 grupos. La mayoría de las entradas de *flexuosis* procedentes de Turquía se agrupan separadas del resto (en rojo en las figuras), mientras que la mayoría de las entradas de *flexuosis* de otros países aparecen entremezcladas con el resto de tipos. De las entradas turcas merece la pena destacar las entradas AC15, AC41, AC55, AC56 y

las entradas AC4 y AC44. Las primeras se parece molecularmente a los flexuosos de la India o Arabia Saudí (AC61, AC62, KAV188) u otras entradas de la India, pertenecientes a la subespecie *agrestis*, de tipo *momordica*, *acidulus* o *chito* (KAV171, KAV175, KAV176, KAV180, KAV183) que son bastante variables (en verde en las figuras). De hecho la entrada KAV176, clasificada originalmente como *flexuosus* en la caracterización morfológica ha resultado ser un tipo *momordica* (Figura 3).



Figura 3: arriba KAV176, abajo: KAV180, correspondiente a un tipo *momordica*

De éstas, la entrada AC15 no corresponde según la caracterización morfológica a un tipo *flexuosus*, podría tratarse de un tipo *acidulus*, lo que sería coherente con su clasificación molecular. Sin embargo, la entrada AC41 si que presenta características típicas de este grupo (Figura 4).

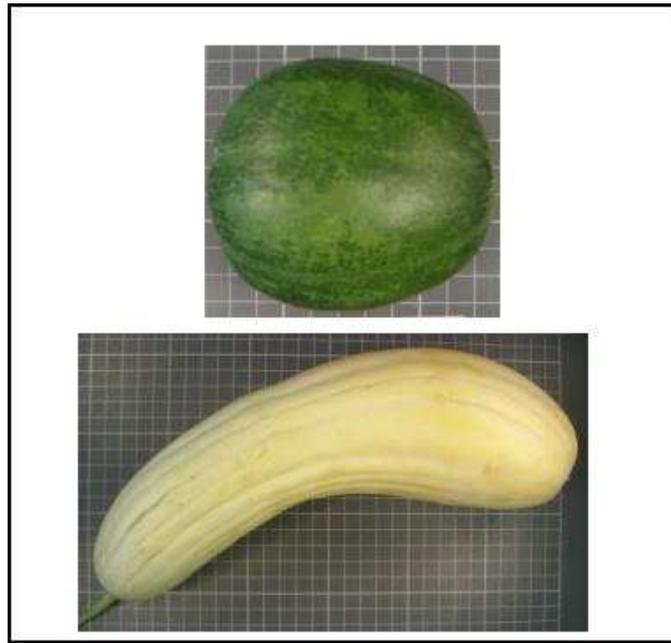


Figura 4: arriba AC15, abajo: AC41

Las segundas se agrupan de forma consistente con los tipos de la subespecie *melo*, *inodorus*, *cantalupensis*, *chandalack* o *ameri* (KAV34, KAV35, KAV105, KAV173, KAV174, KAV177, KAV179, KAV186, KAV190) (en morado en la figura). Este grupo está más cercano a los flexuosos de Turquía. En el caso de la entrada AC4 en la caracterización morfológica se ha podido comprobar que esta entrada no corresponde al tipo *flexuosus* (anexo 2). Presenta similitudes morfológicas con los tipos *adana* o *ameri*, similares a *chandalack* (figura 5). Esta entrada puede considerarse un error de clasificación. No así la entrada AC44 que si que se ajusta a la descripción morfológica del tipo *flexuosus*.

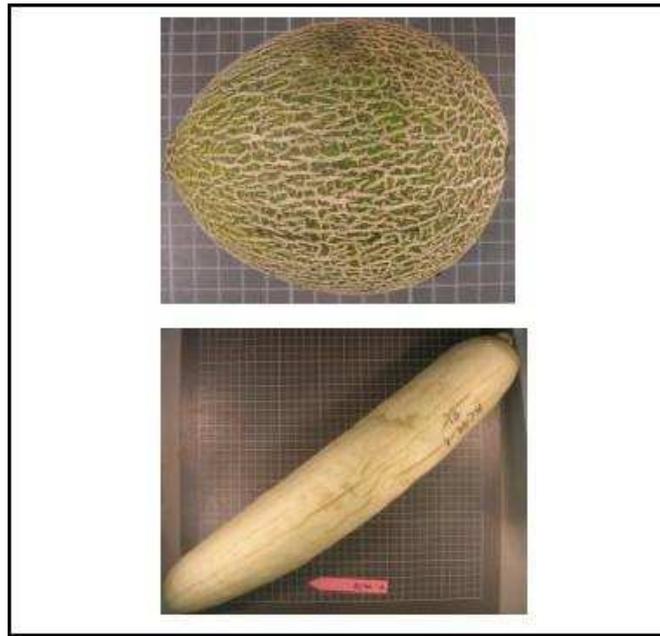


Figura 5: arriba AC4, abajo: AC44

Es destacable que algunas entradas de *flexuosus* de otros países, fundamentalmente de India y el Norte de África, presentan características diferenciales del resto (AC62, AC67, AC70). Estas entradas son en general más alargadas que el resto y aparece variación en características morfológicas como el color del fruto con respecto a las entradas de Turquía (Figura 6).

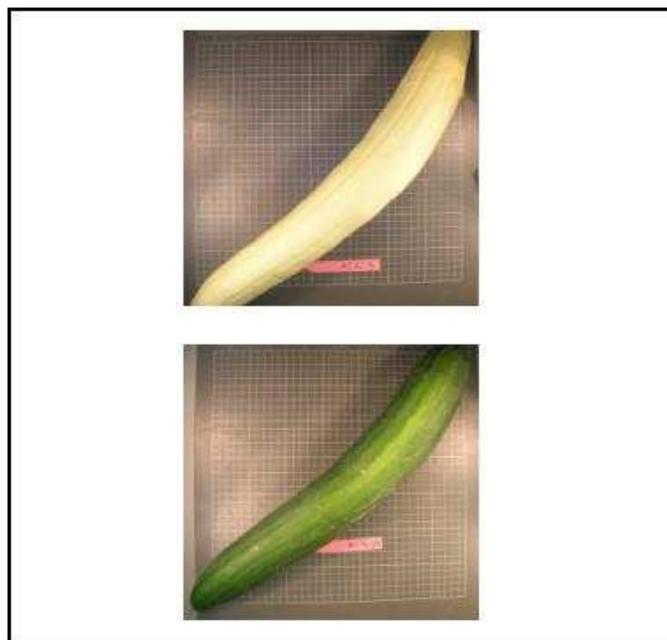


Figura 6: arriba AC62, abajo: AC70

Para una mejor interpretación de los resultados, se realizó un análisis de coordenadas principales con todas las entradas analizadas de los distintos grupos. La primera coordenada explicó un 10% y un 11,3% de la variación respectivamente en la placa 1 y 2, la segunda coordenada un 7% en ambas y la tercera un 5% y un 5,7% respectivamente (Figuras 7 y 8).

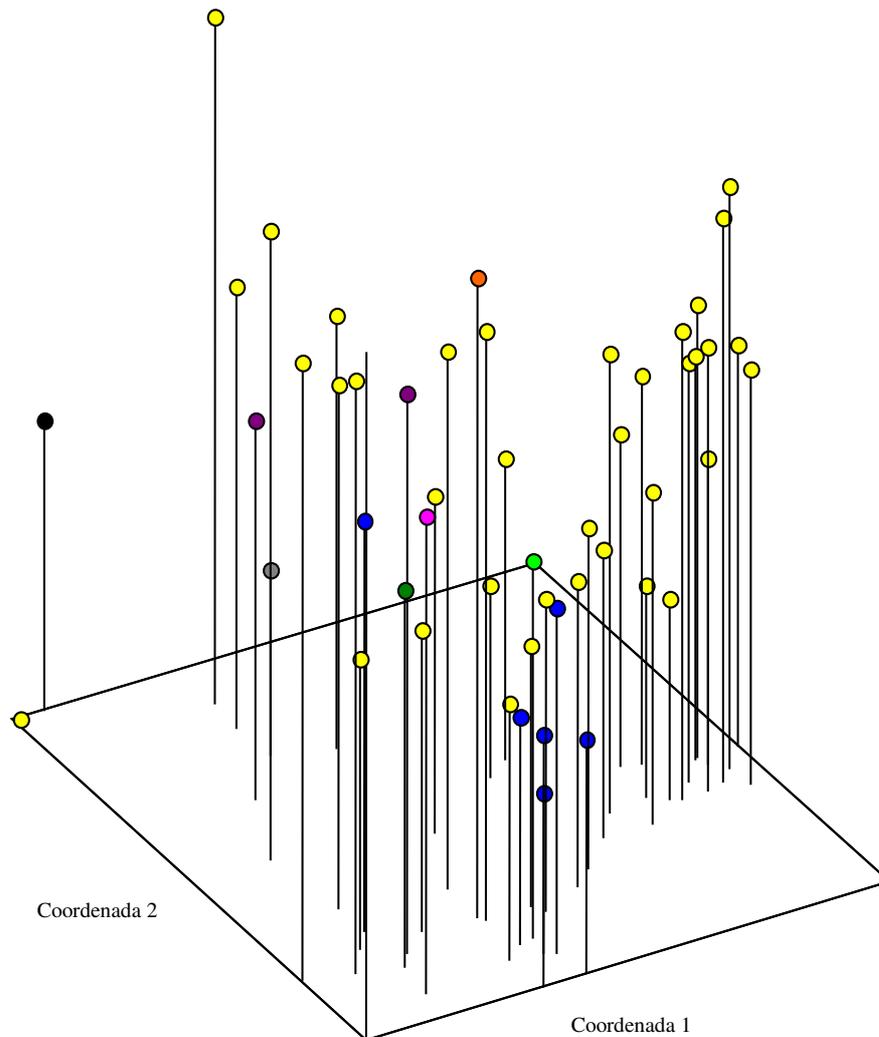


Figura 7: representación de todas las entradas de la placa 1 en las tres coordenadas principales obtenidas a partir de los resultados de los marcadores AFLP. (amarillo: *flexuosus*; negro: *acidulus*; morado: *momordica*; gris: *chito*; azul: *inodorus*; naranja: *cantalupensis*; verde oscuro: *ameri*; rosa: *chate*; verde claro: *dudaim*).

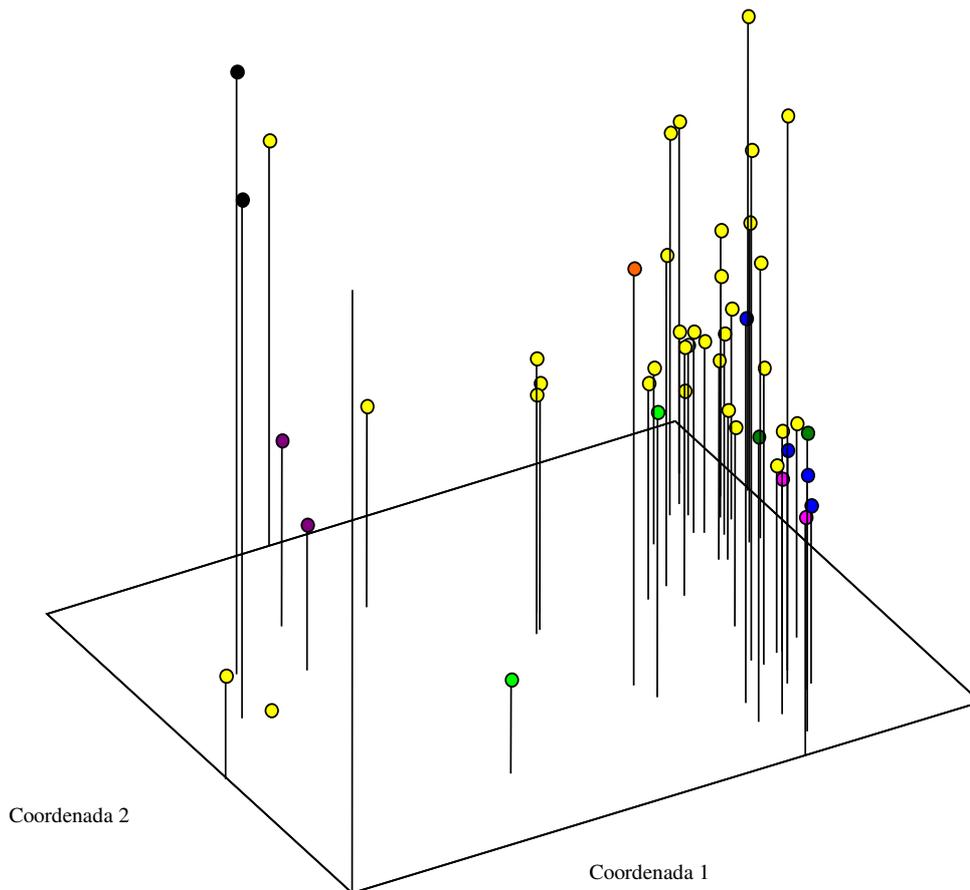


Figura 8: representación de todas las entradas de la placa 2 en las tres coordenadas principales obtenidas a partir de los resultados de los marcadores AFLP. (amarillo: *flexuosus*; negro: *acidulus*; morado: *momordica*; azul: *inodorus*; naranja: *cantalupensis*; verde oscuro: *ameri*; rosa: *chate*; verde claro: *dudaim*).

Los resultados de las coordenadas principales apoyan la división *agrestis/melo* señalada en la mayoría de los trabajos moleculares (Shattuck-Eidens *et al.* 1990; Neuhausen 1992; Baudracco-Arnas and Pitrat 1996; Katzir *et al.* 1996; Staub *et al.* 1997, 2000, 2004; Wang *et al.* 1997; Silberstein *et al.* 1999; Stepansky *et al.* 1999; Garcia-Mas *et al.* 2000; Danin-Poleg *et al.* 2001; Mliki *et al.* 2001; Decker-Walters *et al.* 2002; Lopez-Sese *et al.* 2002; Monforte *et al.* 2003; Zhuang *et al.* 2004; Esteras *et al.* 2009). Puesto que ambas placas dieron una clasificación similar se muestra el gráfico de las dos primeras coordenadas únicamente de la segunda placa, donde estas explican un mayor porcentaje de la variación (figura 9).

inodorus, *cantalupensis*, *ameri* y *chandalack*, pertenecientes a la subespecie *melo* (en rojo y morado). En la zona intermedia según la primera componente se agrupan 2 entradas de tipo *flexuosus* con la entrada KAV176 (en azul), que ya hemos comentado que aunque inicialmente esta clasificada como *flexuosus* es en realidad un tipo *momordica*. Las entradas de *flexuosus* son la AC62 de la india, y la entrada de Turquía AC56.

Estos resultados indican que entre la colección hay tipos *flexuosus* que difieren bastante del resto y presentan similitudes genéticas con tipos de otros grupos botánicos clasificados en la otra subespecie, como los tipos *momordica* o *acidulus* de la India, lo que es coherente con los resultados de Fanourakis *et al.*, (2000) y Staub *et al.*, (2004), que indican que existe afinidad molecular entre tipos *flexuosus* y tipos *conomon* del oeste de Asia, sugiriendo que algunas entradas turcas podrían tener origen a partir de entradas Indias. Esto reforzaría la idea de la India como el centro primario de diversidad mas importante de melón o incluso considerado centro de origen por algunos autores (Kocyan *et al.*, 2007).

En esta zona intermedia también aparecen los tipos *dudaim* (KAV64 y KAV186) (figura 10), lo que también está de acuerdo con los estudios previos llevados a cabo con este grupo botánico que lo sitúan en una situación intermedia entre las dos subespecies (Stepansky *et al.*, 1999; Esteras *et al.*, 2009; Pitrat *et al.*, 2008).



Figura 10: fruto de la entrada KAV186

La segunda componente separa las entradas de la subespecie *melo* en dos grupos. la mayoría de las entradas turcas aparecen agrupadas en la zona superior (en rojo) (Figura 11).

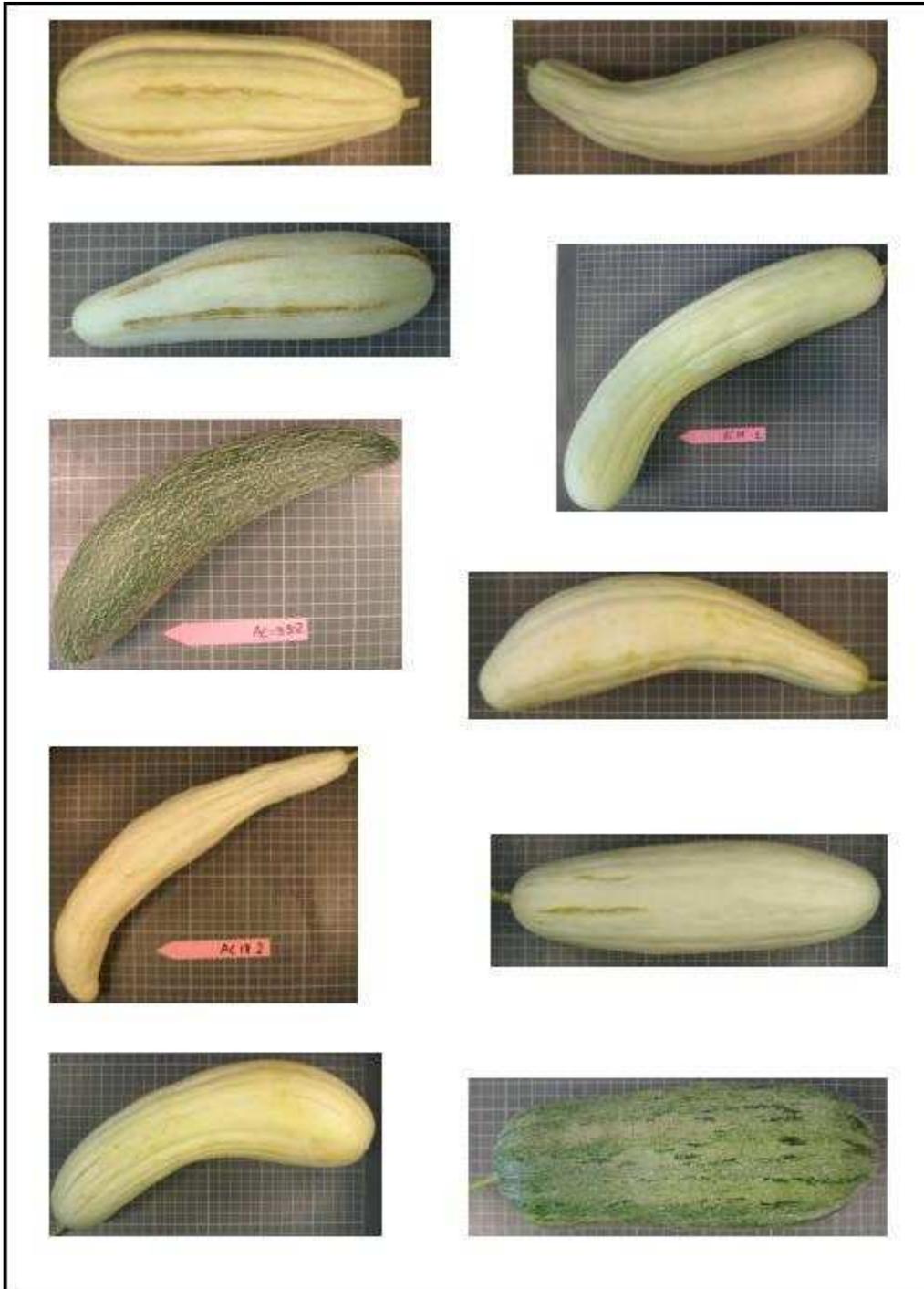


Figura 11:entradas de *Cucumis melo* var. *flexuosus* procedentes de Turquía.

En la parte inferior se agrupan las entradas pertenecientes a los tipos *inodorus*, *ameri*, *chate*, *momordica*, *chandalack* y *cantalupensis*. (figura 12) así como las entradas AC4, que previamente hemos considerado un error de clasificación, y las entradas AC44 y AC47, pertenecientes al tipo flexuosos.

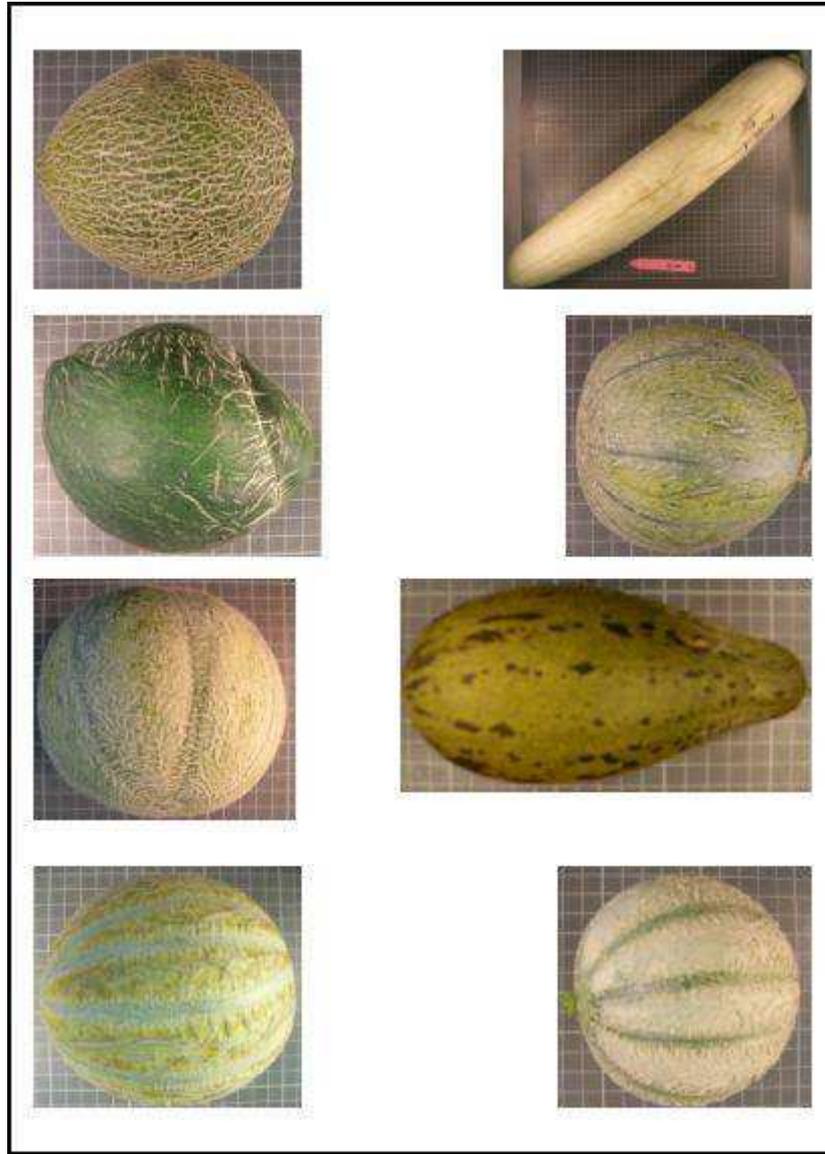


Figura 12: de arriba abajo y de izquierda a derecha: AC4, KAV35 (*inodorus*), KAV174 (*chandalak*), KAV186 (*dudaim*), AC44, KAV173 (*chate*), KAV185, KAV190 (*cantalupensis*)

Esto nos indica que también existe variación dentro de las entradas turcas. Las entradas citadas AC44 y AC47 presentan una gran similitud genética con la entrada AC81, un tipo *flexuosus* procedentes de Sudan (figura 13). En la zona intermedia se encuentran tipos *flexuosus* de otras zonas AC67, AC70 y AC78 del norte de África (Túnez y Egipto).

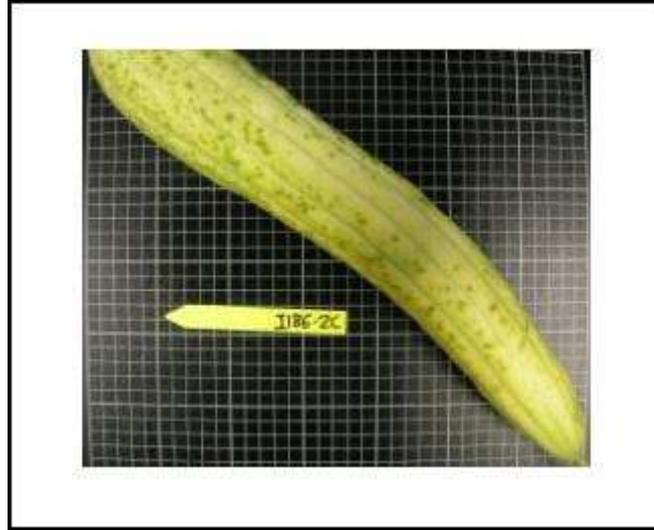


Figura 13: entrada AC81.

Por lo tanto se manifiesta la variación de las entradas de *flexuosus* en 3 grupos, uno relacionado con los grupos *agrestis* de la India, otro relacionado con tipos de la subespecie *melo*, del norte de África, la propia Turquía y otras zonas de Oriente medio (Irán) y el oeste de Asia (Rusia), y otro grupo diferenciado de melones turcos, lo que es coherente con la variabilidad encontrada en los melones turcos en estudios anteriores (Sensoy et al., 2007). Esta variación puede deberse tanto a un origen diverso de las distintas entradas como a un fenómeno de introgresión, debido a cruzamientos entre los distintos tipos. La inexistencia de barreras reproductivas dentro de la especie hace posible los cruces entre los diferentes grupos de cultivares, dando lugar a un modelo continuo de distribución.

4.3. DIVERSIDAD ENTRE LAS ENTRADAS DE *FLEXUOSUS*

Se repitió el análisis eliminando el resto de grupos botánicos y las entradas que no correspondían al tipo *flexuosus*. Los resultados del análisis cluster se muestran en las figuras 14 y 15.

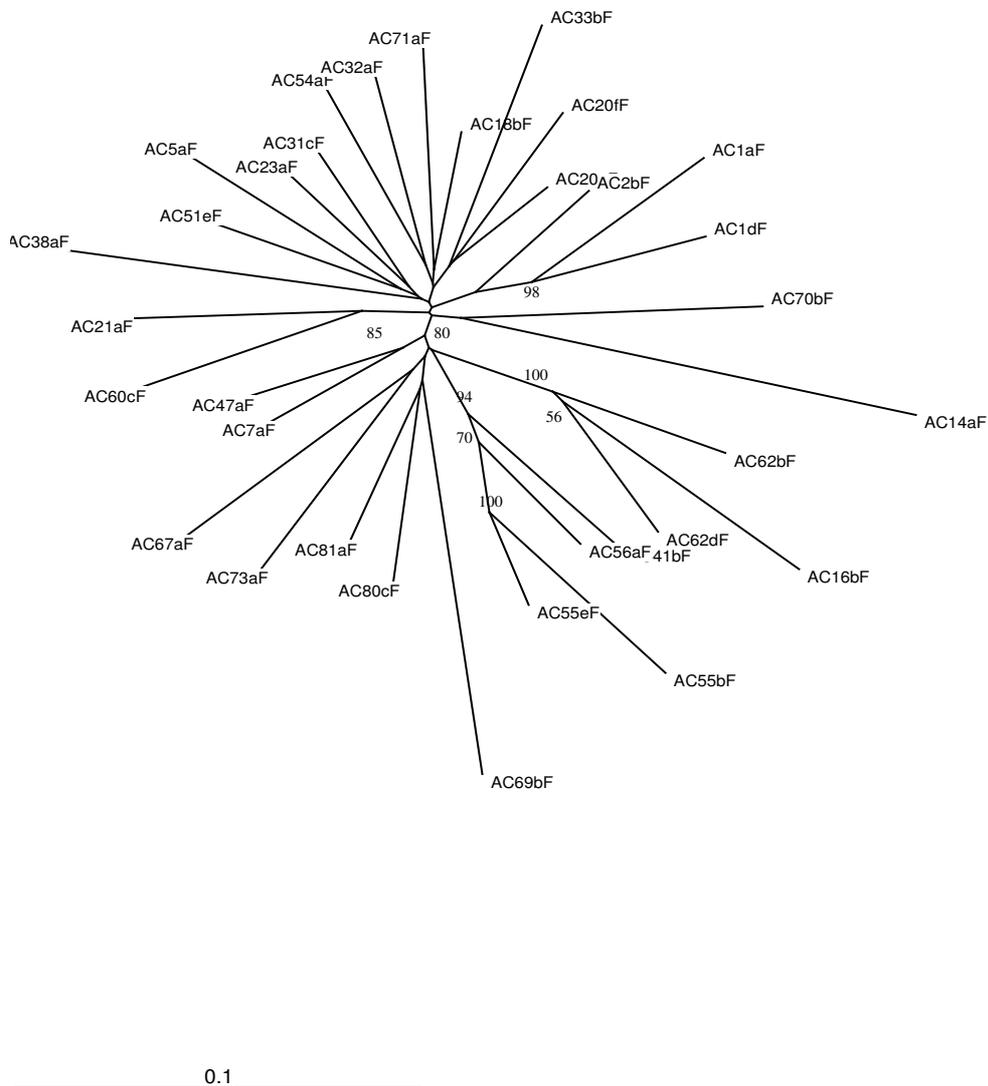


Figura 14: dendrograma (UPGMA) obtenido a partir de los datos AFLP para el ensayo con las entradas de *flexuosus* empleadas en la placa 1.

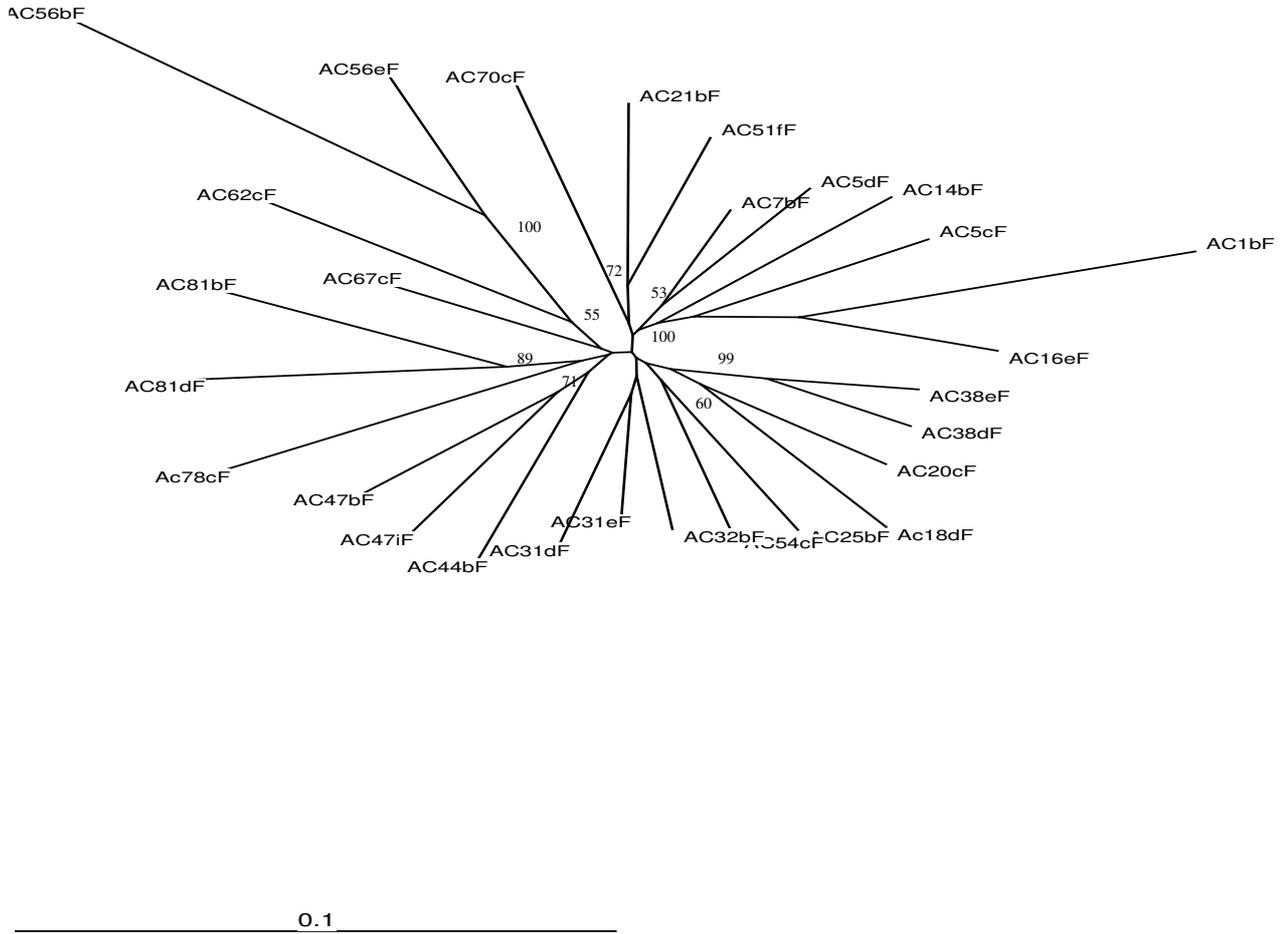


Figura 15: dendrograma (UPGMA) obtenido a partir de los datos AFLP para el ensayo con las entradas de *flexuosus* empleadas en la placa 2.

La primera coordenada explicó un 9,5% y un 10,7% de la variación respectivamente en la placa 1 y 2, la segunda coordenada un 7,3% y un 8,4% y la tercera un 6,4% y un 6,6% respectivamente. En las figuras 16 y 17 se representa la distribución de las distintas entradas en función de la primera y la segunda componente.

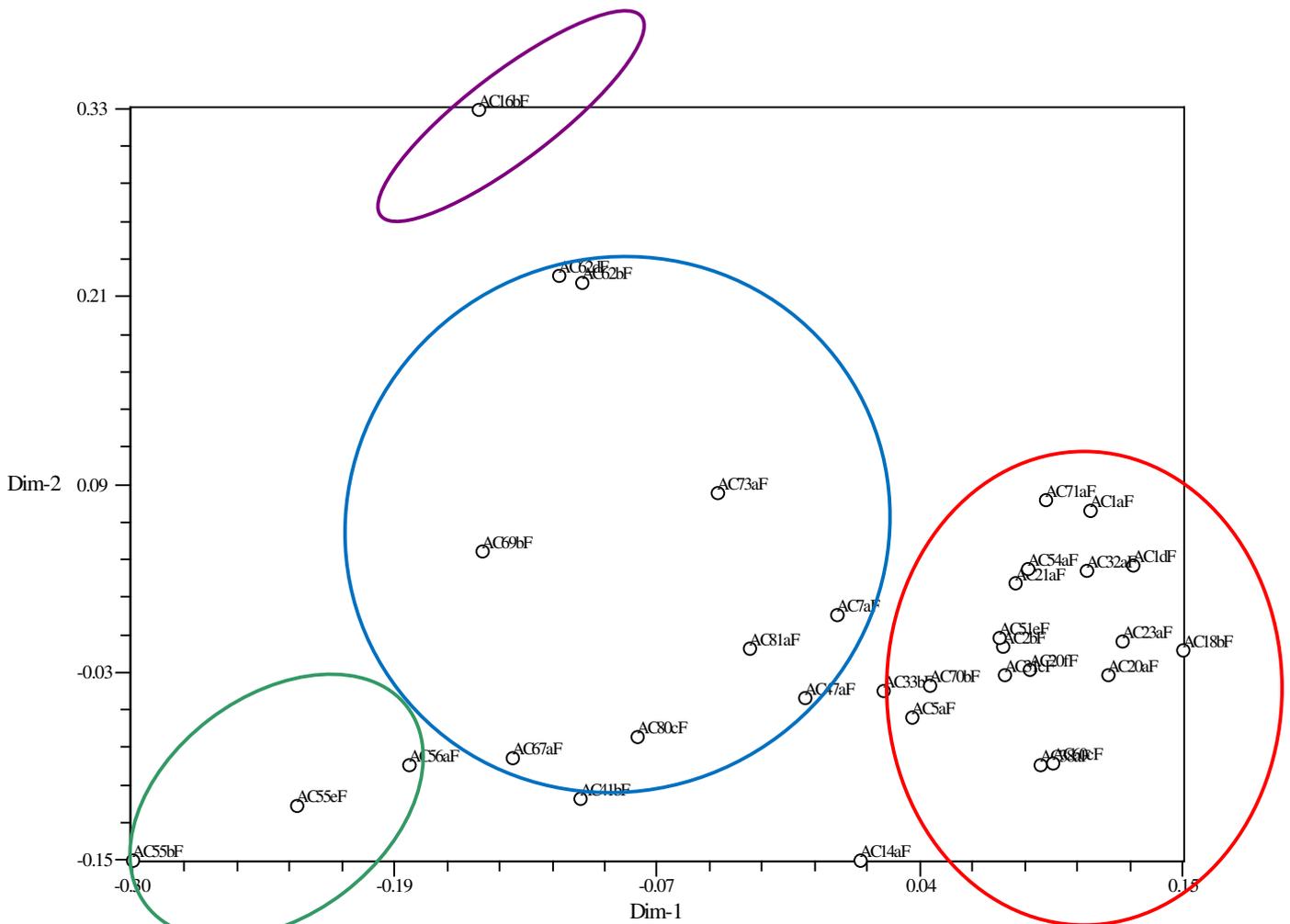


Figura 16: representación de las entradas de *flexuosus* empleadas en la placa 1, en las dos primeras coordenadas.

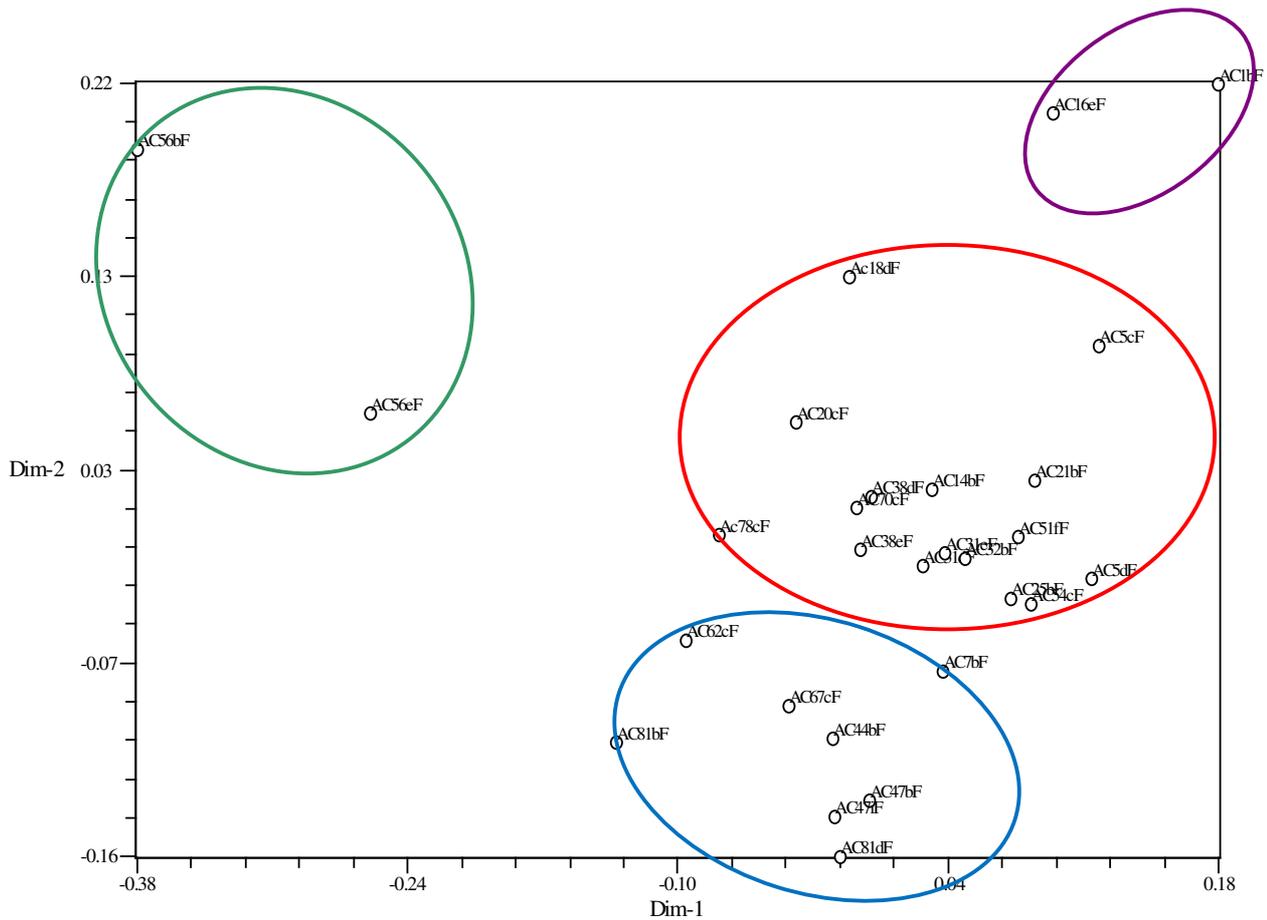


Figura 17: representación de las entradas de *flexuosus* empleadas en la placa 2, en las dos primeras coordenadas.

Aunque existen algunas diferencias, los aspectos más relevantes de la clasificación son consistentes en ambas placas. En relación con la primera componente aparecen como mas distanciados dos grupos de entradas (en rojo y en verde). El primer grupo (en rojo) representa la mayoría de entradas de Turquía, con las que se entremezclan las entradas AC70, AC71 y AC78. Las dos primeras proceden del Norte de África, Túnez y Siria, son similares, incluso reciben el mismo nombre local, Fakouss. La tercera es la entrada PI525133, procedente de Egipto. Según el banco del USDA se trata de una variedad local Egipcia colectada en Sawhaj.

En el otro extremo se encuentran las entradas AC55 y AC56. Se trata también de entradas Turcas que, como se ha comentado anteriormente, presentan similitud genética con tipos indios *momordica* o *acidulus*. No se ha podido obtener fruto de ninguna de estas dos entradas, pero si se caracterizó la planta y la flor de la AC55 (figura 18) y

presenta el ovario alargado típico de los tipos *flexuosus*. En cualquier caso se comprobará con la caracterización morfológica llevada a cabo en el banco turco.



Figura 18: flor de la entrada AC55

En la zona intermedia entre ambos grupos se distribuyen algunas entradas turcas, más variables, entremezcladas con otras de otras zonas. Se trata de las entradas AC7, AC41, AC44 y AC47, siendo las 3 últimas procedentes del banco de Izmir. En este caso se dispone de caracterización morfológica y las entradas corresponden a tipos *flexuosus*. Anteriormente se habían destacado éstas por su similitud a tipos *momordica* y *acidulus* y a tipos de la subespecie *melo* (diferentes grupos botánicos) y *flexuosus* de otros países. De hecho, en este grupo se incluyen la mayoría de las entradas de la India y el Norte de África, AC 62, AC67, AC69, AC73, AC80 y AC81 (India, Siria, Libia, Túnez, Sudan y Egipto).

Por último, con respecto a la segunda componente aparece separada la entrada AC16, procedente de Adana (figura 19).



Figura 19: caracterización de la entrada AC16.

Los resultados mostrados sugieren que la variación en las entradas de *flexuosus* de Turquía es elevada y superior a la de los países representados como controles. La variación incluida en el análisis de la India y del Norte de África se encuentra representada en las entradas Turcas. Además, existen algunas entradas de Turquía que se alejan molecularmente de cualquiera del resto de las entradas. Estos resultados apoyan la idea de que Turquía es un centro de diversificación de este grupo botánico. Se ha propuesto a Oriente Medio como zona de origen del grupo (Sensory et al., 2007). Nuestros resultados no contradicen esta idea aunque sería necesario tener una mejor representación de otros países de la zona como Irán o Irak, donde posiblemente exista una mayor diversidad genética (Pitrat, 2008).

Los resultados del presente trabajo se completarán con la caracterización morfológica completa realizada por la Universidad de Çukurova y se compararan con un análisis con marcadores RAPDs realizado en el mismo conjunto de entradas

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los marcadores AFLPs han permitido detectar polimorfismo en la colección de melón y estudiar la diversidad genética de la colección de tipos *flexuosus* de Turquía

La caracterización morfológica, por una parte, y la caracterización molecular, por otra, nos ha permitido detectar errores en la clasificación de algunos tipos referidos como *flexuosus* en los bancos de germoplasma turcos. Esta reclasificación facilitara el manejo de estas entradas

En general, los tipos *flexuosus* analizados se estructuran en 3 grupos, uno relacionado con los grupos *agrestis* de la India, otro relacionado con tipos de la subespecie *melo*, del norte de África, la propia Turquía y otras zonas de Oriente medio (Irán) y el oeste de Asia (Rusia), y otro grupo diferenciado de melones turcos, lo que es coherente con la variabilidad encontrada en los melones turcos en estudios anteriores.

El hecho de que existan tipos *flexuosus* que difieren bastante del resto y presentan similitudes genéticas con tipos de otros grupos botánicos, clasificados en la subespecie *agrestis*, como los tipos *momordica* o *acidulus* de la India, es coherente con estudios anteriores, que indican que existe afinidad molecular entre tipos *flexuosus* y tipos *conomon* del oeste de Asia. India es un centro primario de diversidad del melón, a veces apuntado como centro de origen, y muchos de los grupos botánicos desarrollados en distintas áreas podrían derivar de tipos ancestrales de esta zona.

Oriente Medio es una zona de variación para los tipos de la subespecie *melo* pertenecientes a los grupos botánicos *inodorus*, *ameri*, *chate*, *chandalack* y *cantalupensis*. La proximidad genética encontrada entre algunos tipos *flexuosus* y estos grupos botánicos puede deberse tanto a un origen diverso de las distintas entradas como a un fenómeno de introgresión, debido a cruzamientos entre los distintos tipos. La inexistencia de barreras reproductivas dentro de la especie hace posible los cruces entre los diferentes grupos de cultivares, dando lugar a un modelo continuo de distribución.

La variación en las entradas de *flexuosus* de Turquía es elevada y superior a la de los países representados como controles. La variación incluida en el análisis de la India y del Norte de África se encuentra representada en las entradas Turcas. Además, existen

algunas entradas de Turquía que se alejan molecularmente de cualquiera del resto de las entradas. Estos resultados apoyan la idea de que Turquía es un centro de diversificación de este grupo botánico. Se ha propuesto a Oriente Medio como zona de origen del grupo. Nuestros resultados no contradicen esta idea aunque sería necesario tener una mejor representación de otros países de la zona como Irán o Irak, donde posiblemente exista una mayor diversidad genética.

Los resultados del presente trabajo se completarán con la caracterización morfológica completa realizada por la Universidad de Çukurova y se compararan con un análisis con marcadores RAPDs realizado en el mismo conjunto de entradas

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

AARI, 29-10-2009: <http://www.etae.gov.tr>

Abak, K.; Sensoy, S. y Büyükalaca, S. (2007) Evaluation of genetic diversity in Turkish melons (*Cucumis melo* L.) based on phenotypic characters and RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol* (2007) 54: 1351-1365.

Akashi, Y.; Fukunda, N.; Wako, T.; Masuda, M. y Kato, K. (2002) Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melons, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes. *Euphytica* 125, 385-396.

Badenes, M.L. y Parfitt, D.E. (1998) Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *FAO-Nucis-Newsletter*. 7:25-26.

Baudracco-Arnas, S. y Pitrat, M. (1996) A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theor Appl Genet* 96:57-64.

Benham, J.; Jeung, J.U.; Jasieniuk, M.; Kanazin, V. y Blake, T. (1999) Genographer: a graphical tool for automated Fluorescent AFLP and Microsatellite analysis. Department of Plant Science. Montana State University. Bozeman. EEUU.

Besirli, G. y Yanmaz, R. (1999) Types of the Snake Cucumber (*Cucumis melo* var *flexuosus* Naud.) Grown in the South East region of Turkey. *Acta hort. (ISHS)* 492:37-40.

Cansian, R.L. y Echeverrigaray, S. (2000). Discrimination among cultivars of cabbage using randomly amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* 35(6):1155-1158.

Chiba, N.; Suwabe, K.; Numone, T. y Hirai, M. (2003) Development of microsatellite markers in melon (*C. melo* L.) and their application to major cucurbit crops. *Breeding Science* 53: 21-27.

- Danin-Poleg, Y.; Reis, N.; Tzuri, G. y Katzir, N. (2001) Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor Appl Genet* 102:61–72.
- Decker-Walters, D.S.; Chung, S.M.; Staub, J.E.; Quemada, H.D. y Lopez-Sese, A.I. (2002) The origin and genetic affinities of wild populations of melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae) in North America. *Plant Syst Evol* 233:183–197.
- Deleu, W.; Esteras, C.; Roig, C.; González-Tol, M.; Fernández-Silva, I.; González-Ibeas, D.; Blanca, J.; Aranda, M.A.; Arús, P.; Nuez, F.; Monforte, A.J.; Picó, M.B. y García-Mas, J. (2009) A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. *BMC Plant Biology*, 9:90.
- Dice, L.R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Esquinas-Alcazar, J.T. (1981) Allozyme variation and relationships among Spanish landraces of *Cucumis melo* L. *Kulturpflanze* 22: 337-352.
- Esteras, C.; Lunn, J.; Sulpice, R.; Blanca, J.; Garcia-Mas, J.; Pitrat, M.; Nuez, F. y Picó, B. (2009). Phenotyping a highly diverse core melon collection to be screened using Ecotilling. PÓSTER CONGRESO LISBOA, 2009.
- Ezura, H. y Owino, W. O. (2008) Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. *Plant Science* 175 121-129.
- Fanourakis, N.; Tsekoura, Z. y Nanou, E. (2000) Morphological characteristics and powdery mildew resistance of *Cucumis melo* landraces in Greece. N. Katzir & H.S. Paris (Eds.), *Proc Cucurbitaceae 2000*. *Acta Hort* 510: 241–245.
- Fantaccione, S.; Woodrow, P. y Pontecorvo, G. (2008). Molecular authentication of three Italian melon accessions by ARMS-PCR and ITS1 (internal transcribed spacer 1) secondary structure prediction. *Bioinformatics* 2(7): 311-315.

F.A.O.S.T.A.T., 29-10-2009. <http://faostat.fao.org>

Fernandez-Silva, I.; Eduardo, I.; Blanca, J.; Esteras, C.; Picó, B.; Nuez, F.; Arús, P.; Garcia-Mas, J. y Monforte, A. J. (2008) Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.) Theor Appl Genet (2008) 118:139–150.

Ferriol, M.; Picó, B. y Nuez, F. (200). ECP/GR Vegetables Network: Ad hoc meeting on *Cucurbitaceae*. IPGRI Newsletter for Europe 23:3.

Garcia, E.; Jamilena, M.; Alvarez, J. I.; Arnedo, T.; Oliver, J. L. y Lozano, R. (1998) Genetic relationships among melon breeding lines revealed by DNA markers and agronomic traits. Theor. Appl. Genet. 96, 878-885.

Garcia-Mas, J.; Oliver, M.; Gomez-Paniagua, H. y de Vicente, M.C. (2000) Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. Theor Appl Genet 101:860–864.

Gilbert, J.E.; Lewis, R.V.; Wilkinson, M.J. y Cagliari, P.D.S. (1999) Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in germplasm collection. Theor Appl Genet 98:1225-1131.

González-Ibeas, D.; Blanca, J.; Roig, C.; González-To, M.; Picó, B.; Truniger, V.; Gómez, P.; Deleu, W.; Caño-Delgado, A.; Arús, P.; Nuez, F.; Garcia-Mas, J.; Puigdomènech, P. y Aranda, M.A. (2007) MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. BMC Genomics. 8: 306.

Günay, A. (1993) Vegetable production V. A.Ü. Ziraat Fak. Ankara. 117 s. (in Turkish).

Harlan, J.R. (1951) Anatomy of gene centres. Amer Natur 85: 97-103.

I.C.U.G.I., 29-10-2009: www.icugi.org

Jeffrey, C. (1990) Systematics of the *Cucurbitaceae*: an overview. En: Bates, D.M.; Robinson, R. W. y Jeffrey, C. (eds.) Biology and Utilization of the *Cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, Nueva Yrk: 3-9.

Jeffrey, C. (2001) Cucurbitaceae. Hanelt P and institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (eds) Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops. Springer, New York, NY, USA.

Jeffrey C. (2005) A new system of Cucurbitaceae. *Bot Zhurn*, 90:332-335.

Katzir, N.; Danin-Poleg, Y.; Tzuri, G.; Karchi, Z.; Lavi, U. y Cregon, P.B. (1996). Length polymorphisms and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor Appl Genet* 93: 1282-1290.

Kirkbride, J.H.(1993) Biosystematic Monograph of the Genus *Cucumis* (*Cucurbitaceae*). Parkway publishers, Boone (NC,US).

Kocyan, A.; Zhang, L. B.; Schaeffer, H. y Renner, S. S. (2007) A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. *Mol. Phyl. and Evol.* 44: 553-577.

Küçük, A.; Abak, K. y Sari, N. (2002) Cucurbit genetic resources collections in Turkey. First AD HOC Meeting on Cucurbit Genetic Resources, Adana, turkey.46-51 19 January 2002.

Lee, M. (1995) DNA markers and plant breeding programs. *Adv Agron* 55: 265-344.

Li, G. y Quiros, C.F. (2000) Use of amplified fragment length polymorphism markers for celery cultivar identification. *HortScience* 35(4):726-728.

Lopez-Sese, A.I.; Staub, J.; Katzir, N. y Gomez-Guillamon, M.L. (2002) Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. *Euphytica* 127:41-51.

López-Sesé, I.A.; Staub, J.E. y Gómez-Guillamón, M.L.(2003) Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theor. Appl. Genet.* 108:41-52.

M.A.P.A, 29-10-2009: <http://www.marm.es>

Meglic, V. y Staub, J.E. (1996) Inheritance and linkage relationships of isozyme and morphological loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.) Theor Appl Genet 83: 379-384.

MELOGEN, 29-10-2009: <http://www.melogen.upv.es>

Mliki, A.; Staub, J.E.; Zhangyong, S. y Ghorbel, A. (2001) Genetic diversity in melon (*Cucumis melo* L.): an evaluation of African germplasm. Genet Resour Crop Evol 48:587–597.

Monforte, A.J.; García-Mas, J y Arus, P. (2003) Genetic variability in melon based on microsatellite variation. Plant breeding 122:153-157.

Morales, M.; Roig, E.; Monforte, A. J.; Arús, P. y Garcia-Mas, J. (2004) Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.). Genome 47: 352–360.

Neuhausen, S.L. (1992) Evaluation of restriction fragment length polymorphism in *Cucumis melo* L. Theor Appl Genet 83:379-384.

Nuez, F.; Díez, M.J. y Picó, B. (2002) Cucurbit Genetic Resources in Europe. *Ad hoc* meeting, 19 January, Adana, Turkey.

Park, Y.H.; Sensoy, S.; Wye, C.; Antonise, R.; Peleman, J. y Havey, M.J. (2000) A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to Papaya Ringspot and Zucchini Yellow Mosaic Viruses. Genome 43: 1003-1010.

Perl-Treves, R.; Zamir, D.; Navot, N. y Galun, E. (1985) Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. Theor Appl Genet. 71: 430-436.

Pitrat, M.; Chauvet, M. y Foury, C. (1999) Diversity, history and production of cultivated cucurbits. In: Abak K, Büyükalaca S (eds) Proc. 1Int.

Pitrat, M. (2008). Melon (*Cucumis melo* L.) In Handbook of Crop Breeding (Prohens J and Nuez F. Eds.) Vol I. Vegetables. Springer New York. 283-315.

Rafalsky, J.A. y Tingey, S.W. (1993) Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites, and machines. Trends Genet 9 (8): 275-280.

Ritschel, P.S.; Lins, T.C.L.; Tristan, R.L.; Buso, G.S.C.; Buso, J.A. y Ferreira, M.E. (2004) Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). BMC Plant Biol 4:9.

Robinson, R.W. y Decker-Walters, D.S.(1997) Cucurbits. Crops production science in horticulture. Cab International,226 pp.

Sari, N.; Kose, M.T.; Aka-Kacar, Y. y Solmaz, I. (2006) Genetic and morphological characterization of Turkey Snake melon. Çukurova University Research Project unit. (Project number: ZF2006YL71), Adana (TR).

Sensoy, S.; Buyukalaca, S. y Abak, K. (2007) Evaluation of genetic diversity in Turkish melons (*Cucumis melo* L.) based on phenotypic characters and RAPD markers. Genet Res Crop Evol 54:1351–1365.

Shattuck-Eidens, D.M.; Bell, R.N.; Neuhausen, S.L. y Helentjaris, T. (1990) DNA sequence variation within maize and melon: observation from polymerase chain reaction amplification and direct sequencing. Genetics 126: 207-217.

Silberstein, L.; Kovalski, I.; Huang, R.; Anagnostou, K.; Jahn, M.M.K. y Perl-Treves, R. (1999) Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers. Sci Hortic 79:101–111.

Staub, J.E.; Box, J.; Meglic, V.; Horejsi, T. y Mc Creight, J.D. (1997) Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining intraespecific variation in *Cucumis*. Genet Resour Crop Evol 44:257–269.

Staub, J.E.; Danin-Poleg, Y.; Fazio, G.; Horejsi, T.; Reis, N. y Katzir, N. (2000) Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. Euphytica 115:225–241.

Staub, J.E.; Lopez-Sese, A.I. y Fanourakis, N. (2004) Diversity among melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Greece and their genetic relationships with other melon germplasm of diverse origins. Euphytica 136:151–166.

Stepansky, A.; Kovalski, I. y Perl-Treves, R. (1999) Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. Plant Syst Evol 217:313–332.

Turkish Statistical Institute, 29-10-2009 <http://www.tuik.gov.tr>

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van der Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.

Wang, Y.H.; Thomas, C.E. y Dean, R.A. (1997) A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theor Appl Genet 95:791-798.

Waugh, R. y Powell, W. (1992) Using RAPD markers for crop improvement. TIBTECH 10:186-191.

Winter, P. y Kahl, G. (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. World J. Microbiol Biotech 11: 438-448.

Zhuang, F.Y.; Chen, J.F.; Staub, J.E. y Qian, C.T. (2004) Assessment of genetic relationships among *Cucumis* ssp. By SSR and RAPD marker analysis. Plant Breed 123:167–172.

Zhukovsky, P. (1951) Agricultural Structure of Turkey (Anatolia). Türkiye şeker Fab. Aş. (1951) Yay. No: 20. 887 p. (in Turkish).

ANEXOS

ANEXO 1.

Caracterización morfológica de los frutos obtenidos en campo.

Se ha medido:

- | | |
|--------------------------------------|---|
| -peso | -presencia o ausencia de la capa de abscisión |
| -longitud | -color de la carne |
| -anchura | -espesor de la carne |
| -forma | -espesor de la corteza |
| -presencia o ausencia de acostillado | -sólidos solubles |
| -contraste de color del acostillado | -firmeza |
| -color en la madurez | -color semillas |
| -dibujo | -tamaño semillas |
| -color del dibujo | -aroma externo |
| -textura | -aroma interno |
| -intensidad del reticulado | -número de carpelos |
| -densidad del reticulado | |

GENOTIPO	PLANTA	FRUTO	PESO	LONGITUD (mm)	ANCHURA (mm)	FORMA	ACOSTILLADO	CONTRASTE ACOSTILL.	COLOR MADUREZ	DIBUJO	COLOR DIBUJO	TEXTURA	INTENSIDAD RETICULADO
AC1	1		660	123	88	1	0	0	2	1	1	1	0
AC2	1		654	130	104	1	0	0	2	1	1	1	0
AC2	2		347	293	65	4	0	0	1	1	1	1	0
AC4	1		420	92	70	3	0	0	3	1	2	2	1
AC4	2		509	111	94	3	0	0	3	3	2	2	1
AC14	1		1292	410	86	1	0	0	2	4	2	1	0
AC15	1		224	76	73	2	0	0	3	2	2	4	0
AC15	3		590	126	101	3	0	0	3	2	2	2	1
AC16	2		534	223	69	1	0	0	2	4	2	1	0
AC18	2		213	307	50	1	0	0	1	1	2	1	0
AC20	1		479	272	70	1	0	0	4	4	1	1	0
AC21	2		1027	237	104	3	0	0	2	1, 2	2.3	3	0
AC32	5		386	236	53	1	0	0	2	4	2	3	0
AC33	2		319	281	64	1	0	0	3	1	2	2	1
AC33	4	A	602	226	70	1	0	0	3	3	1	3	0
AC33	4	B	450	223	59	1	0	0	3	1	1	4	0
AC41	2		943	279	74	1	0	0	5	4	1	1	0
AC44	1		809	516	96	6	0	0	1	1	2	3	0
AC44	2		1705	293	115	1	0	0	1	1	2	3	0
AC54	2		928	262	82	1	0	0	1	1	1	3	0
AC62	?		1133	553	81	6	0	0	1	1	2	3	0
AC62	1		255	278	42	1	0	0	1	4, 2	2	3	0
AC62	2		124	183	40	1	0	0	1	0	0	3	0
AC63	3		751	550	53	6	0	0	5	4	1	1	0
AC69	1		1026	146	107	3	0	0	2	3,6	1.3	2	1
AC70	1	A	1216	512	78	6	0	0	3	1	2	3	0
AC70	1	B	1410	591	88	6	0	0	2	2	2	1	0
AC70	1	C	643	386	68	1	0	0	3	3	1	3	0
AC70	2		707	321	84	1	0	0	2	4	2	3	0
AC80	1		962	212	109	3	0	0	5	1	2	4	0
AC82	2	A	447	450	60	1	0	0	3	5	1	1	0
AC82	2	B	177	223	37	1	0	0	2	0	0	3	0
KAV35	4		522	117	104	3	0	0	2	2	1	2	1
KAV173	3		388	89	88	2	0	0	2	1, 5	1.2	2	1

GENOTIPO	PLANTA	FRUTO	PESO	LONGITUD (mm)	ANCHURA (mm)	FORMA	ACOSTILLADO	CONTRASTE ACOSTILL.	COLOR MADUREZ	DIBUJO	COLOR DIBUJO	TEXTURA	INTENSIDAD RETICULADO
KAV174	2	A	318	86	100	2	1	2	5	5, 5	2.4	4	0
KAV174	2	B	481	103	111	5	1	1	2	3, 5	2.4	2	1
KAV181	1		514	179	75	3	0	0	3	1	2	4	0
KAV 185	2		373	156	88	4	0	0	3	2, 3	1	4	0
KAV 186			567	108	96	5	0	0	6	7, 2	3	2	1
KAV186	2		660	121	102	5	1	1	7	3, 2	1	2	1
KAV190	8		304	76	85	2	1	1	6	3	4	2	1
KAV190	9		375	85	90	5	1	2	2	4	2	2	2

Forma: alargado:1, aplanada:2, ovalada:3, forma de pera:4, redondo: 5, muy alargado:6//**Acostillado:** ausente:0, superficial:1//**Contraste acostillado:** ausente:0, ligero:1, medio:2//**Color dibujo:** uniforme:0, blanco:1, verde:2, amarillo:3, crema:4, gris: 5, marrón:6, naranja: 7//**Diseño:** uniforme:0, puntitos:, puntos:2, manchas: 3, bandas: 4//**Color fruto:** crema:1, verde:2, verde oscuro:3, blanco:4, amarillo:5, gris:6, naranja-ocre:7// **Textura:** finamente arrugado:1, reticulado:2, ligeramente ondulado:3, liso:4//**Reticulado:** ausente:0, fino:1, medio:2//

GENOTIPO	DENSIDAD RETICULADO	ABCISIÓN	COLOR CARNE	ESPESOR CARNE (mm)	ESPESOR CORTEZA	SÓLIDOS SOLUBLES	FIRMEZA	COLOR SEMILLAS	TAMAÑO SEMILLAS	AROMA EXT	AROMA INT	Nº CARPELOS
AC1	0	0	2	17	0.46	3	3.2	1	10-12 MM	0	2	3
AC2	0	0	3	30	0.61	4	2.8	1	10-12 MM	0	0	3
AC2	0	0	1	15	0.31	3.4	2.6	2	8-10 MM	0	1	3
AC4	1	3	1	14	0.38	4.1	1.2	1	<6 MM	2	3	3
AC4	1	3	2	20	0.84	7.6	1.6	1	8-10 MM	3	3	3
AC14	0	0	2	25	0.81	3.8	2.2	0	ABSENT	3	3	3
AC15	0	0	3	16	0.51	4	2	2	6-8 MM	0	0	3
AC15	2	3	3	15	0.32	3.6	2.2	2	10-12 MM	0	3	3
AC16	0	0	1	14	0.51	2.8	2.2	2	10-12 MM	0	3	3
AC18	0	0	2	11	0.42	3.4	0.9	2	10-12 MM	2	3	?
AC20	0	0	3	14	0.24	3.2	2.2	2	> 12 MM	0	1	?
AC21	0	0	1	11	0.51	4	1.6	2	10-12 MM	0	3	3
AC32	0	0	1	12	0.81	8	2.1	3	ABSENT	0	3	3
AC33	2	0	3	13	0.48	3.8	1.7	2	6-8 MM	0	3	3
AC33	0	0	1	25	0.42	2.4	2.9	2	10-12 MM	0	3	3
AC33	0	0	1	18	0.28	3.2	3.2	2	6-8 MM	0	0	3
AC41	0	0	4	29	0.42	4.8	2	2	< 6 MM	3	3	3
AC44	0	0	3	24	0.31	3.6	3.6	2	< 6 MM	0	3	3
AC44	0	3	1	31	0.91	6.4	1.4	2	6-8 MM	3	3	3
AC54	0	0	2	21	0.21	3	3	2	> 12 MM	0	3	3
AC62	0	3	3	13	0.31	6.8	1.2	2	<6 MM	1	3	3
AC62	0	3	3	21	0.21	6	0.4	2	< 6 MM	1	3	?
AC62	0	3	5	8.3	0.35	4.6	0	0	ABSENT	2	2	3
AC63	0	0	4	12	0.35	5.2	0.6	1	8-10 MM	3	3	3
AC69	1	3	3	25	0.51	8.4	1.7	1	6-8 MM	2	3	3
AC70	0	0	1	10.46	0.32	3	2.1	2	< 6 MM	0	3	?
AC70	0	0	1	19		3	2.4	2	6-8 MM	0	0	?
AC70	0	0	2	11	0.51	1	1.2	2	6-8 MM	0	0	3
AC70	0	0	1	13	0.32	4	3.2	2	< 6 MM	1	1	3
AC80	0	3	4	22.51	0.38	5	1.2	1	6-8 MM	3	3	3
AC82	0	0	3	12	0.27	2.2	2.1	2	> 12 MM	0	0	3
AC82	0	0	3	7	0.38		3	0	NOT OBSERVED	0	3	3
KAV35	1	3	3	29	0.25	9.4	1.3	1	6-8 MM	3	3	3
KAV173	2	0	2	8.6	0.43	4.8	1.2	2	8-10 MM	3	2	3

GENOTIPO	DENSIDAD RETICULADO	ABCISIÓN	COLOR CARNE	ESPEJOR CARNE (mm)	ESPEJOR CORTEZA	SÓLIDOS SOLUBLES	FIRMEZA	COLOR SEMILLAS	TAMAÑO SEMILLAS	AROMA EXT	AROMA INT	Nº CARPELOS
KAV174	0	3	2	17	0.49	6.2	0	2	8-10 MM	3	3	3
KAV174	1	1	2	26.26	0.98	6.8	1.4	2	8-10 MM	3	3	3
KAV181	0	0	1	15.8	0.35	7.8	0	2	6-8 MM	0	3	3
KAV 185	0	0	3	30	0.46	6.2	5.3	2	8-10 MM	0	0	3
KAV 186	1	3	6	24	0.19	5	1.1	2	10-12 MM	2	3	3
KAV186	1	1	6	26	0.81	4.8	3.4	1	8-10 MM	3	3	4
KAV190	1	2	6	21.87	0.44	12.2	4.4	3	< 6 MM	1	3	3
KAV190	2	0	6	23	0.83	9.8	6	3	6-8 MM	0	3	3

Densidad reticulado: ausente:0, ligero:1, medio:2// **Abscisión:** no observado:0, medio:1, absición:2, totalmente: 3//**Color carne:** verde-blanco:1, verde:2, blanco:3, amarillo:4// **Color semillas:** ausente:0, canela:1, blanco-marfil:2, amarillo:3//**Aroma externo:** ausente:0, débil:1, medio: 2, fuerte:3//**Aroma interno:** ausente:0, débil:1, medio: 2, fuerte:3//

ANEXO 2.

Fichas de los frutos obtenidos en campo.

AC 1



Forma: alargado	
Color:	
Externo: crema con puntitos blancos	Interno: blanco
Tamaño:	
Longitud: 120 mm	Anchura: 80 mm

AC 2



Forma: alargado	
Color:	
Externo: crema con puntitos blancos	Interno: blanco
Tamaño:	
Longitud: 150-170mm	Anchura: 60-80 mm

AC 4



Forma: Ovalado	
Color:	
Externo: verde oscuro con puntitos amarillos	Interno: verde-blanco
Tamaño:	
Longitud: 90-110 mm	Anchura: 70-90 mm
Otros: aroma externo e interno fuerte	

AC14



Forma: Alargado	
Color	
Externo: verde claro con puntitos crema	Interno: verde
Tamaño	
Longitud: 410 mm	Anchura: 90 mm

AC15



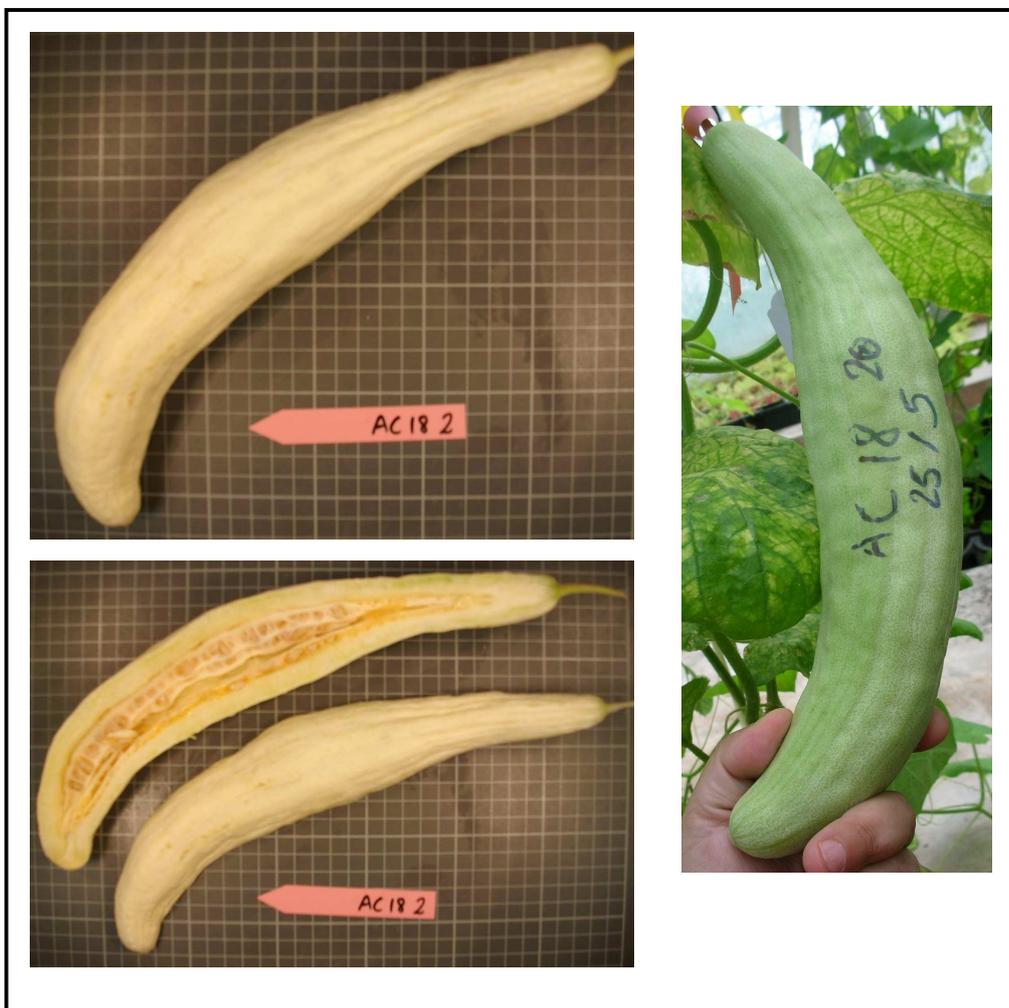
Forma: Ovalado	
Color	
Externo: verde oscuro con puntitos más claros	Interno: blanco
Tamaño	
Longitud: 80-100 mm	Anchura: 70-100 mm

AC16



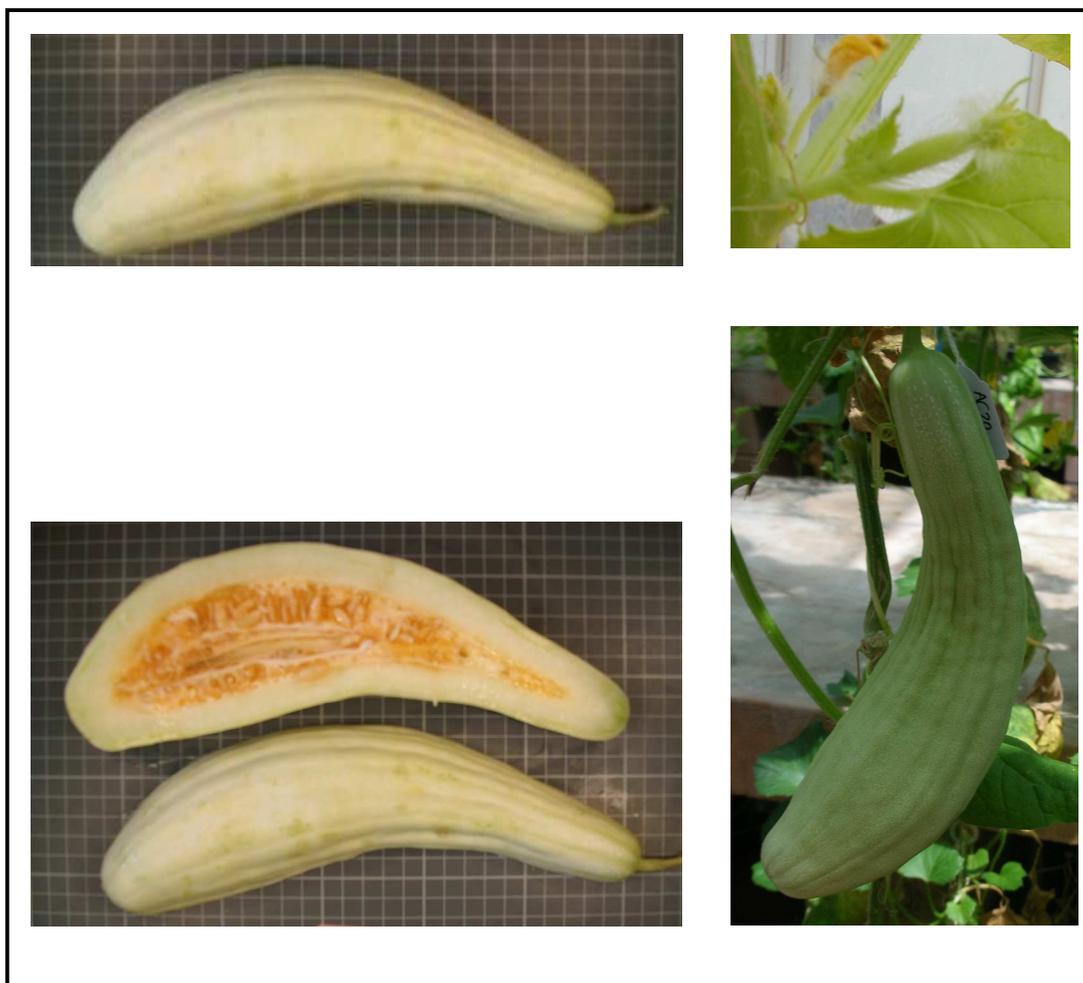
Forma: Alargado	
Color	
Externo: verde con puntitos crema	Interno: verde-blanco
Tamaño	
Longitud: 220 mm	Anchura: 70 mm

AC18



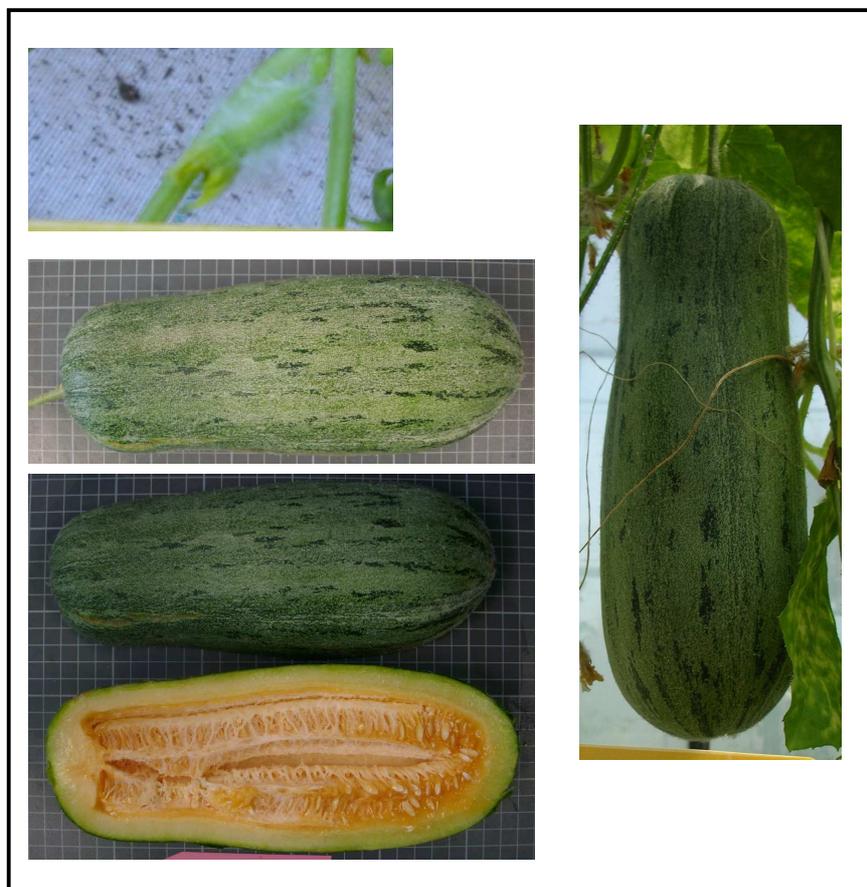
Forma: Alargado	
Color	
Externo: crema con puntitos blancos	Interno: crema
Tamaño	
Longitud: 310 mm	Anchura: 50 mm
Otros: aroma externo e interno fuerte	

AC20



Forma: Alargao	
Color	
Externo: blanco con puntitos crema	Interno: blanco
Tamaño	
Longitud: 270 mm	Anchura: 70 mm

AC 21



Forma: Ovalado	
Color	
Externo: verde con puntitos blancos y manchas verde oscuro	Interno: verde-blanco
Tamaño	
Longitud: 230 mm	Anchura: 140 mm

AC 33



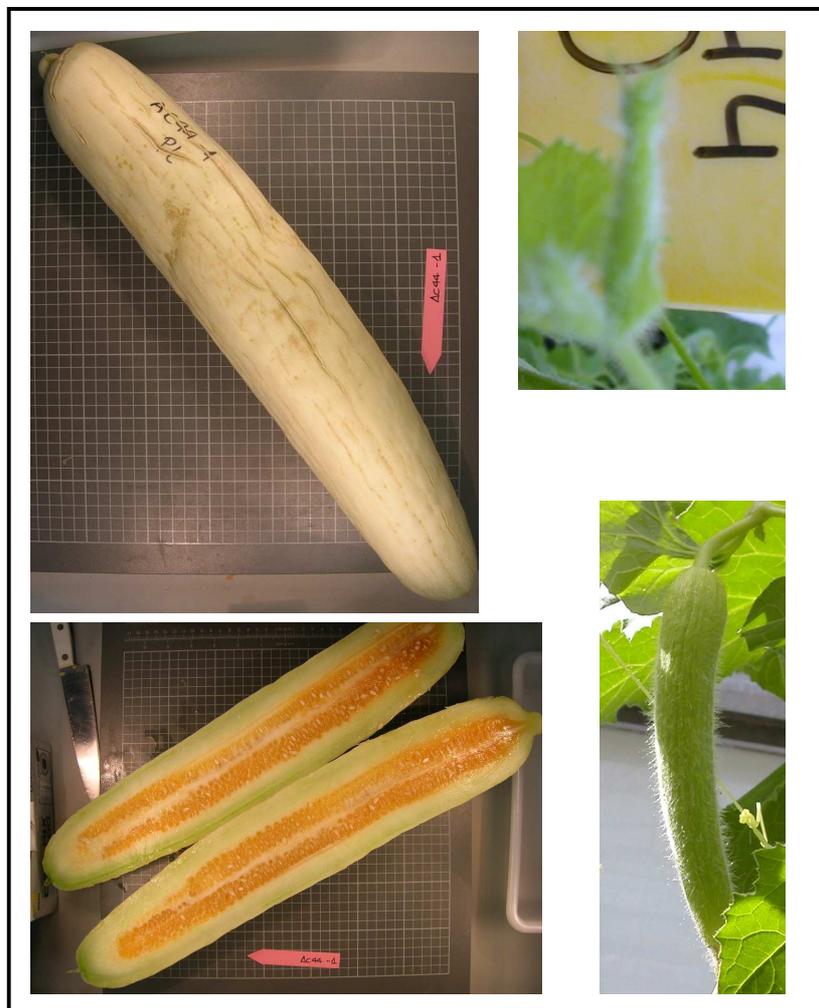
Forma: Alargado	
Color	
Externo: verde oscuro con puntitos blancos	Interno: blanco
Tamaño	
Longitud: 280 mm	Anchura: 60 mm

AC41



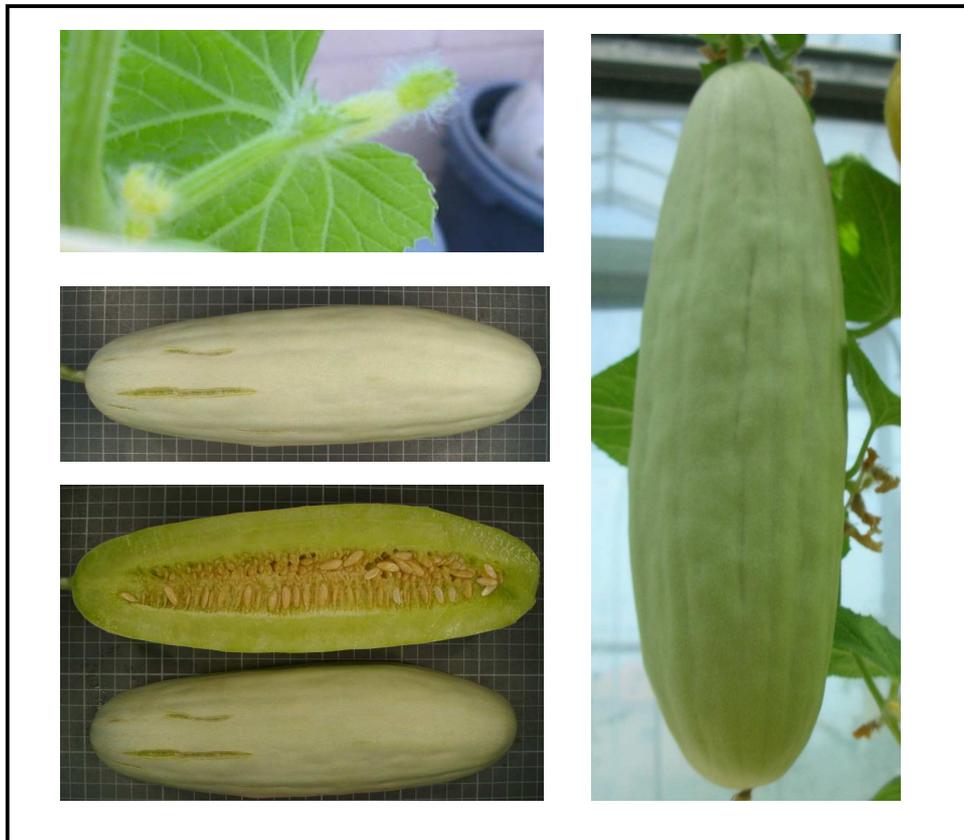
Forma: Alargado	
Color	
Externo: amarillo con puntitos crema	Interno: amarillo
Tamaño	
Longitud: 280 mm	Anchura: 70 mm
Otros: aroma externo e interno fuerte	

AC44



Forma: Muy alargado	
Color	
Externo: crema con puntitos blancos	Interno: verde-blanco
Tamaño	
Longitud: 580 mm	Anchura: 90 mm

AC54



Forma: Alargado	
Color	
Externo: crema con puntitos blancos	Interno: verde
Tamaño	
Longitud: 270 mm	Anchura: 70 mm

AC62



Forma: Muy alargado	
Color	
Externo: crema	Interno: crema
Tamaño	
Longitud: 180 mm	Anchura: 40 mm

AC63



Forma: Muy alargado	
Color	
Externo: verde claro con puntitos crema	Interno: crema
Tamaño	
Longitud: 550 mm	Anchura: 50 mm

AC70



Forma: Muy alargado	
Color	
Externo: verde con puntitos amarillos	Interno: verde-blanco
Tamaño	
Longitud: 590 mm	Anchura: 80 mm

AC80



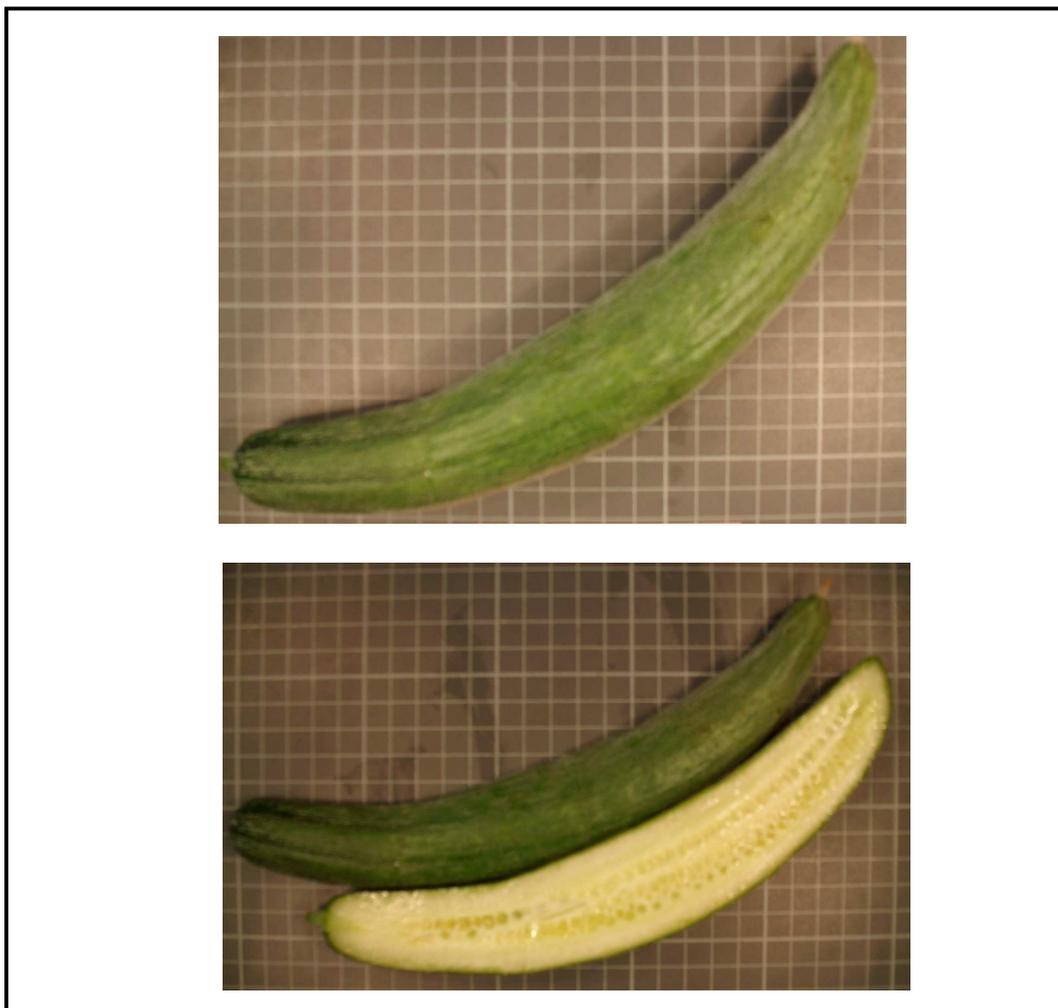
Forma: Ovalado	
Color	
Externo: amarillo con puntitos blancos	Interno: amarillo
Tamaño	
Longitud: 210 mm	Anchura: 110 mm

AC 81



Forma: Alargado	
Color:	
Externo: amarillo con puntitos	Interno: amarillo-verde
Tamaño:	
Longitud: 470-560 mm	Anchura: 70-100 mm

AC 82



Forma: Alargado	
Color:	
Externo: verde	Interno: blanco
Tamaño:	
Longitud: 220mm	Anchura: 40 mm

Kav 35



Forma: Ovalado	
Color	
Externo: verde oscuro con puntitos más claros	Interno: blanco
Tamaño	
Longitud: 120 mm	Anchura: 100 mm
Otros: aroma externo e interno fuerte	

KAV105



Forma: redondo	
Color	
Externo: amarillo-naranja	Interno: verde-blanco
Tamaño	
Longitud: 120-140 mm	Anchura: 120-130 mm

Kav 173



Forma: Aplanado	
Color	
Externo: verde con puntos más claros y bandas grises	Interno: verde
Tamaño	
Longitud: 90 mm	Anchura: 90 mm

Kav 174



Forma: Redondo	
Color	
Externo: verde oscuro con puntitos más claros y bandas grises	Interno: verde
Tamaño	
Longitud: 100 mm	Anchura: 110 mm
Otros: aroma externo e interno fuerte	

KAV175



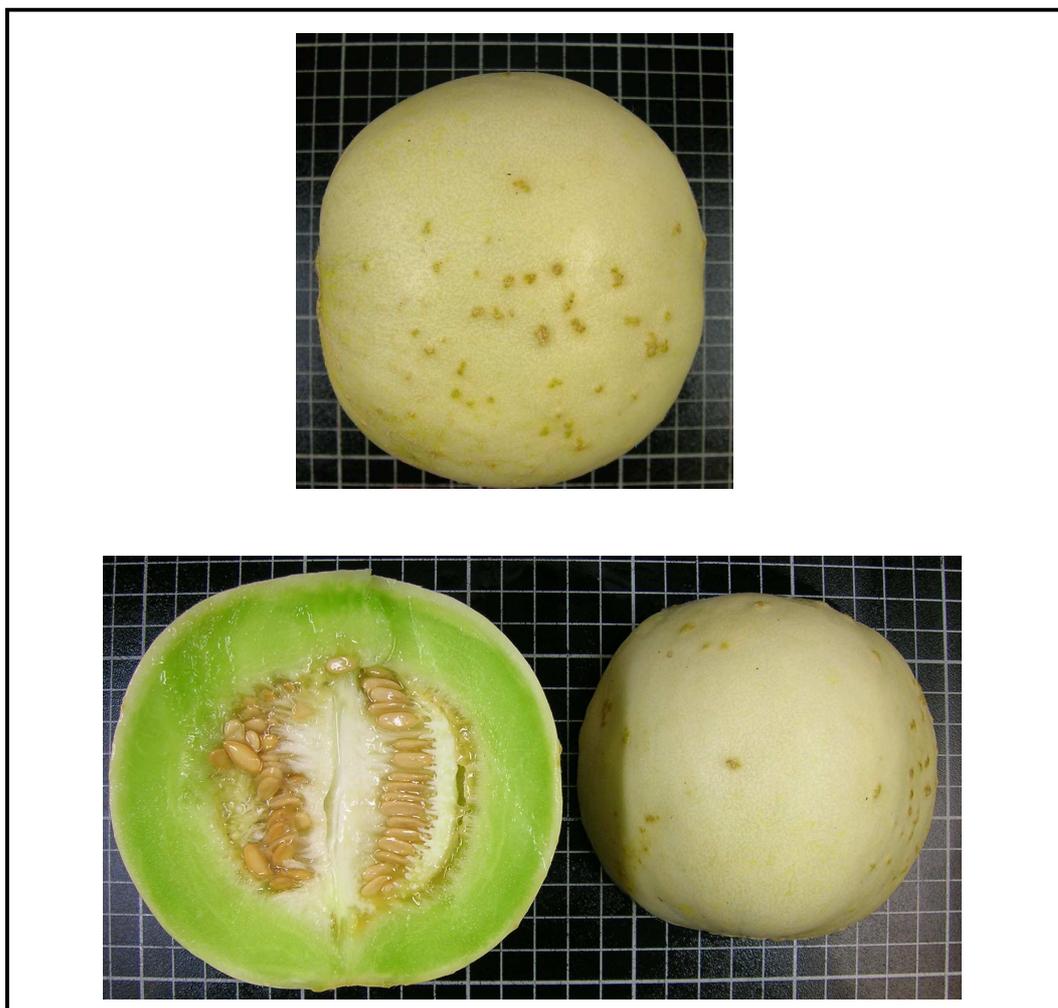
Forma: Redondo	
Color	
Externo: verde con manchas más oscuras	Interno: verde claro
Tamaño	
Longitud: 40 mm	Anchura: 33 mm

KAV176



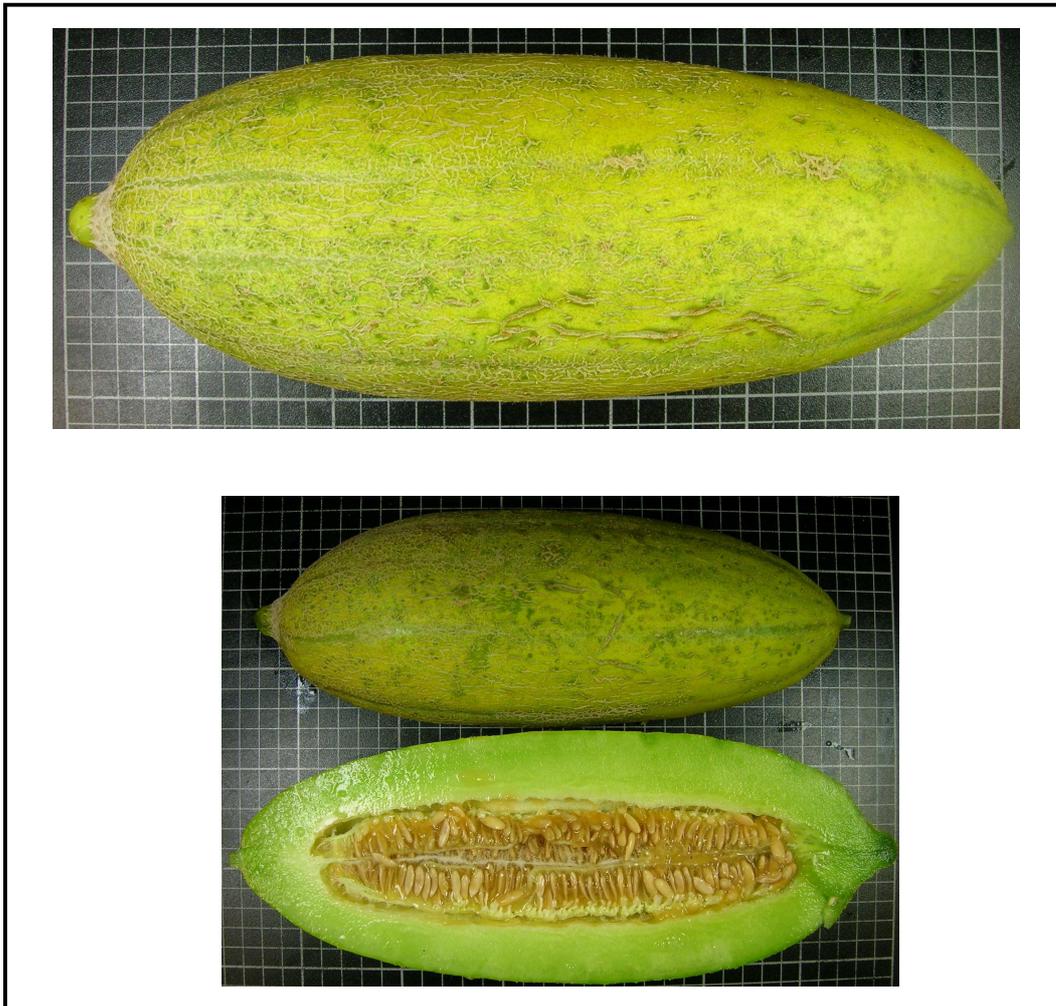
Forma: ovalado	
Color	
Externo: verde oscuro-ocre	Interno: naranja-blanco
Tamaño	
Longitud: 90-100 mm	Anchura: 80-90 mm
Otros: olor fuerte	

KAV177

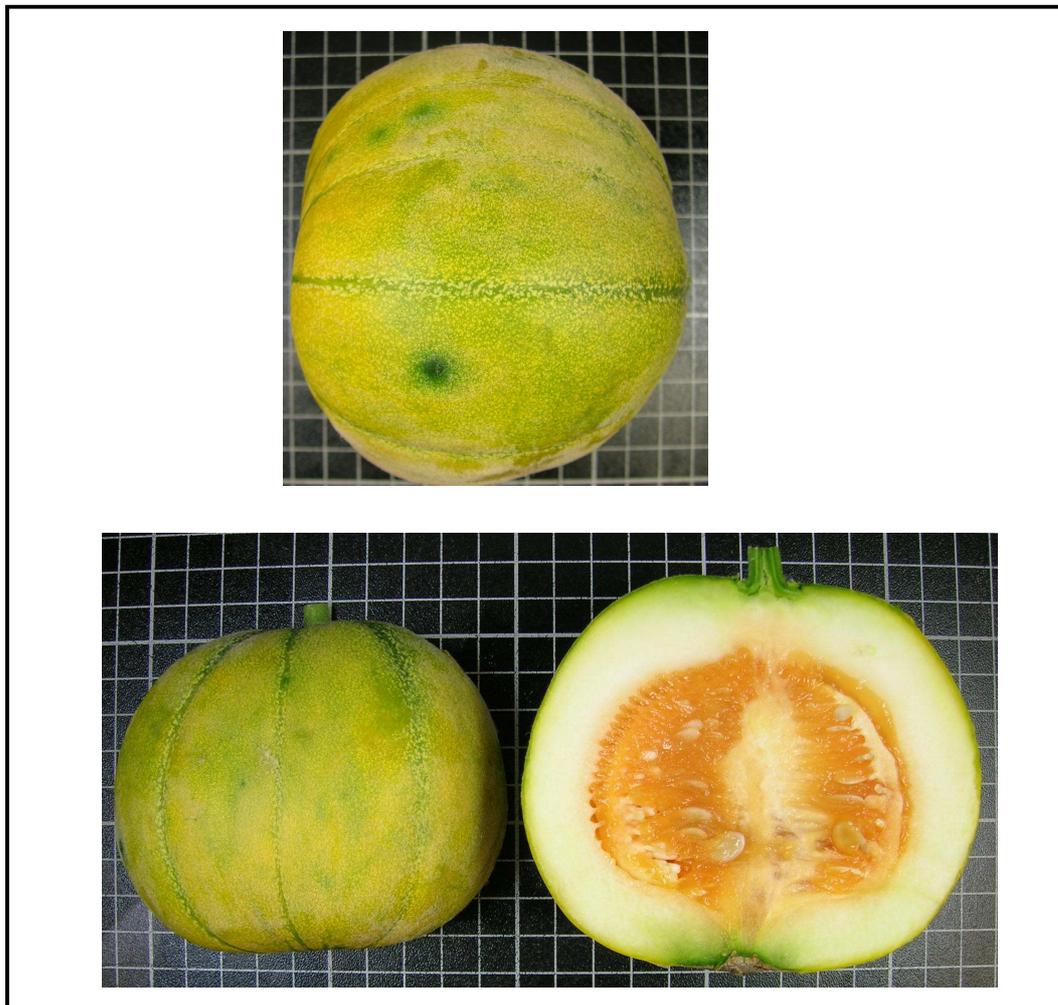


Forma: ovalado	
Color	
Externo: amarillo-blanco	Interno: verde
Tamaño	
Longitud: 110-150 mm	Anchura: 110-150 mm

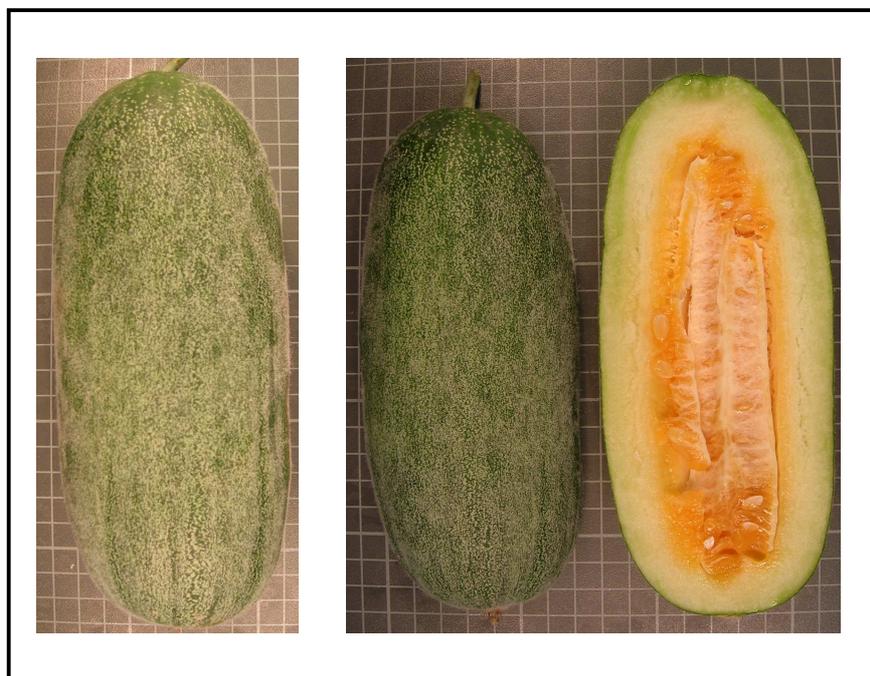
KAV179



Forma: alargado y puntiagudo	
Color	
Externo: ocre y verde	Interno: verde
Tamaño	
Longitud: 230 mm	Anchura: 80 mm

KAV180

Forma: aplanado	
Color	
Externo: ocre-verde	Interno: blanco
Tamaño	
Longitud: 80-90 mm	Anchura: 90-120 mm
Otros: aromático	

Kav181

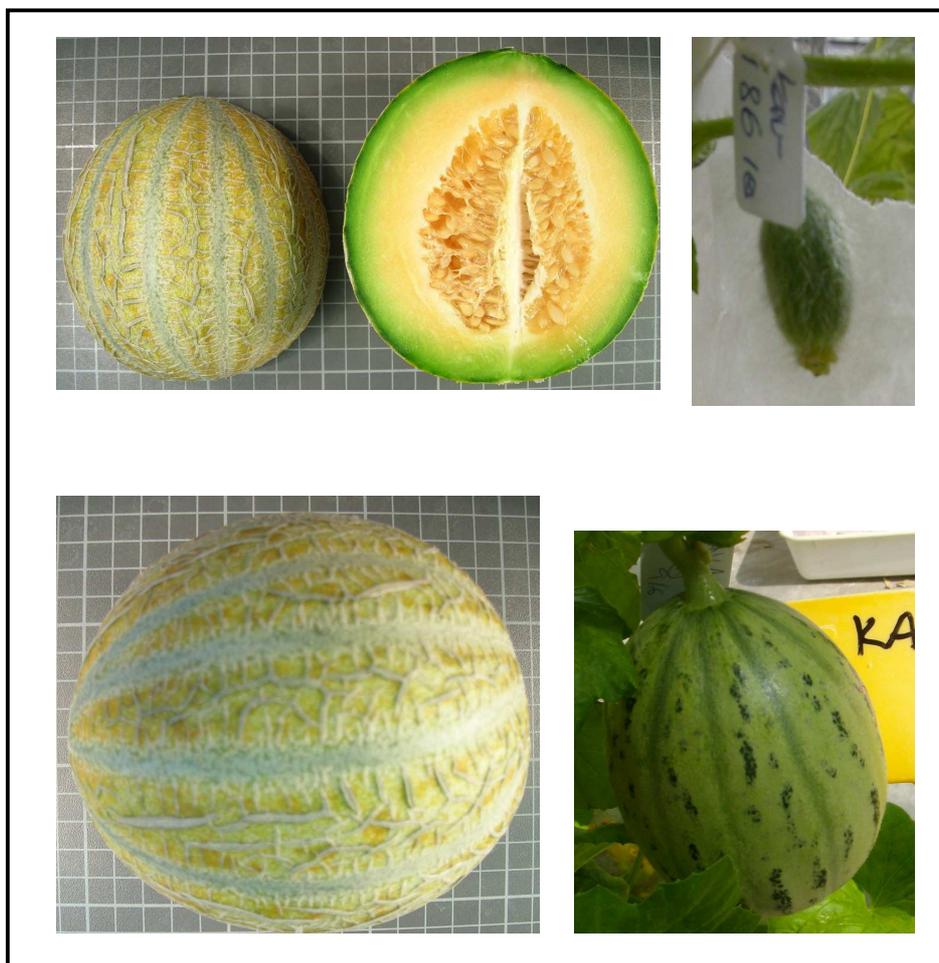
Forma: Ovalado	
Color	
Externo: verde oscuro con puntitos blancos	Interno: verde-blanco
Tamaño	
Longitud: 180 mm	Anchura: 70 mm
Otros: aroma externo fuerte	

Kav185



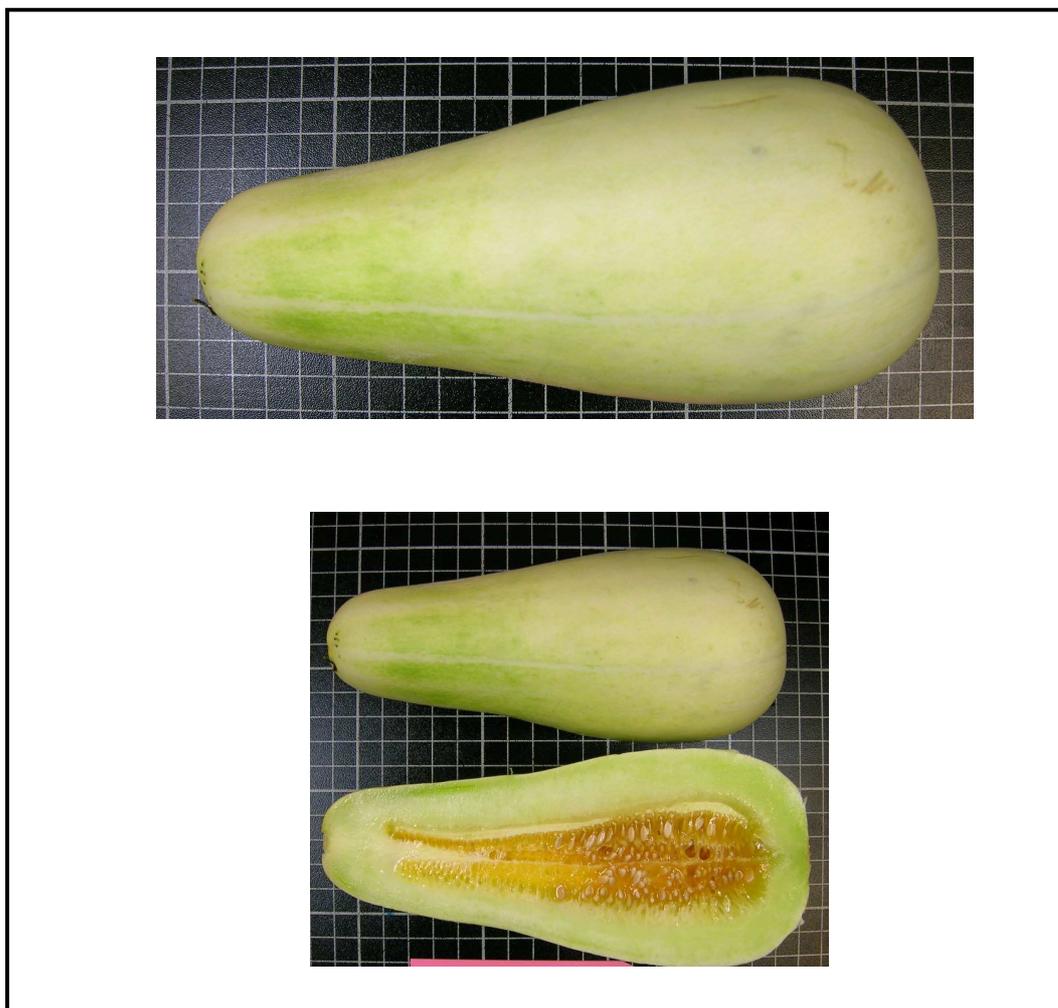
Forma: Forma de pera	
Color	
Externo: verde oscuro con puntitos amarillos y manchas verdes	Interno: blanco
Tamaño	
Longitud: 150 mm	Anchura: 90 mm

Kav 186



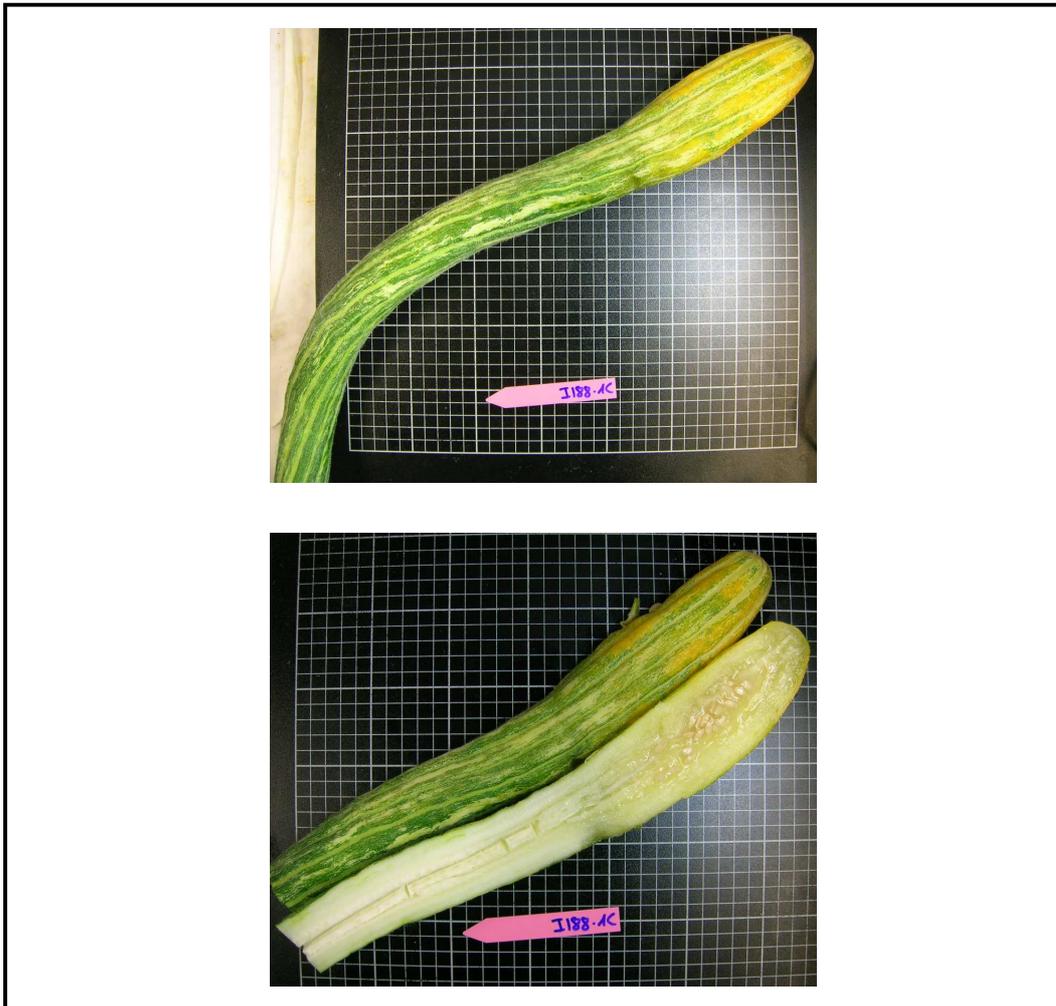
Forma: Redondo	
Color	
Externo: naranja-ocre con puntitos amarillos y bandas grises	Interno: verde
Tamaño	
Longitud: 120 mm	Anchura: 100 mm
Otros: aroma externo e interno fuerte	

KAV187



Forma: aperado	
Color	
Externo: verde claro-blanco	Interno: verde-blanco
Tamaño	
Longitud: 160-200 mm	Anchura: 70-90 mm

KAV188



Forma: muy alargado	
Color	
Externo: verde con puntitos amarillos	Interno: blanco-amarillo
Tamaño	
Longitud: 700-1100 mm	Anchura: 40-70 mm
Otros: olor muy fuerte	

Kav190



Forma: Redondo	
Color	
Externo: gris con puntitos amarillos	Interno: naranja
Tamaño	
Longitud: 90 mm	Anchura: 90 mm

AC 5

AC25



AC 32

AC47

AC 51

AC55



AC 60

AC71

AC 78

KAV174



KAV 179

KAV183