



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Mapeo fino y caracterización de un QTL implicado en el
tamaño del fruto del melón

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Navarro Gil, Iván

Tutor/a: Mulet Salort, José Miguel

Cotutor/a externo: Romero Salvador, Carlos

Director/a Experimental: Esteras Gómez, Cristina

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Carlos Romero y la Dra. Cristina Esteras, por todo el conocimiento que me han transmitido, así como por su valiosa orientación, su apoyo constante y por ser excelentes mentores a lo largo de este proyecto. Su experiencia y sus consejos han sido invaluable en cada etapa de este trabajo.

Agradezco especialmente Antonio Monforte por su compañía incondicional y por estar siempre a mi lado. Su ayuda constante, sus sugerencias y su paciencia han sido un soporte fundamental en este proceso. También deseo extender mi gratitud a María José Gonzalo, quien, además de ser parte del equipo, mostró una gran amabilidad y tuvo la paciencia de enseñarme todas las técnicas y el método de trabajo necesarios para el desarrollo de esta investigación.

Este trabajo se enmarca en el proyecto [PID2021-125998OB-C22](#), al cual agradezco por el respaldo y los recursos proporcionados. Agradezco también al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) por facilitarme el acceso a sus instalaciones y por ofrecerme el espacio y el equipamiento necesarios para llevar a cabo esta tesis.

Finalmente, quisiera expresar mi agradecimiento a todo el equipo de trabajo, especialmente a Víctor Rodríguez, por su colaboración, apoyo constante y contribución a lo largo de esta experiencia.

Resumen

El melón es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial, y especialmente en España que es el octavo productor y el principal exportador mundial. Por tanto, una mejora genética eficiente, basada en el conocimiento de los genes subyacentes de los caracteres de mayor importancia agronómica como son el tamaño y la morfología del fruto, se hace esencial para la obtención de nuevos cultivares y adaptarse a los mercados.

En una colección de líneas de introgresión (ILs) cuyo parental donante es la entrada silvestre Ames 24297 (Trigonus, que produce frutos de 50 g) en un fondo genético Piel de Sapo (PS), se identificó la IL TRI05-2 que inducía un incremento de tamaño de fruto del 42% respecto del control PS. La introgresión de TRI05-2 se encuentra entre las posiciones 683 Kpb a 2,4 Mpb del cromosoma 5. Como objetivo de este trabajo, se ha confirmado el efecto del QTL de TRI05-2 en dos localidades (Meliana y La Mayora) y se ha realizado un estudio comparativo del desarrollo del fruto entre esta IL y PS. Los resultados muestran que TRI05-2 presenta su máximo en la tasa de crecimiento (tanto en longitud como en diámetro de fruto) unos días antes que PS (día 8 después de la polinización frente a día 10), por lo que el efecto del QTL es en parte el adelanto temporal del pico de crecimiento.

Por otra parte, también se ha realizado el mapeo fino de la región con el objetivo de poder identificar genes candidatos que controlan el carácter. A partir de 8 líneas recombinantes, generadas previamente a partir del cruce de TRI05-2 y PS, seleccionadas por ser segregantes para alelos Trigonus y PS en la región candidata del QTL, se ha conseguido acotar la región responsable del incremento de tamaño del fruto a unas 330 Kb, entre las posiciones 1.501.986 y 1.831.800 pb del genoma de referencia (DHL92 v.4). Para ello se han caracterizado morfológicamente cerca de 250 plantas F₃ y, además, se ha mejorado el genotipado con el diseño de 4 nuevos marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en la región candidata.

Se ha analizado la frecuencia de recombinación en esta región, y se ha generado semilla F₄ para continuar el mapeo fino en la próxima campaña, de las que se han seleccionado dos plantas recombinantes en la región mediante genotipado para generar nuevos recombinantes que serán evaluados para características de tamaño/peso y morfología de fruto.

Palabras clave: *Cucumis melo*; tamaño del fruto; QTL; genotipado; introgresión; recombinantes; mapeo fino; genes candidatos; desarrollo del fruto

Abstract

Melon is a crop of significant economic importance worldwide, particularly in Spain, which ranks as the eighth-largest producer and the leading global exporter. Therefore, efficient genetic improvement based on understanding the genes underlying agronomically important traits, such as fruit size and morphology, is essential for developing new cultivars and adapting to market demands. In a collection of introgression lines (ILs) with the wild accession Ames 24297 (Trigonus, producing 50 g fruits) as the donor parent in a Piel de Sapo (PS) genetic background, the IL TRI05-2 was identified, inducing a 42% increase in fruit size compared to the PS control. The TRI05-2 introgression spans from positions 683 Kb to 2.4 Mb on chromosome 5.

This study aimed to confirm the effect of the TRI05-2 QTL in two locations (Meliana and La Mayora) and to conduct a comparative analysis of fruit development between this IL and PS. The results indicate that TRI05-2 reaches its maximum fruit growth rate (in both length and diameter) earlier than PS (day 8 versus day 10 post-pollination), suggesting that the QTL effect partly involves an earlier growth peak.

Additionally, fine mapping of the region was conducted to identify candidate genes controlling the trait. Using eight recombinant lines previously generated from the cross between TRI05-2 and PS, segregating for Trigonus and PS alleles within the QTL candidate region, the region responsible for increased fruit size was narrowed down to approximately 330 Kb, between positions 1,501,986 and 1,831,800 bp of the reference genome (DHL92 v.4). Morphological characterization of nearly 250 F₃ plants and improved genotyping with the design of four new SNP markers within the candidate region facilitated this refinement.

Recombination frequency in this region was analyzed, and F₄ seeds were generated for continued fine mapping in the next season. Two recombinant plants within the region have been selected through genotyping to produce new recombinants for evaluation of fruit size, weight, and morphology traits.

Keywords: *Cucumis melo*; fruit size; QTL; genotyping; introgression; recombinants; fine mapping; candidate genes; fruit development

**ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030****Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030**

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

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

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

Esta tesis de máster se alinea estrechamente con el ODS 2: Hambre Cero y el ODS 12: Producción y Consumo Responsables. Para maximizar la productividad y eficiencia de los cultivos, existe una necesidad urgente de mejorar genéticamente el melón y de comprender los genes responsables de los caracteres agronómicos clave, como el tamaño. Este trabajo contribuye al desarrollo de cultivos que pueden mejorar la producción de alimentos y aumentar la seguridad alimentaria, cumpliendo al mismo tiempo con los objetivos de la ONU de acabar con el hambre y mejorar la nutrición, a través del desarrollo de líneas de introgresión que permiten una mayor optimización del uso de los recursos y adaptación a las demandas del mercado.

Este estudio enfatiza prácticas sostenibles en el uso de técnicas genéticas para reducir el desperdicio y maximizar el rendimiento disponible. El desarrollo variado de variedades que maximizan su productividad favorece una agricultura eficiente y más responsable, ajustándose a una producción y consumo más sostenibles. Esto es fundamental para minimizar el impacto ambiental, mejorar la circularidad en la agricultura y asegurar la

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. El melón. Taxonomía, origen y diversificación.	1
1.2. Importancia económica.....	3
1.3. Genética y herramientas genómicas en melón.	4
1.4. Genética del tamaño del fruto.....	6
1.5. Genes que controlan el tamaño del fruto.....	8
2. Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos.....	11
3.1. Material vegetal.....	11
3.1.1. Desinfección y germinación de semillas.....	12
3.2. Desarrollo de fruto.....	12
3.3. Genotipado de la población de mapeo F3	13
3.3.1. Extracción de ADN y cuantificación.....	13
3.3.2. Genotipado iPLEX® Gold MassARRAY	14
3.3.3. Genotipado PACE.....	14
3.4. Cultivo y fenotipado.....	15
3.5. Análisis de datos	15
4. Resultados y discusión	16
4.1. Verificación y efecto del QTL.	16
4.2. Efecto del QTL durante el desarrollo del fruto.	17
4.2.1. Efecto del QTL en los valores de longitud y diámetro	18
4.2.2. Efecto del QTL en el incremento de longitud y diámetro	19
4.3. Mapeo fino	21
4.3.1 Saturación con nuevos marcadores	21
4.3.2. Experimento en Meliana	22
4.3.3. Experimento en La Mayora.....	26
4.3.4. Integración de resultados y mapeo final	29
4.4. Análisis de nuevos recombinantes (ensayo COMAV)	31
5. Conclusiones	35
Bibliografía	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genotipo de las madres F ₂ utilizadas para obtener la descendencia estudiada F ₃	11
Tabla 2. Media y desviación estándar para cada carácter evaluado de las líneas PS y TRI05-2 en los ensayos de La Mayora y Meliana, junto con los efectos de genotipo, localidad, interacción genotipo x localidad y su significancia.	16
Tabla 3. Genotipo de las plantas seleccionadas en Meliana y La Mayora tras realizar PACE con los cuatro nuevos marcadores en naranja entre los dos flanqueantes anteriores: chr05_1433 y chr05_1626.	22
Tabla 4. Genotipo de las madres F ₂ utilizadas para obtener la descendencia estudiada F ₃ en Meliana.....	23
Tabla 5. Media y desviación estándar del peso de los frutos de las distintas familias en Meliana.	23
Tabla 6. Análisis de asociación de caracteres con los marcadores del cromosoma 5 empleados en el ensayo de Meliana.	25
Tabla 7. Genotipo de las madres F ₂ utilizadas para obtener la descendencia estudiada F ₃ en Meliana.....	26
Tabla 8. Medias y desviaciones estándar para FW de las líneas 24M20, 24M21, PS y TRI05-2 en La Mayora.....	26
Tabla 9. Análisis de asociación de caracteres con marcadores del cromosoma 5 en la familia 24M21 de La Mayora.	28
Tabla 10 . Genotipo de las plantas del ensayo del COMAV para generar nuevos recombinantes.	31
Tabla 11. Frecuencia de recombinación observada en el ensayo del COMAV.	32
Tabla 12. Genotipo de las plantas seleccionadas del ensayo COMAV recombinantes en la región entre los marcadores chr05_1501 y chr05_1832.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Imagen representativa de los frutos de los 19 grupos que establece la clasificación de Pitrat (2017) en melón. Fuente: Gorka Perpiñá.	2
Fig 2. Datos de producción y área cosechada de melón en el mundo comprendidos entre 1994- 2022 según la FAO.	4
Fig 3. ILs generadas en diferentes cromosomas de PS con introgresiones del genoma de TRI. Se señala con un círculo rojo la IL a estudiar en este trabajo. En la esquina inferior derecha se presenta un fruto típico de TRI. Figura tomada de Campos et al. (2023).	8
Fig. 4. Comparación del peso(g) de frutos entre localidades (Meliana y La Mayora) en las líneas de estudio PS y TRI05-2. El eje Y representa el peso en gramos de los frutos, con valores entre 1000 y 4500 gramos, mientras que en el eje X se representa las localidades en las que se llevó a cabo el estudio.	17
Fig 5. (A) Gráfico de longitud medido a 36 días para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2. (B) Mismo gráfico ampliado a los 19 primeros días. En el eje X se representa los días después de la polinización (DAP) frente a las medidas de longitud (FL) en el eje Y.	18
Fig 6. (A) Gráfico de diámetro medido a 36 días para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2. (B) Mismo gráfico ampliado a los 19 primeros días. En el eje X se representa los días después de la polinización (DAP) frente a las medidas de diámetro (FD) en el eje Y.	19
Fig 7. Gráfico del incremento de longitud del fruto (FL) en mm durante 36 días (DAP) para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2.	20
Fig 8. Gráfico del incremento de diámetro del fruto (FD) en mm durante 36 días (DAP) para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2.	21
Fig 9. Distribución de la población de Meliana con respecto al peso (FW) de los frutos. ..	24
Fig 10. Asociación de los distintos caracteres evaluados con cada marcador representada con el estadístico F obtenido del ANOVA para el ensayo de Meliana.	25
Fig. 11. Distribución de la población 24M20 y 24M21 en La Mayora con respecto al peso (FW) de los frutos.	27
Fig 12. Asociación de los distintos caracteres evaluados con cada marcador representada con el estadístico F obtenido del ANOVA para la familia 24M21 del ensayo de La Mayora.	28
Fig 13. Mapas físicos que integran los resultados obtenidos en la asociación de marcadores en La Mayora y Meliana.	29
Fig 14. Distribución de la población del COMAV con respecto al peso (FW) de los frutos.	32

1. Introducción

1.1. El melón. Taxonomía, origen y diversificación.

Cucumis melo L., conocido popularmente como melón, se distingue por sus características biológicas y su importancia económica dentro de la familia Cucurbitaceae. Existe como una especie diploide con un conteo cromosómico de $2n = 2x = 24$. La familia de las cucurbitáceas agrupa alrededor de 800 especies distribuidas en 130 géneros, incluyendo diversas especies de relevancia agrícola además del melón, como el pepino (*Cucumis sativus* L.), la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), y varias especies de calabaza (*Cucurbita* L. spp.). El género *Cucumis* L., al que pertenecen tanto el pepino como el melón, está compuesto por 63 especies (Ghebretinsae et al., 2007; Renner et al., 2007; Sebastian et al., 2010).

Durante mucho tiempo, los melones se han cultivado mayoritariamente a nivel local y/o transportándose a regiones cercanas. En climas templados, su cultivo estaba limitado a la temporada de verano (McCREIGHT et al., 1993). Actualmente, el cultivo del melón se lleva a cabo en numerosos países con climas templados, subtropicales y tropicales (Kesh & Kaushik, 2021).

El fruto de melón presenta una amplia gama de formas, tamaños y colores, mostrando importantes diferencias entre sus formas silvestres y cultivadas (ver Fig. 1). Los melones cultivados se distinguen principalmente por la pérdida de amargor, mayor tamaño del fruto y mayor vigor (Pitrat, 2017). Además, se observa que los melones silvestres típicos son pequeños, con un tamaño que varía entre 20 y 50 gramos, y tienen una forma ovalada, a veces, redonda, con una composición exterior lisa. La piel suele ser de color verde claro o amarilla, normalmente con manchas o rayas verde oscuro, mientras que la pulpa es fina y blanca, verde pálido, o una combinación de ambos, con tres cavidades placentarias (Pitrat, 2013, 2017). En cambio, las variedades de melón cultivado muestran una notable diversidad en cuanto al tamaño del fruto, desde 5 centímetros de diámetro hasta frutos que superan los 10 kilogramos, y pueden presentar 3 o 5 lóculos. También exhiben diversas formas, incluidas las planas, esféricas, alargadas, en forma de pera, fusiformes, y especialmente largas con ornamentación ondulada. La piel puede ser lisa o tener arrugas o verrugas, y puede o no tener rayas, además de lóbulos y suturas. Además, el fruto puede ser fragante o no, y la pulpa (mesocarpo) puede variar en grosor y en color, siendo naranja, verde, crema o blanca (Paris et al., 2012). Mientras los tipos silvestres son monoicos, con flores pistiladas y estaminadas, los tipos cultivados suelen ser andromonoicos, con flores hermafroditas y estaminadas, aunque pueden ser también monoicos, hermafroditas (todas las flores hermafroditas) o ginoicos (únicamente con flores pistiladas) (Pitrat, 2017).

Se trata de una especie muy polimórfica en la que se han propuesto diversas clasificaciones intraespecíficas. Una de las primeras clasificaciones fue la de Munger y Robinson (1991), en la que se reconocía un único grupo de tipos silvestres (*C. melo agrestis*), y seis grupos cultivados (*melo*) aunque ya se habían descrito diferencias morfológicas entre los melones silvestres africanos y asiáticos (Naudin, 1859) que ya sugerían varios eventos de domesticación. La especie se dividió en dos subespecies basándose en la pilosidad del ovario: ssp. *melo*, con ovarios que desarrollan pelos largos,

y ssp. *agrestis*, con ovarios que tienen pelos cortos (Kirkbride, 1993), aunque ahora se considera algo obsoleta esta clasificación ya que entre los tipos domesticados se encuentran ambos tipos de ovario. Más recientemente, en la clasificación hortícola detallada de Pitrat (Pitrat, 2017) se describen 19 grupos distintos con una serie de subgrupos (Fig. 1). Por ejemplo, melones tradicionalmente clasificados como Inodorus como los tipos Piel de Sapo y Amarillo se consideran actualmente sub-grupos del grupo Ibericus, mientras que los melones tipo Honeydew constituyen un subgrupo de Inodorus y el melón Vedrantaís pertenece al grupo Cantalupensis, dentro del subgrupo Charentais.



Figura de Gorka Perpiñá, 2020.
Tesis doctoral:
DESARROLLO DE LÍNEAS DE
INTROGRESIÓN EN MELÓN
PARA LA MEJORA DE LA
CALIDAD DE ESTA ESPECIE.

Fig 1. Imagen representativa de los frutos de los 19 grupos que establece la clasificación de Pitrat (2017) en melón. Fuente: Gorka Perpiñá.

El origen y la domesticación del melón (*Cucumis melo*) han sido ampliamente debatidos debido a su distribución geográfica y diversidad genética. Estudios recientes sugieren que su origen ancestral se encuentra en Asia, en el clado Asia/Australia. Su pariente más cercano, *Cucumis picrocarpus*, es una especie australiana, de la cual divergió hace aproximadamente 3 millones de años, mientras que ambos se separaron de otros parientes asiáticos y australianos hace cerca de 10 millones de años (Sebastian et al., 2010).

La especie presenta dos linajes principales derivados de eventos de domesticación independientes en Asia y África. El primero, *C. melo* subsp. *melo*, se restringe a Asia y es el linaje que ha dado origen a la mayoría de los cultivares comerciales actuales. El segundo, *C. melo* subsp. *meloides*, se encuentra en África y ha producido algunos cultivares limitados a regiones específicas del continente (Endl et al., 2018). Si bien se han encontrado restos arqueológicos de melón en África que datan de 3700-3500 a.C. en Egipto, los análisis genéticos apuntan a que los melones africanos provienen de introducciones asiáticas anteriores, lo que refuerza la idea de que el centro primario de diversidad y domesticación se ubica en Asia (Endl et al., 2018).

En Asia, el cultivo de melón tiene registros arqueológicos que datan del 3000 a.C. en China y de 2300-1600 a.C. en el Valle del Indo (Endl et al., 2018). La India destaca como un centro clave de diversidad genética para el melón, con las mayores variabilidades genéticas registradas y una posición central en la distribución global de la especie. Esto refuerza su

importancia como centro primario de domesticación y diversificación, impulsada por la adaptación del melón a los diversos climas del subcontinente (Gonzalo et al., 2019). Estudios recientes basados en la resecuenciación de más de 1000 genotipos indicó la existencia de tres eventos independientes de domesticación del melón, dos en India y uno en África (Zhao et al., 2019).

El gran polimorfismo existente en *C. melo*, supone una ventaja para los programas de mejora, pues esta especie no se cruza con otras especies del género. Cabe destacar el estudio de Pitrat (2017), en el que se clasificó una amplia diversidad de variedades, basándose en evaluaciones anteriores. Los ibericus como Piel de Sapo son grandes, con piel gruesa, carne verde claro y no son aromáticos, mientras que los conomon, son cultivados en Asia oriental y se consumen inmaduros en encurtidos. Por otro lado, los momordica de India y el sudeste asiático tienen frutos pequeños harinosos que se abren al madurar. Los chate tienen piel peluda, son bajos en azúcar y se consumen como pepinos. Los dudaim se utilizan por su aroma y son comestibles, pero no se usan para consumo. Los acidulus, de India y Sri Lanka, son pequeños, firmes y sin azúcar. También el grupo makuwa de Asia incluye frutos de pulpa verde o blanca, pero su cultivo se encuentra actualmente en declive. Los ameri son melones grandes, dulces y crujientes, los cuales se cultivan desde Turquía hasta China, mientras que los cantalupensis y reticulatus son característicos por su aroma y dulzura. Los flexuoso son frutos largos con pulpa harinosa y los tibish de Sudán se consumen inmaduros y sin azúcar. Los chinensis, son aromáticos y poco dulces. Finalmente los melones silvestres trigonus son pequeños, con carne delgada y no dulces, comunes en África y Asia (Pitrat, 2017).

En otros estudios de diversidad se analizaron diversos caracteres de calidad del melón, siendo estos importantes porque influyen en el aroma, sabor y valor nutricional del melón. Los resultados mostraron una gran variabilidad genética y fenotípica entre diferentes variedades de *C. melo* destacando ésteres y aldehídos (sobre todo en las variedades Cantalupensis, Ameri y Dudaim), y una variabilidad significativa en la concentración de β -caroteno y otros carotenoides (Esteras et al., 2018, 2020) y en genes candidatos asociados a la acumulación de azúcares y comportamiento climaterio, donde se identificaron variaciones alélicas ligadas a estas características (Leida et al., 2015). Además, Burger et al., (2006) destacaron la creación de nuevas combinaciones de características de calidad en el melón, como la introducción de acidez en melones dulces para obtener perfiles de sabor únicos, así como la identificación de accesiones con alto contenido de sacarosa, carotenoides y ácido ascórbico como potenciales recursos para el mejoramiento genético del melón.

1.2. Importancia económica

El melón se cultiva de manera extensiva a nivel global y en una variedad de entornos, que incluyen climas templados, subtropicales y tropicales. Según datos proporcionados por la FAO, en el año 2022 la producción mundial de melón alcanzó aproximadamente 29 millones de toneladas, cultivándose en cerca de 1 millón de hectáreas. Asia es la región que concentra el 77% de esta producción, seguida por América con un 12% y Europa con un 6,1%. En términos de países, China se posiciona como el líder mundial en producción, con un 50% del total, seguido por Turquía, que produjo 1,6 millones de toneladas, e India, con 1,5 millones de toneladas. En el caso de España, la producción fue de 524.040 toneladas, de las cuales el 65% se destinó a la exportación, situando al país como el

número uno en valor de producto exportado. Además, España se posiciona como la segunda mayor productora de melón en Europa, solo superada por Italia, que alcanzó una producción de 590.230 toneladas. La evolución de la producción mundial ha mostrado un incremento progresivo, a pesar de que el área cultivada se mantiene en niveles similares a los de hace 20 años, pasando de 16 millones de toneladas en 1994 a las 29 millones de toneladas reportadas en 2022 (Fig. 2) (FAOSTAT, 2024).

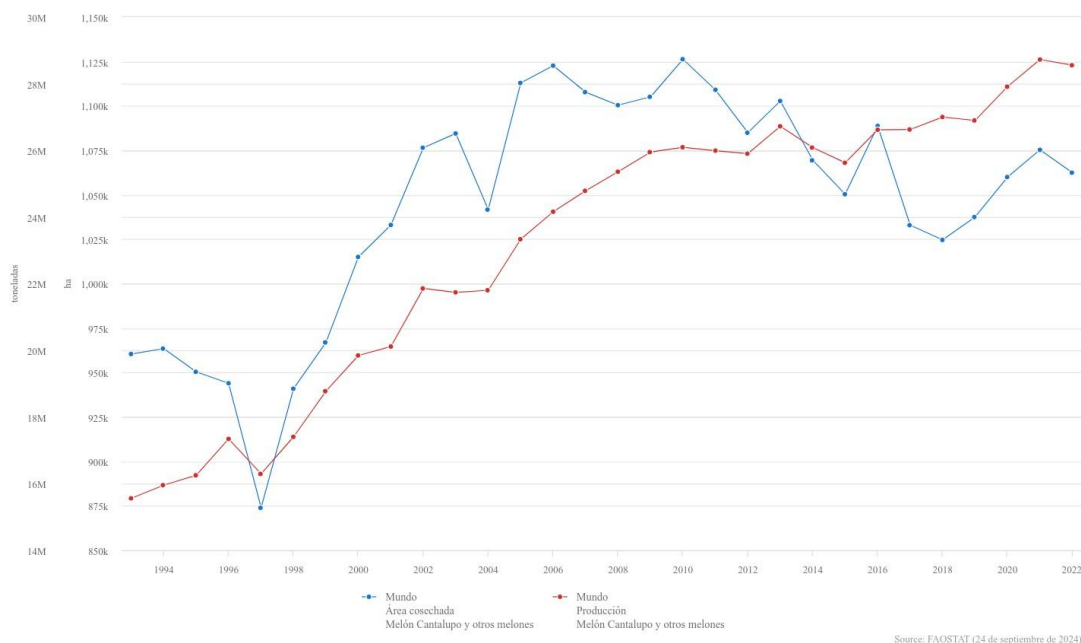


Fig 2. Datos de producción y área cosechada de melón en el mundo comprendidos entre 1994- 2022 según la FAO.

1.3. Genética y herramientas genómicas en melón.

Debido a la importancia económica de este cultivo, se hace necesaria una mejora genética dirigida y eficiente con el objetivo de desarrollar nuevas variedades con una producción mayor y más estable, adaptadas a diferentes condiciones ambientales, con tolerancias/resistencias a los diferentes estreses bióticos y abióticos limitantes en las zonas de cultivo y, en general, con características organolépticas, nutricionales y agronómicas deseables tanto por el agricultor como para el consumidor. En este contexto, las herramientas genómicas han supuesto un gran impulso en la mejora de muchas especies vegetales.

Desde que se desarrollaron las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) hace dos décadas (Mardis, 2013) el proceso de obtención de secuencias ha avanzado significativamente al haberse abaratado mucho los costes debido al incremento de eficiencia en el proceso por la secuenciación de millones de lecturas en paralelo, tanto para la secuenciación de genomas *de novo* como para la re-secuenciación de diferentes genotipos con el objetivo de detectar polimorfismos. En la actualidad, para las cucurbitáceas de mayor importancia económica o relacionadas existen genomas de referencia disponibles en bases de datos públicas (Yu et al., 2023;

<http://cucurbitgenomics.org/v2/>). Para el melón, especie diploide con un tamaño de genoma pequeño de 380 Mb (Wei et al., 2023), existen 5 genomas disponibles en esta base de datos (DHL92 v.4, Charmono v.1.1, Payzawat v.1, IVF77 v.1, Harukei-3 v.1.41), de entre los que el más empleado como referencia es el correspondiente a la línea doble haploide (DHL92), resultado del cruce entre Songwan Charmi (ssp. *agrestis*) y un cultivar de tipo Piel de Sapo (PS) cuya versión actualizada v.4 (Castanera et al., 2020) se encuentra en la base de datos MELONOMICS (*Melonomics v4.0*, 2024). La primera versión del genoma de melón, a partir de esta línea, predijo un total de 27,427 genes (García-Mas et al., 2012). Seis años más tarde, esta versión fue actualizada, identificándose 29,980 genes y mejorando los modelos genéticos en términos de descripción de la estructura de los mismos, definición de regiones UTR y uniones intrón-exón (Ruggieri et al., 2018). La versión alcanzó la actualización v4.0 tras incluir secuencias PacBio de Castanera et al., (2020). Por otra parte, un trabajo publicado en 2019 (Zhao et al., 2019) resecuenció 1175 genomas de melón, representando prácticamente toda la diversidad existente en *C. melo*, y abriendo el camino a posteriores estudios pan-genómicos (Lyu et al., 2023), y estudios más recientes (Wei et al., 2023) han publicado un ensamblaje de *novo* con la tecnología T2T (*telomere-to-telomere*).

La identificación de las regiones genómicas responsables de caracteres cuantitativos (detección de QTLs, *Quantitative Trait Locus*) requiere de la creación de mapas genéticos o de ligamiento a partir de poblaciones derivadas de unos parentales de interés o de estudios de asociación empleando germoplasma diverso. Actualmente gracias a las técnicas NGS se dispone de amplias colecciones de marcadores de alta calidad como SSRs (*Simple Sequence Repeats*) y SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) que facilitan la construcción de mapas de alta resolución. Gracias a estos mapas de ligamiento, se han identificado genes implicados en caracteres de importancia agronómica, como la calidad del fruto y la resistencia a enfermedades (Boissot et al., 2010; Diaz et al., 2011; Harel-Beja et al., 2010; Oliver Seros et al., 2000). Diaz et al. (2011, 2015) construyeron un mapa consenso en melón a partir de mapas previos para facilitar las comparaciones entre ellos, que presentó 1150 cM en total e incorporaba 1592 marcadores altamente transferibles. La detección de ligamiento entre marcadores y características de interés impulsa la mejora de los cultivos al poder emplear selección asistida por marcadores (MAS) y además también permite estudios de sintenia con otras especies.

Por otra parte, la posibilidad actual de emplear plataformas de genotipado de alto rendimiento con marcadores tipo SNP ha revolucionado los estudios de asociación como el GWAS (*Genome-Wide Association Study*), que permite detectar QTLs sin necesidad de obtener poblaciones de mapeo y construir mapas (Phan & Sim, 2017), pero requieren de miles de marcadores en colecciones grandes de individuos. En melón, Galpaz et al. (2018) ya publicaron la detección de QTLs a partir de datos de expresión obtenidos mediante RNA-seq, y Oren et al. (2022) estudiaron caracteres de precocidad y maduración del fruto en una colección de RILs (*Recombinant Inbred Lines*) basándose en el ensamblaje de los genomas de los parentales. Los estudios GWAS ya son frecuentes en esta especie. Como ejemplo, Zhao et al. (2019) detectaron más de 200 QTLs relacionados con 16 caracteres de interés agronómico como peso y morfología del fruto, y más recientemente, Yan et al. (2023) detectaron 10 QTLs involucrados en el contenido en sólidos solubles en la pulpa.

El desarrollo de líneas de introgresión (ILs) es otra vía de detección de QTLs. Estas líneas contienen, cada una de ellas, una introgresión específica, identificada mediante

marcadores moleculares, la cual proviene de un genotipo donante (normalmente es un germoplasma silvestre o exótico) en un fondo genético de un cultivar de élite (receptor). En conjunto, las introgresiones en una colección de ILs idealmente representan la totalidad del genoma del genotipo donante (Zamir, 2001). Las herramientas genómicas mencionadas (mapas anclados al genoma, genoma anotado, colecciones amplias de marcadores) han facilitado no sólo el desarrollo de poblaciones como las ILs sino la posterior identificación de genes candidatos mediante mapeo fino. La naturaleza de esta introgresión permite investigar el papel de componentes genéticos particulares tomados del germoplasma silvestre en el fondo genético de variedades cultivadas, lo que posibilita la identificación de QTLs que otras poblaciones o estudios no han logrado reconocer (Díaz et al., 2014). En melón hay desarrolladas diversas colecciones de ILs empleando diferentes fondos genéticos. Con fondo genético ibericus PS se han obtenido ILs con la entrada chinensis ‘Songwan Charmi’ (Eduardo et al., 2005), la momordica CALC (Díaz et al., 2014), el cultivar cantalupensis ‘Vedrantais’ (Santo Domingo et al., 2022) y el tipo dudaim ‘Queen’s pocket melon’ (Castro et al., 2019) como donantes. También se han generado ILs utilizando el fondo genético de ‘Vedrantais’, con el cultivar japonés ‘Ginsen Makuwa’ (Perpiñá et al., 2016) y PS (Pereira et al., 2021) como donantes. Recientemente, mediante el uso de múltiples ciclos de retrocruzamiento y técnicas de selección asistida por marcadores (SAM), Campos et al. (2023) desarrollaron 30 ILs, utilizando como fondo genético PS y el germoplasma silvestre pakistaní Ames 24294 denominada “Trigonus” (TRI). La colección fue extensamente genotipada mediante la plataforma seqSNP y posteriormente evaluada en tres ensayos agronómicos independientes que identificaron 73 QTLs a lo largo de los 12 cromosomas, relacionados con la morfología externa e interna del fruto, el color de la piel y el contenido de azúcares (Campos et al., 2023). El objetivo de esta colección de ILs fue estudiar el proceso de domesticación del melón y los caracteres implicados en el llamado síndrome de domesticación, explorando la variabilidad genética presente en el melón silvestre lo que permitió identificar una serie de QTLs que se correlacionan con características agronómicas importantes, como la firmeza de la pulpa (FF), el peso (FW) y la forma (FSI) del fruto, el contenido de sólidos solubles (SSC) y la proporción de pulpa (FFP). Ciertas líneas revelaron la presencia de QTLs que afectan la firmeza de la pulpa y el contenido de sólidos solubles, características importantes para evaluar la calidad postcosecha y la aceptación en mercados de exportación (Fig. S1) (anexos). En cuanto a la firmeza de la pulpa, se encontraron QTLs en los cromosomas 3 y 12. En los cromosomas 3, 4, 6, 7, 8, 10 y 11 se identificaron introgresiones con efecto reductor para el carácter peso del fruto en comparación con la línea PS, con ambos caracteres diámetro y longitud del fruto también significativamente reducidos en la mayoría de los casos. La línea TRI05-2, con introgresión en el cromosoma 5, fue la única con un efecto significativo de aumento tanto del tamaño como del peso del fruto (Fig. S2) (anexos) (Campos et al., 2023). Respecto a la forma del fruto, se identificaron QTLs conducentes a frutos más alargados (principalmente en los cromosomas 2 y 12) y a frutos más redondos (cromosoma 1).

1.4. Genética del tamaño del fruto

Monforte et al. (2014) y Gonzalo & Monforte (2017) revisaron todos los QTLs más consistentes hallados hasta el momento y concluyeron que muchos de los QTLs detectados para el peso/tamaño y forma del fruto se repiten en distintos fondos genéticos

por lo que acuñaron el término meta-QTL. Para el peso se describieron 4 meta-QTLs en los cromosomas 2, 3, 8 y 11.

En un estudio previo de Díaz et al. (2017) identificaron y localizaron 27 QTLs vinculados al peso, longitud y diámetro del fruto a partir de un cruce entre PS y TRI. Los QTLs identificados se distribuyeron en diferentes cromosomas. En el cromosoma 4, se localizaron 3 QTLs (fwqt4.1, flqt4.1 y fdqt4.1, de peso, longitud y diámetro del fruto, respectivamente) con efectos consistentes sobre el tamaño. El QTL fwqt4.1 explicó hasta el 46% de la variación fenotípica total para el peso del fruto. En el cromosoma 6 y 8, se encontraron otros QTLs, que controlaron el tamaño del fruto y contenido de pulpa. En el cromosoma 5 encontraron el QTL paqt5.1 asociado con el contenido de pulpa, en el que los alelos de TRI incrementaron la proporción relativa de pulpa. La mayoría de los QTLs detectados mostraron efectos aditivos, lo que facilita su utilización en programas de mejora genética, dado que el efecto de los alelos se suma de manera predecible. Además, se observaron interacciones epistáticas entre algunos QTLs, como fwqt6.1 y una región en el cromosoma 9 (Díaz et al., 2017).

En el marco de los proyectos [RTI2018-097665-B-C22](#) y [PID2021-125998OB-C22](#), cuyo principal objetivo es el estudio de las bases genéticas de la morfología del fruto en relación a los procesos de domesticación y diversificación en esta especie, el equipo de Genómica en Mejora Vegetal al que me he incorporado utilizaron una colección de 30 ILs entre la variedad comercial PS y la accesión Ames 24297 (TRI) para comprender mejor el proceso de domesticación del melón y aprovechar la variabilidad genética disponible en la accesión silvestre (Campos et al., 2023).

Como se ha dicho, una de las líneas más interesantes fue la IL TRI05-2 (Fig. 3), que posee una introgresión en el cromosoma 5 entre las posiciones 683.991 y 2.398.882 (DHL92 v.4, Castanera et al., 2020). Esta línea muestra un impacto notable en las dimensiones de los frutos y su peso. A diferencia del resto de ILs que, en su mayoría, tienen un efecto de disminución del tamaño del fruto en comparación con la variedad PS, TRI05-2 mostró una capacidad excepcional para aumentar el tamaño del fruto, con un incremento del 42% en el peso del fruto respecto a PS. Este aumento de tamaño es el resultado tanto de una mayor proporción de pulpa como de una interacción epistática entre variantes genéticas de TRI y el fondo genético de PS. TRI produce frutos muy pequeños y, por tanto, da lugar a una segregación transgresiva (Campos et al., 2023). Esto resalta la importancia de seguir generando colecciones de tipo IL para identificar nuevas regiones que controlan caracteres morfológicos del fruto (Castro et al., 2019; Eduardo et al., 2005; Pereira et al., 2021; Perpiñá et al., 2016; Santo Domingo et al., 2022).



Fig 3. ILs generadas en diferentes cromosomas de PS con introgresiones del genoma de TRI. Se señala con un círculo rojo la IL a estudiar en este trabajo. En la esquina inferior derecha se presenta un fruto típico de TRI. Figura tomada de Campos et al. (2023).

La introgresión de TRI05-2, que abarca 1.714 kb en el cromosoma 5, no sólo se asoció al peso y tamaño del fruto (longitud, diámetro, perímetro), sino también al aumento en la proporción de pulpa. Estos QTLs indican la posibilidad de avanzar en el rendimiento de cultivares de melón de mayor tamaño sin comprometer la calidad del fruto, lo cual es clave para la aceptación en los mercados comerciales (Campos et al., 2023). Dado el tamaño de esta introgresión, no se han podido definir genes candidatos y es necesario realizar un mapeo más fino. Así, a partir de TRI05-2, se derivó una línea de familias F2 proveniente del retrocruce con PS para tratar de acotar el QTL que afecta a tales características, siendo el objeto de estudio en este trabajo de fin de máster.

1.5. Genes que controlan el tamaño del fruto

En el caso del melón, Díaz et al., (2017) identificaron QTLs para el tamaño del fruto que coinciden con los informados previamente por Monforte et al. (2014) en un metaanálisis que integró la mayoría de los QTLs de tamaño y forma publicados en la secuencia genómica de melón. Esto permitió verificar que los QTLs relacionados con tamaño del fruto descritos por Díaz et al. (2017) colocalizan con secuencias homólogas de genes de tomate que regulan la forma y el tamaño, como SUN (en el caso de fwqt2.1 y fwqt4.1), OFP, CNR y WOX (en el caso de fwqt8.1).

Los genes de la familia OFP (Ovate Family Proteins) regulan la elongación del fruto en tomate afectando la forma (Liu et al., 2002), mientras que la familia de genes CNR (Cell Number Regulator) controla el tamaño del fruto en tomate (Frary et al., 2000) y en otras especies. Por otro lado, la familia de genes WOX (WUSCHEL-related homeobox) ha sido descrita como responsable de regular el número de lóculos en tomate lo que tiene relación

con el diámetro (Muños et al., 2011). En las regiones que contienen QTLs de tamaño en el cromosoma 4 de melón (*pca1qt4.1* y *fwqt4.1*), identificaron un gen homólogo de tomate que regula el tamaño del fruto (*CmCNR2*). De forma similar, otros genes de la familia *CNR* (*CmCNR4*, 6, 7) están localizados en la región del cromosoma 6 que alberga los QTLs *faqt6.1*, *fwqt6.1* y *pca1qt6.1*, relacionados con el tamaño (Díaz et al., 2017).

Con respecto al QTL *fwqt8.1*, se descubrieron genes homólogos a algunos de tomate que controlan el tamaño como *Wuschel* (*CmWuschel3*) y *KLU/FW3.2* (*Cmfw3.2-5*), siendo este último encargado de regular la división celular en los frutos de tomate. Todo esto podría indicar que los genes homólogos a los que controlan el tamaño del fruto en tomate podrían encontrarse involucrados en el control del tamaño en melón (Díaz et al., 2017).

Recientemente, (Zhao et al., 2024) han realizado una revisión acerca de los genes implicados en el desarrollo del fruto en pepino, en la que se explica la función putativa de muy diversos genes en relación con la longitud y desarrollo de lóculos del fruto implicados en el peso. Factores de transcripción como *CRABS CLAW* (*CsCRC*, homólogo del factor de transcripción *YABBY*) o de tipo *MADS-BOX* como *SEPALLATA2* (*CsSEP2*), que conlleva mayor longitud del fruto, y *FRUITFULL 1* (*CsFUL1*), que inhibe la división celular y la expansión mediante la represión de *SUPERMAN* (*CsSUP*) y transportadores de auxinas; han sido estudiados en *C. sativus*. Además, genes relacionados con la organización de microtúbulos y que, por tanto, afectan al plano de división celular, también han sido descritos como candidatos en esta especie (Zhao et al., 2024). Ejemplos son el ya mencionado *SUN* (*CsSUN*) y *TONNEAU1 RECRUITING MOTIF* (*CsTRM5*), que interacciona con genes *OVATE*. La disrupción de estos genes *CsSUN* y *CsTRM5* da lugar a frutos más cortos y anchos. Como ejemplo de genes de rutas enzimáticas también involucrados en este carácter de tamaño Zhao et al. (2024) mencionan los genes *Short Fruit 1, 2 y 4* (*SF1*, *SF2*, *SF4*) y el gen de biosíntesis de etileno *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2* (*CsACS2*). Tanto la sobreproducción como la síntesis reducida de etileno conllevan represión de la división celular y acortamiento del fruto en pepino. Otros genes reportados como moduladores de la longitud por sus efectos pleiotrópicos son genes relacionados con proteínas de exocitosis (*CsExo70B*), *Little Leaf* (*LL*), *Irregular Vasculature Patterning* (*CsIVP*) o el transportador de azúcares *CsSWEET7a* entre otros (Zhao et al., 2024). También se han encontrado miRNAs potencialmente implicados en la regulación del tamaño del fruto en tomate y pepino. Homólogos de todos estos genes podrían ser buenos candidatos para explicar el efecto de incremento de peso/tamaño en *TRI05-2*, si se localizan en la misma región donde mapea el QTL.

2. Objetivos

En este contexto, los objetivos que se proponen para este Trabajo de Fin de Máster son:

1. Verificación del QTL de la IL TRI05-2 y estudio de sus efectos con respecto PS mediante ensayos agronómicos y el análisis del desarrollo del fruto.
2. Mapeo fino de la región del QTL de tamaño del cromosoma 5 mediante el análisis.
3. Desarrollo de nuevos recombinantes para continuar con el clonaje posicional en siguientes etapas del proyecto.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

Previamente a este trabajo se desarrolló una población F2 proveniente del cruce entre TRI05-2 (con introgresión de TRI entre las posiciones 683.991 a 2.398.882 pb) desarrollada por Campos et al. (2023) y el parental de referencia PS con el objetivo de obtener semilla F3 para realizar un mapeo fino de la región del QTL implicado en el tamaño del fruto medido como peso (FW) y en el incremento de la proporción de pulpa (FFP).

En la primavera-verano de 2024 se realizó un ensayo en varias ubicaciones con familias F3. Para el mapeo se seleccionaron 8 plantas F2 que presentaban recombinantes espaciadas en la introgresión. Con la descendencia se fundaron las familias F3 indicadas en la Tabla 1: 24M10, 24M11, 24M12, 24M13, 24M14 y 24M15 con regiones en heterocigosis (H) y otras fijadas con alelos PS (ensayo Meliana), y por otro lado 24M20 y 24M21, con regiones en heterocigosis y otras fijadas con alelos TRI (ensayo La Mayora).

Tabla 1. Genotipo de las madres F2 utilizadas para obtener la descendencia estudiada F3.

Cada columna hace referencia a un marcador en la posición en kb en el cromosoma 5, que abarca todo el QTL desde 684kb hasta 2.282kb. El genotipo se indica como PS (homocigoto para alelos de PS), TRI (homocigoto para alelos de TRI05-2) y H (heterocigoto con ambos alelos).

Pedigree F3	Pedigree madres F2	chr05_684	chr05_1058	chr05_1204	chr05_1302	chr05_1433	chr05_1626	chr05_1832	chr05_1957	chr05_2077	chr05_2103	chr05_2282
24M10	23M50-133	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H
24M11	23M50-178	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H
24M12	23M50-164	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13	23M50-003	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS
24M14	23M50-126	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M15	23M50-104	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H
24M20	23M50-119	H	H	H	H	H	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M21	23M50-181	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H

Las 360 plántulas germinadas de las familias 24M10 a 24M15, se genotiparon con la tecnología Sequenom, tal como se indica en el apartado 3.3, y se seleccionaron aquellas con regiones en homocigosis PS y TRI para trasplantarlas en un invernadero de Meliana (Valencia). Se permitió su polinización libre mediante abejorros. El método de fertilización no es relevante, ya que casi todos los componentes del fruto, excepto el contenido de las semillas, se derivan del progenitor materno. Además, se incluyeron diez plantas de cada parental (PS y TRI05-2) como control. Las plantas recombinantes con regiones en heterocigosis se trasplantaron en un invernadero del COMAV (Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana-UPV) para su cultivo junto con 15 plantas de cada parental TRI05-2 y PS en condiciones estándar de humedad y temperatura. Estas plantas recombinantes se emplearán en el futuro para continuar con el mapeo fino. Los parentales de este invernadero se utilizaron para el experimento de desarrollo de fruto.

Por otro lado, de cada familia 24M20 y 24M21 se enviaron 100 semillas para germinar y trasplantar 50 en un invernadero en La Mayora (Málaga), también con polinización libre (ensayo La Mayora), que incluyó a los parentales (10 de cada uno). El genotipado de éstas se hizo posteriormente.

3.1.1. Desinfección y germinación de semillas

Antes de la germinación, las semillas fueron sometidas a un protocolo de desinfección. Se sumergieron en una solución de Na_3PO_4 al 10% (100 g/l) durante 3 horas en un agitador. Posteriormente, las semillas se lavaron suavemente con agua destilada en cinco ocasiones para eliminar cualquier residuo de la solución. Luego, se remojaron en lejía comercial diluida al 30% (40 g de cloro activo/l) durante 1 hora, mientras eran agitadas en el mismo dispositivo. Después de este tratamiento, se lavaron nuevamente aproximadamente 9 veces y se dejaron secar durante al menos 24 horas. Finalmente, una vez que estuvieron completamente secas, las semillas fueron sometidas a un tratamiento térmico a 80°C durante 24 horas.

Una vez desinfectadas, se realizó una pequeña abertura en la punta de cada semilla para facilitar la germinación. Se colocaron entre 10 y 12 semillas en placas Petri, intercaladas entre dos papeles de filtro autoclavados y sobre un lecho de algodón para retener la humedad. Los papeles y el algodón se humedecieron ligeramente y se mantuvieron en la oscuridad a 37°C durante un periodo de 2 a 4 días para permitir la germinación. Las semillas que germinaron se trasplantaron a bandejas que contenían una mezcla de tierra y perlita, y se irrigaron con una solución nutritiva. Estas bandejas con las semillas germinadas se colocaron en fitotrón (cámara de crecimiento) a una temperatura de 23°C durante el día y 20°C durante la noche, exponiendo las plantas a un ciclo de luz de 16 horas y 8 horas de oscuridad. Cuando se formaron los cotiledones, se tomaron muestras de hojas para la extracción de ADN.

3.2. Desarrollo de fruto

Con el objetivo de determinar el momento exacto del desarrollo en el que se hacen evidentes las diferencias en el tamaño del fruto entre el control PS y TRI05-2, se llevó a cabo un ensayo de desarrollo en el que se midieron los frutos de 15 plantas por genotipo a distintos tiempos. Para ello, se llevó a cabo una polinización manual, y se midieron la longitud y el diámetro del ovario y del fruto a partir de la polinización (día 0: pre-antesis) cada día, utilizando un pie de rey. Una vez que se superó la capacidad de medición del pie de rey, se recurrió al uso de una cinta métrica. Para medir el incremento de longitud y diámetro se recurrió al método delta, que consiste en calcular los valores de incremento (Δ) que representan la diferencia de diámetro y longitud entre un día y el siguiente expresado en porcentaje.

Los valores de incremento en porcentaje de la longitud del fruto (ΔFL) se calcularon utilizando la fórmula:

$$100 \times \frac{FL_t - FL_{t-1}}{FL_{t-1}}$$

donde FL_t corresponde al valor de longitud del fruto en el día t , y FL_{t-1} es el valor de longitud del fruto en el día anterior. Para calcular el incremento del diámetro del fruto se utilizó la misma fórmula, utilizando los datos de diámetro del fruto en lugar de longitud.

3.3. Genotipado de la población de mapeo F3

3.3.1. Extracción de ADN y cuantificación

Se utilizaron muestras de tejido de hojas jóvenes, principalmente cotiledones, que fueron recolectadas e introducidas en tiras de 8 tubos de 1.1 ml, junto con 2 bolas de acero inoxidable. Estas muestras se congelaron en nitrógeno líquido antes de ser trituradas en un QIAGEN TissueLyser a 24 rpm durante 14 segundos, y luego se volvieron a sumergir en nitrógeno líquido.

Para la extracción de ADN, se aplicó el protocolo de Doyle con algunas modificaciones para su uso en placas de 96 tubos (Doyle, 1991). Antes de iniciar la extracción, se precalentaron a 65°C 400 µl de tampón de extracción CTAB por muestra, que consistía en una solución de 2% de CTAB, 1.4 M de NaCl, 20 mM de EDTA (pH 8) y 100 mM de Tris (pH 8).

Tras moler las muestras, se añadió β-mercaptoetanol al 0.2% al CTAB justo antes de su uso, dispersándolo rápidamente en las muestras para prevenir la oxidación del ADN. Las muestras se incubaron a 65°C durante 40 minutos, agitándose en un vórtex de 2 a 3 veces durante la incubación para asegurar una buena mezcla del CTAB con el ADN. Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas y se les añadió 400 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se mezclaron mediante inversión 2-3 veces y se centrifugaron a 3300 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, las muestras se separaron en dos fases, transfiriendo la fase acuosa superior a tubos nuevos. A cada muestra se le añadieron 500 µl de isopropanol (almacenado a -20°C), se mezclaron por inversión 2-3 veces y se incubaron a -20°C durante un periodo de 1 a 24 horas para precipitar el ADN. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 3300 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se retiró mediante inversión y se añadieron 500 µl de un tampón de lavado (76% v/v de etanol, 10 mM de acetato de amonio). Se agitó con vórtex hasta despegar el pellet y se centrifugó nuevamente a 3300 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y los tubos se dejaron secar boca abajo durante 2-3 minutos, para luego permitir que el etanol restante se evaporara con los tubos en posición vertical durante 10 minutos. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 30 µl de TE (10 mM, EDTA 1 mM) con 0.2 µl de RNAsa a 10 mg/ml por muestra, incubándose a 37°C durante 1 hora bajo agitación.

Una vez completada la extracción de ADN, se verificó la calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% usando un tampón TAE 1x diluido de 50x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.1) y 7 µl de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml. La agarosa se mezcló con el tampón y se calentó, añadiendo el bromuro de etidio a una temperatura no superior a 60 °C. Luego, se removió y se vertió la mezcla en la bandeja de electroforesis. Para las muestras, se combinaron 2 µl del ADN extraído con 2.5 µl de tampón de carga 6x y 6 µl de agua Milli-Q, y se cargaron en los pocillos del gel. Además, se añadieron cantidades conocidas de ADN Lambda (25, 50 y 100 ng) para la posterior cuantificación. La electroforesis se llevó a cabo con tampón TAE a 90-100 V durante 35-40 minutos. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta, y se calculó la concentración de ADN comparando la intensidad de la banda del ADN Lambda conocido con el de las muestras extraídas. Una vez determinada la concentración, el ADN se diluyó en función del sistema de genotipado.

3.3.2. Genotipado iPLEX® Gold MassARRAY

El genotipado para la selección de las plantas F3 del ensayo de Meliana y las F3 destinadas a generar nuevos recombinantes (ensayo COMAV), así como de las plantas trasplantadas en La Mayora, se realizó con la plataforma iPLEX® Gold MassARRAY (Agena Bioscience GmbH, Hamburg, Alemania; antiguo Sequenom) cuyo servicio se ofrece en el Laboratorio de Epigenética y Genotipado de la Universitat de València (UCIM, Valencia). Esta tecnología se utiliza para la detección de polimorfismos SNP de manera altamente específica y eficiente. El sistema MassArray emplea un método basado en extensión de cebador y en espectrometría de masas posterior para detectar el nucleótido incorporado, y permite el análisis de entre 20-30 SNPs (plex) en una sola reacción (Gabriel et al., 2009). La concentración a la que se prepara el ADN es de 10 ng/μl. Se utilizaron 11 marcadores en la región comprendida entre 683.991 y 2.398.882 para la selección de los recombinantes (Tabla S1) (anexos).

3.3.3. Genotipado PACE

El segundo sistema, empleado para la caracterización de los nuevos recombinantes (ensayo COMAV) y plantas F3 de interés con nuevos marcadores en la zona comprendida entre 1.432.542 y 1.626.117 pb (Tabla S2) (anexos), es la técnica de PCR denominada PACE (PCR Allele Competitive Extension), empleando el sistema Applied Biosystem 7500 Fast disponible en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). Esta metodología se basa en la discriminación alelo-específica para el análisis de SNPs y variaciones de inserción/delección (von Maydell, 2023). Cada reacción de PCR tuvo un volumen total de 10 μl por muestra, compuesto por 5 μl de PACE® 2.0 Genotyping Master mix, 2 μl de ADN diluido a una concentración de 1 ng/μl, 0,138 μl de la mezcla de cebadores y 2,862 μl de agua ultrapura Mili-Q. El proceso de amplificación constó de tres etapas: la primera fase fue una desnaturalización a 94°C durante 15 minutos; la segunda, una desnaturalización a 94°C por 20 segundos, seguida de hibridación y extensión que empezó a 65°C y disminuyó gradualmente a 57°C durante 60 segundos (a un ritmo de 0,8°C por ciclo) a lo largo de 10 ciclos. Finalmente, en la última fase, se realizó una desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, seguida nuevamente de hibridación y extensión a 57°C durante 60 segundos, repitiéndose este ciclo 30 veces. Los resultados se interpretaron utilizando la plataforma Thermo Fisher™ Cloud.

Se empleó la información de polimorfismos obtenidos en la resecuenciación de las variedades TRI y PS (Melonomics v4.0, 2024), a partir de la cual se identificaron nuevos SNPs específicos para el cromosoma 5. Se descartaron aquellos con otros polimorfismos en la región flanquente para evitar problemas de diseño de cebadores. Estos SNPs fueron seleccionados para su uso en el genotipado mediante la técnica PACE®.

Para esta técnica PACE se diseñaron tres oligonucleótidos: dos cebadores directos y un cebador reverso. Los cebadores directos consistían en una secuencia de 16 a 22 nucleótidos, que incluían la base correspondiente al SNP en la última posición 3', de manera que cada directo poseía una variante distinta del SNP en esa posición final (oligo específico de alelo). En cuanto al cebador reverso (específico de locus), este corresponde a la secuencia complementaria a la región inmediatamente posterior al SNP, con una longitud de entre 28 y 30 nucleótidos.

3.4. Cultivo y fenotipado

El cultivo en los ensayos de Meliana y La Mayora se realizó a una guía, y a dos en el COMAV, con el propósito de obtener un fruto por guía. En el caso del COMAV las polinizaciones fueron manuales y se guardaron semillas para la siguiente generación (nuevos recombinantes), mientras que en Meliana y La Mayora sólo se utilizó el fruto para evaluar el tamaño, observar las familias segregantes y acotar el QTL. Las polinizaciones controladas se llevaron a cabo previa colocación de bolsas en pre-antesis para asegurar un control riguroso de la polinización, y los frutos se recolectaron aproximadamente 55 días después de esta. En Meliana y Málaga se utilizó polinización libre por abejorros y se anotaba la fecha de cuajado cuando éste era visible para cosechar a los 50 días (junio-julio).

Para el fenotipado, los frutos se pesaron con una balanza para determinar el peso (FW) y se midieron utilizando una regla, evaluando la longitud (FL), el diámetro (FD) y el diámetro de la pulpa; además, se calculó el Índice de Forma del Fruto (FSI), definido como la relación entre la longitud y el diámetro (FL/FD); y la proporción de pulpa (FFP), definido como la relación entre el diámetro de pulpa y el diámetro total del fruto (FP/FD). Además, los frutos fueron fotografiados tras la cosecha para su caracterización posterior.

3.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos, tanto en el ensayo de desarrollo como en el de mapeo y generación de recombinantes, fueron analizados posteriormente utilizando medias y desviaciones estándar, mediante el software Excel y el programa de análisis estadístico JMP v.5.1.2. Para los parentales PS y TRI05-2 cultivados en Meliana y La Mayora se analizaron los efectos de genotipo, ambiente y las interacciones genotipo-ambiente mediante un ANOVA de dos vías, para verificar el QTL y como condición necesaria para combinar los datos de ambas localidades.

Para examinar la asociación entre los marcadores genéticos y los fenotipos, se realizó un ANOVA con el objetivo de calcular el estadístico F y así identificar los marcadores más probablemente asociados con los caracteres evaluados (FW, FL, FD, FSI y FFP). Para que una prueba se considere estadísticamente significativa, su valor de P debe ser menor a 0,005, valor calculado con la corrección de Bonferroni que consiste en dividir el nivel de significancia alpha entre el número de pruebas que se están realizando. Este ajuste se utiliza para controlar la tasa de error familiar y reducir el riesgo de obtener falsos positivos al realizar múltiples comparaciones. La aditividad (a) para un carácter determinado se calculó como la diferencia de valores para ese carácter de los homocigotos dividido entre 2. La dominancia (d) se calculó como la diferencia del valor para el heterocigoto y el promedio de los homocigotos para el carácter. La acción génica se calculó como la relación entre la dominancia y el valor absoluto de la aditividad $d/[a]$, y r^2 indica el porcentaje de variación del carácter explicado para cada marcador.

Para el ensayo de Meliana se realizó el análisis para el global de las plantas de las 6 familias, mientras que en el caso del ensayo de La Mayora se realizó por familia, al haber más plantas dentro de familia.

4. Resultados y discusión

4.1. Verificación y efecto del QTL.

Para la verificación del QTL en estudio, se evaluaron en dos ambientes (Meliana y La Mayora) la variedad de referencia PS y la IL TRI05-2, con fondo genético PS y portadora de una introgresión de TRI de 1,7 Mpb en el cromosoma 5. Se recopiló la información de los frutos cosechados (1/planta) procedentes de estas líneas para evaluar el efecto del QTL (genotipo G), de la localidad (ambiente L) y de la interacción entre genotipo y las distintas localidades (G x L). Se evaluaron los siguientes caracteres: FW, FL, FD, FSI, FP y FFP. Se consideró un efecto significativo para valores de $P < 0.005$ (aplicada la corrección de Bonferroni).

Tabla 2. Media y desviación estándar para cada carácter evaluado de las líneas PS y TRI05-2 en los ensayos de La Mayora y Meliana, junto con los efectos de genotipo, localidad, interacción genotipo x localidad y su significancia.

Genotipo	Localidad	FW (g)	FL (cm)	FD (cm)	FSI	FP(cm)	FFP
PS	La Mayora	1666,22±256,34	16,89±0,98	13,66±0,67	1,24±0,05	9,00±0,52	66,00±2,47
	Meliana	2255,67±581,38	20,15±2,57	14,25±1,04	1,41±0,15	9,50±0,98	66,79±6,02
TRI05-2	La Mayora	3140,20±514,54	21,75±0,97	16,98±0,95	1,28±0,07	11,68±0,88	68,74±3,02
	Meliana	2932,67±604,70	21,41±2,80	16,41±1,60	1,31±0,22	11,14±1,83	67,76±7,09
P* (<0.005)	Genotipo (G)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	n.s.	<0,0001	n.s.
	Localidad (L)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	GxL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*

P-valor con corrección de Bonferroni

n.s. indica no significancia de genotipo, localidad o G x L, respecto al carácter.

En el análisis estadístico se observó que el genotipo es un factor significativo en todos los caracteres ($p < 0.005$) excepto en FSI y FFP. Campos et al. (2023) también obtuvieron los mismos resultados, excepto para FFP para el que sí que encontró efecto significativo en TRI05-2.

En la Tabla 2, se observa que la línea TRI05-2 (3.036 g de media) tiene un mayor FW en ambas localidades, superando notablemente a PS (1.960 g de media). En cuanto a la longitud, los frutos de TRI05-2 también fueron significativamente más largos en ambas localidades; en La Mayora la longitud alcanza los 21,75 cm frente a los 16,89 de PS y en Meliana, ambas líneas presentaron frutos más largos pero TRI05-2 siguió teniendo una longitud mayor que PS (21,41 cm frente a 20,15 cm). Con respecto al diámetro se observó el mismo patrón, frutos de TRI05-2 superiores a los de PS en ambas localidades. El grosor de la pulpa se mostró también con un patrón similar. Tampoco se encontró un efecto

significativo de localidad e interacción G x L, lo que indica, según nuestros resultados, el genotipo es el factor más importante en la variación de estos caracteres.

Para el carácter FW estos resultados se muestran gráficamente en la Fig. 4, mostrando un notable efecto de genotipo debido al QTL.

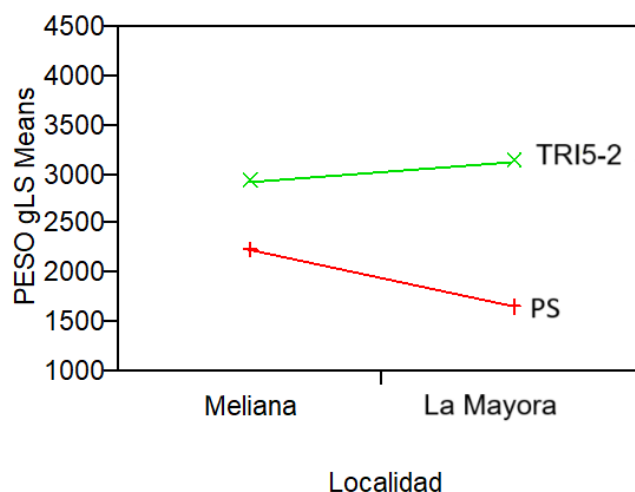


Fig. 4. Comparación del peso(g) de frutos entre localidades (Meliana y La Mayora) en las líneas de estudio PS y TRI05-2. El eje Y representa el peso en gramos de los frutos, con valores entre 1000 y 4500 gramos, mientras que en el eje X se representa las localidades en las que se llevó a cabo el estudio.

El estudio en las dos localidades permitió evaluar los efectos del QTL bajo diferentes condiciones ambientales. En términos de peso y tamaño del fruto, se confirmó que la línea TRI05-2 presenta valores significativamente superiores en ambas localidades (Fig. 4). Esto indica que el QTL presenta una cierta estabilidad genética sin que el ambiente afecte de manera significativa su expresión. Estos resultados refuerzan la robustez del QTL del cromosoma 5, resaltando su potencial para su aplicación en programas de mejora genética, ya que su efecto sobre el tamaño y peso es independiente del entorno según estos resultados. Este carácter de estabilidad genotípica, sin efectos significativos de la interacción genotipo-ambiente, es favorable en contextos de producción.

4.2. Efecto del QTL durante el desarrollo del fruto.

Este estudio implicó la toma de datos para los caracteres de tamaño FL y FD de los frutos cuajados de PS y la IL TRI05-2, a lo largo del tiempo desde la antesis. Para TRI05-2 fue tomada diariamente, mientras que en PS se tomó cada dos días. Esto se realizó así puesto que el aumento en el crecimiento de TRI05-2 se observó en etapas tempranas en estudios previos de Manuel Campos. Para el estudio solo se tomaron en cuenta las medidas hasta el día 36 debido a que con posterioridad a este día no tampoco se observaron cambios.

4.2.1. Efecto del QTL en los valores de longitud y diámetro

En este apartado se analizará los efectos de los QTLs en las medidas de longitud y diámetro del fruto.

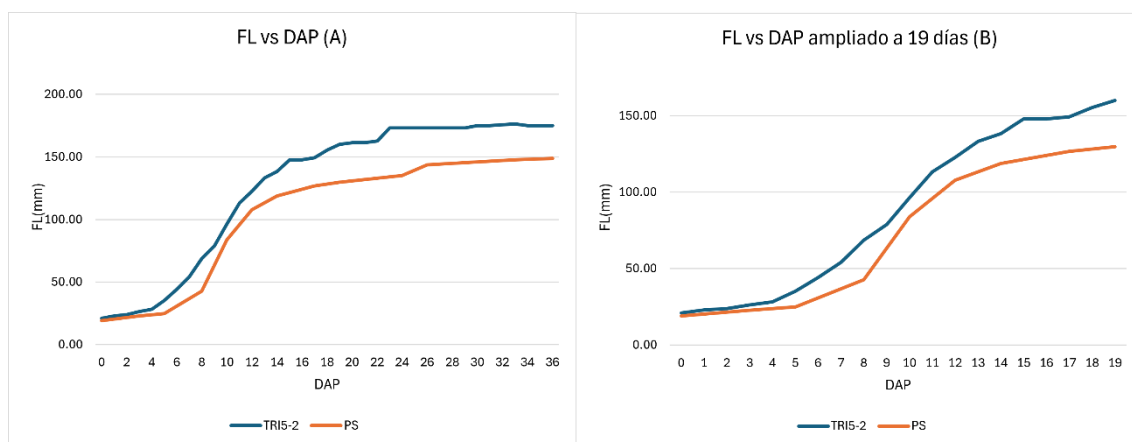


Fig 5. (A) Gráfico de longitud medido a 36 días para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2. (B) Mismo gráfico ampliado a los 19 primeros días. En el eje X se representa los días después de la polinización (DAP) frente a las medidas de longitud (FL) en el eje Y.

Para la longitud, ambas líneas (Fig. 5) muestran un crecimiento similar en los primeros días (0-4), con un aumento gradual en la longitud, pero se observa que TRI05-2 comienza a mostrar un mayor crecimiento en comparación con PS tras el cuarto día, separándose de PS. TRI05-2 continúa incrementando su longitud a un mayor ritmo que PS. Además, se observa que PS parece alcanzar una meseta a partir del día 15, con un crecimiento más lento, mientras que TRI05-2 sigue creciendo constantemente hasta el día 23. Posteriormente parece que TRI05-2 también alcanza una meseta y se estabiliza.

Con respecto al diámetro (Fig. 6), ambas líneas muestran una tendencia ascendente, sin embargo, los valores de TRI05-2 son ligeramente más altos a partir del día 5. En etapas tempranas (0-4 días) tanto TRI05-2 como PS comienzan de forma similar, no hay casi diferencias en el crecimiento. A partir del día 5, se observa un aumento más pronunciado en TRI05-2, superando a PS, mientras que este ocurre más tardíamente (día 8) en PS. A partir del día 11, TRI05-2 continúa aumentando y se mantiene por encima de PS, el cual sigue una trayectoria más estable y un aumento menos pronunciado. Posteriormente al día 23, ambas curvas parecen estabilizarse, pero TRI05-2 mantiene un valor más alto en general.

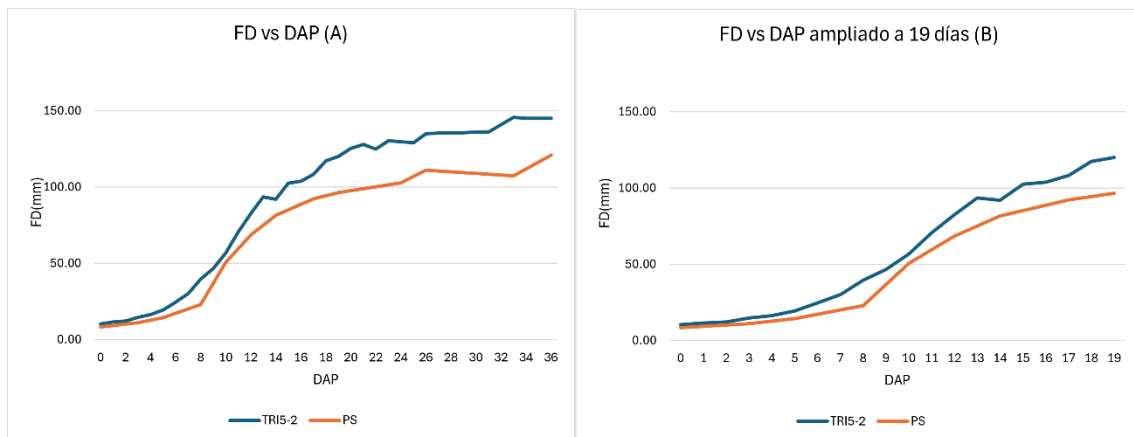


Fig 6. (A) Gráfico de diámetro medido a 36 días para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2. (B) Mismo gráfico ampliado a los 19 primeros días. En el eje X se representa los días después de la polinización (DAP) frente a las medidas de diámetro (FD) en el eje Y.

Esto sugiere que el QTL no solo influye en el crecimiento de longitud y diámetro inicial, sino que impulsa un desarrollo acelerado y sostenido hasta el día 23, donde se observa un estancamiento en ambas líneas. Este comportamiento, especialmente en el diámetro del fruto, es notable, ya que sugiere que el QTL posee un control genético temprano que parece prolongar el crecimiento en la línea TRI05-2, maximizando su tamaño final. Esto puede estar vinculado con genes que afectan la proliferación y/o expansión celular de manera más prolongada en el tiempo. En otros estudios anteriores en melón (Higashi et al., 1999), las diferencias en el tamaño del fruto entre los genotipos Fuyu A y Natsu 4 están determinadas principalmente por el número de células en el pericarpio, más que por su tamaño. Fuyu A extiende el periodo de proliferación celular a 26 días, en comparación con los 11 días de Natsu 4, permitiendo un mayor número de células que se traduce en frutos más grandes. Este comportamiento sugiere que la regulación del periodo de proliferación celular es un mecanismo conservado en distintas especies para determinar el tamaño del fruto (Higashi et al., 1999). Además, en estudios en tomate (Cong et al., 2002), el QTL fw2.2 actúa como un regulador negativo de la división celular, limitando el número total de células en frutos con mayor expresión del gen. Las diferencias en la regulación heterocrónica (cambio en el ritmo de un proceso ontogénico) del QTL fw2.2 entre las variantes de fruto grande y pequeño destacan cómo el alargamiento del periodo de división celular contribuye al incremento del tamaño del fruto donde la variante de fruto grande prolonga la actividad mitótica hasta los 12 días después de la antesis, contribuyendo a un mayor número de células y, por ende, frutos más grandes, mientras que la variante de fruto pequeño presenta un aumento más rápido pero de menor duración (Cong et al., 2002).

4.2.2. Efecto del QTL en el incremento de longitud y diámetro

En este apartado se analizarán los valores de incremento (Δ). Esto permite medir la tasa de crecimiento diaria, además de facilitar la identificación de cambios bruscos o estancamientos. También ayuda a analizar patrones de aceleración o desaceleración a lo largo del desarrollo del fruto.

Con respecto a la tasa de crecimiento de longitud (Fig. 7), TRI05-2 comienza a incrementar más rápido alrededor del día 5. Entre los días 5 y 10, ambas líneas muestran un incremento significativo en el crecimiento. Sin embargo, TRI05-2 alcanza su pico de crecimiento más rápidamente, el día 8 con un 95% de incremento mientras que PS alcanza su pico en el día 10, siendo su tasa máxima de crecimiento ligeramente más alta que la de TRI05-2 (96%). Tras alcanzar su máxima velocidad de crecimiento, ambas líneas experimentan una rápida disminución en la tasa de crecimiento, cayendo a valores cercanos a 0. A partir del día 15 las tasas de crecimiento de ambas líneas se estabilizan en valores bajos con pequeñas variaciones, el patrón de crecimiento entre TRI05-2 y PS es idéntico a partir de 12 DAP. Ambas líneas presentan una fase de crecimiento acelerado entre los días 5 y 10, pero TRI05-2 alcanza su pico un poco antes que PS, lo que indica que esos días son un periodo clave en el crecimiento.

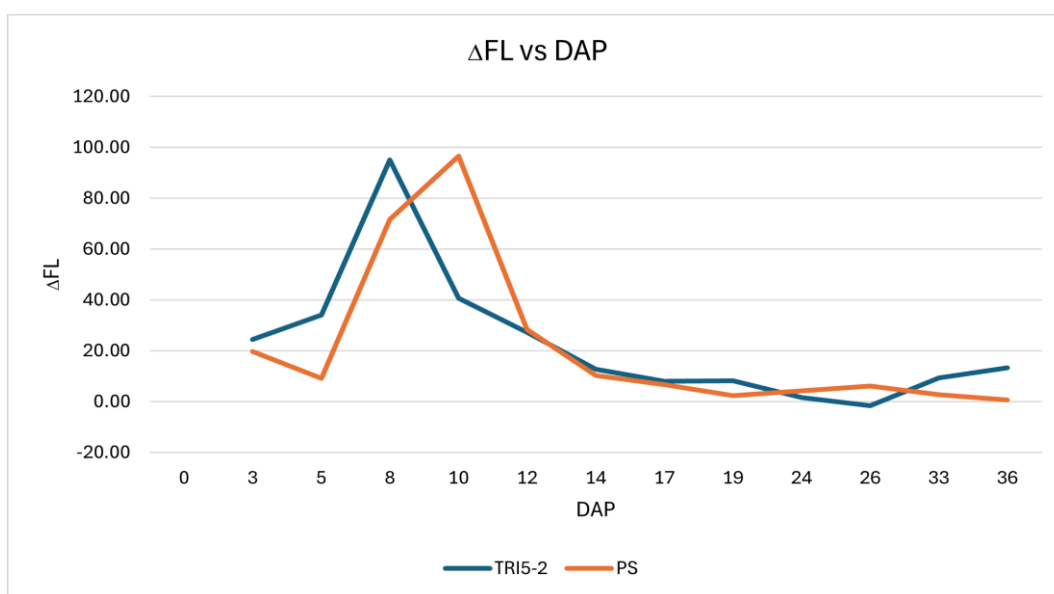


Fig 7. Gráfico del incremento de longitud del fruto (FL) en mm durante 36 días (DAP) para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2.

Al igual que en FL, la tasa de crecimiento de FD (Fig. 8) en TRI05-2 llega a su valor máximo antes que en PS, alcanzando un pico el día 8 (103%), pero ligeramente más bajo que el de PS (120%). Posterior al día 12, ambas curvas presentan una disminución notable en la variación del diámetro, lo que significa un descenso en la tasa de crecimiento. A partir del día 17, la tasa de crecimiento se estabiliza acercándose a 0, por lo que no hay variación en el diámetro.

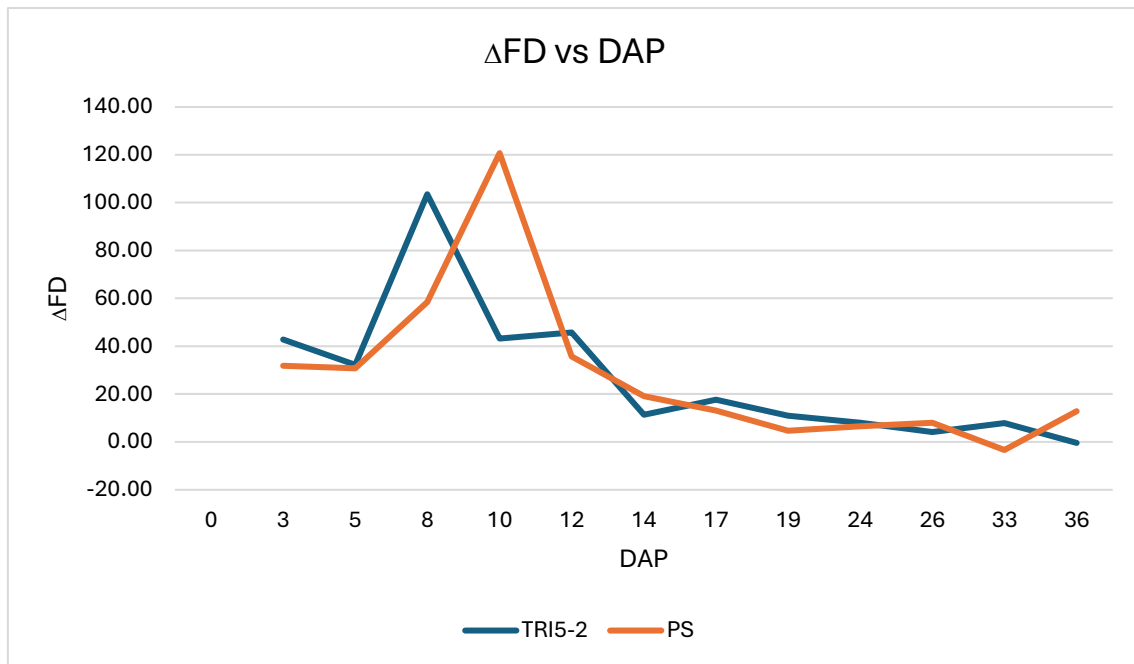


Fig 8. Gráfico del incremento de diámetro del fruto (FD) en mm durante 36 días (DAP) para las líneas de desarrollo PS y TRI05-2.

En cuanto al incremento, se observa que TRI05-2 alcanza su máxima velocidad de crecimiento en longitud y diámetro entre los días 8 y 10, mientras que PS muestra un pico similar en el crecimiento del diámetro ligeramente posterior (día 10). Ambas líneas desaceleran después del pico máximo, lo que indica un proceso de regulación del QTL que limita el crecimiento posterior. La disminución rápida en las tasas de crecimiento para ambas líneas, y la estabilización observada, sugieren que el QTL actúa principalmente en una fase temprana del desarrollo, maximizando el tamaño inicial del fruto en TRI05-2. Este patrón sugiere un mecanismo regulador similar al de Fuyu A (Higashi et al., 1999), donde el QTL prolonga el periodo de proliferación celular en las primeras etapas del desarrollo. La aceleración observada entre los días 5 y 10 en TRI05-2 resalta el impacto del QTL en maximizar el número de células en etapas iniciales, mientras que la desaceleración posterior refleja un proceso regulatorio que limita el crecimiento en etapas tardías. Además, este patrón de acción temprana es consistente con el modelo propuesto en el estudio de Cong et al. (2002) para el QTL fw2.2 en tomate, donde la regulación heterocrónica influye directamente en la tasa de proliferación celular, lo que define las dimensiones iniciales del fruto.

Estudios futuros en la IL TRI05-2 atendiendo a estas variables de número de células/fruto y tamaño celular a lo largo del desarrollo del fruto con respecto a PS ayudarían a entender el mecanismo real de acción de este QTL. Por otra parte, estudios del nivel de ploidía durante el desarrollo también serían necesarios, pues en frutos modelo como el tomate el tamaño viene determinado en parte por procesos de endoreduplicación (Chevalier et al., 2011).

4.3. Mapeo fino

4.3.1 Saturación con nuevos marcadores

La inclusión de nuevos marcadores permite afinar aún más la identificación de la región del QTL. Por ello, se diseñaron 4 nuevos marcadores (Tabla S2 anexos) en una zona en la cual

se sospechaba que se encontraba previamente el QTL en ensayos anteriores del grupo, a razón de 1 marcador cada 40kb aproximadamente en la región comprendida entre los marcadores chr05_1433 y chr05_1626 como zona más probable para definir mejor la posición de los puntos de recombinación en las familias seleccionadas para los ensayos de La Mayora y Meliana (Tabla 3). Estos marcadores fueron: chr05_1462(en la posición 1,462,252 pb), chr05_1501 (1,501,986 pb), chr05_1541 (1,541,116 pb) y finalmente chr05_1587 (1,587,366pb) (Melonomics v4.0, Castanera et al., 2020). Con estos marcadores se genotipó un conjunto de 18 plantas seleccionadas en las familias con recombinación entre Chr05_1433 y Chr05_1626 (24M20, 24;21, 24;11 y 24M15, Tabla 4), y con los resultados se imputó el genotipo del resto de plantas.

Tabla 3. Genotipo de las plantas seleccionadas en Meliana y La Mayora tras realizar PACE con los cuatro nuevos marcadores en naranja entre los dos flanqueantes anteriores: chr05_1433 y chr05_1626.

PS indica homocigoto para el alelo PS, TRI indica homocigoto para el alelo TRI.

Localidad	Planta	chr05_684	chr05_1058	chr05_1204	chr05_1302	chr05_1433	chr05_1466	chr05_1501	chr05_1541	chr05_1587	chr05_1626	chr05_1832	chr05_1957	chr05_2077	chr05_2103	chr05_2282
LA MAYORA	24M20-7	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M20-13	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M20-22	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M21-2	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
	24M21-3	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
	24M21-8	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
MELIANA	24M11-11	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-15	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-16	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-19	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-2	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-35	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-5	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-52	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M11-53	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M15-13	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M15-51	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
	24M15-8	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI

4.3.2. Experimento en Meliana

Las 360 plántulas de las 6 familias 24M10 - 24M15 (ver genotipo de las familias en Tabla 4) se genotiparon mediante la plataforma iPLEX® Gold MassARRAY y la técnica PACE (como se explica en el punto 3.3.) para seleccionar homocigóticas PS o TRI (total de 107 plantas, de las cuales finalmente sobrevivieron 83 por problemas de aclimatación) para su trasplante y cultivo en Meliana. El genotipo de las plantas de estas familias crecidas en Meliana se muestra en la Tabla S3 (anexos).

Tabla 4. Genotipo de las madres F₂ utilizadas para obtener la descendencia estudiada F₃ en Meliana

Pedigree F ₃	Pedigree madres F ₂	chr05_684	chr05_1058	chr05_1204	chr05_1302	chr05_1433	chr05_1466	chr05_1501	chr05_1541	chr05_1587	chr05_1626	chr05_1832	chr05_1957	chr05_2077	chr05_2103	chr05_2282
24M10	23M50-133	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M11	23M50-178	PS	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M12	23M50-164	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13	23M50-003	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS
24M14	23M50-126	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M15	23M50-104	PS	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Posteriormente, se recopiló la información de los frutos cosechados (Tabla 5) para realizar un análisis por familias, pero al no haber suficientes plantas para realizar un análisis robusto, se realizó un análisis poblacional (Fig. 9) en Meliana incluyendo las 6 familias (24M10 – 24M15) para cada uno de los caracteres evaluados.

Tabla 5. Media y desviación estándar del peso de los frutos de las distintas familias en Meliana.

Genotipo	FW (g)
24M10	2.554,50 ± 657,71
24M11	1.636,33± 738,00
24M12	2.443,43± 874,52
24M13	2.692,80 ± 968,65
24M14	2.563,36 ± 735,68
24M15	2.174,60± 543,10
PS	2255,67±581,38
TRI05-2	2932,67±604,70

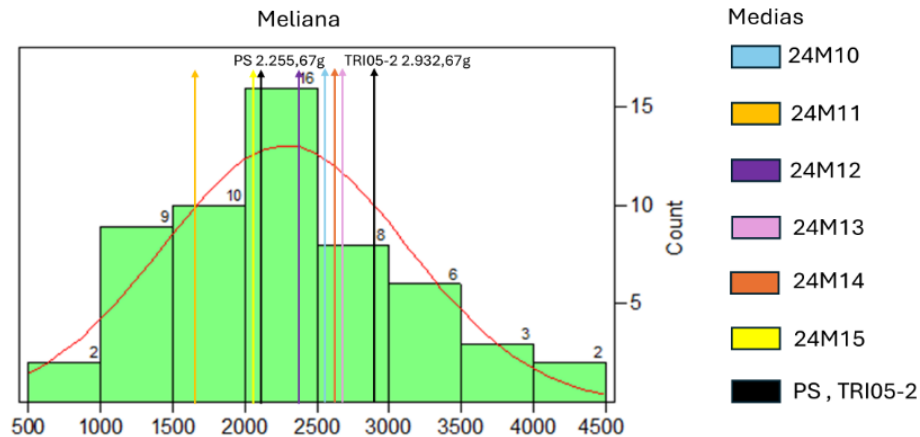


Fig 9. Distribución de la población de Meliana con respecto al peso (FW) de los frutos.

En el eje X se presentan los distintos pesos y se señala con una barra negra donde se encuentran las medias de TRI05-2 y PS en esta localidad. Cada barra representa la cantidad de frutos comprendidos entre cada intervalo de peso. La curva roja representa la línea de la aproximación a una distribución normal.

Para el carácter FW (Fig. 9), se observa una dispersión en la distribución del peso de los frutos, desde menos de 1000 gramos hasta alrededor de 4000 gramos, lo que indica una considerable variabilidad en la población. Se observa que, aunque la mayoría de los frutos se encuentran distribuidos en la media de PS, hay una importante cantidad de frutos con un peso superior. La variabilidad observada sugiere que en la distribución existe una dispersión notable en el peso individual de los frutos, lo que confirma la segregación del QTL implicado en FW.

El análisis estadístico realizado con los datos de genotipado para los 11 SNPs de la plataforma iPLEX y los 4 SNPs de PACE (Tablas S1 y S2 anexos) junto con el fenotipado (FW, FL, FD, pulpa y % pulpa) de las plantas F₃ de Meliana permitió obtener el estadístico F para cada marcador y carácter (Fig. 10), donde valores de F más altos indican una mayor probabilidad de que el carácter esté asociado con ese marcador específico.

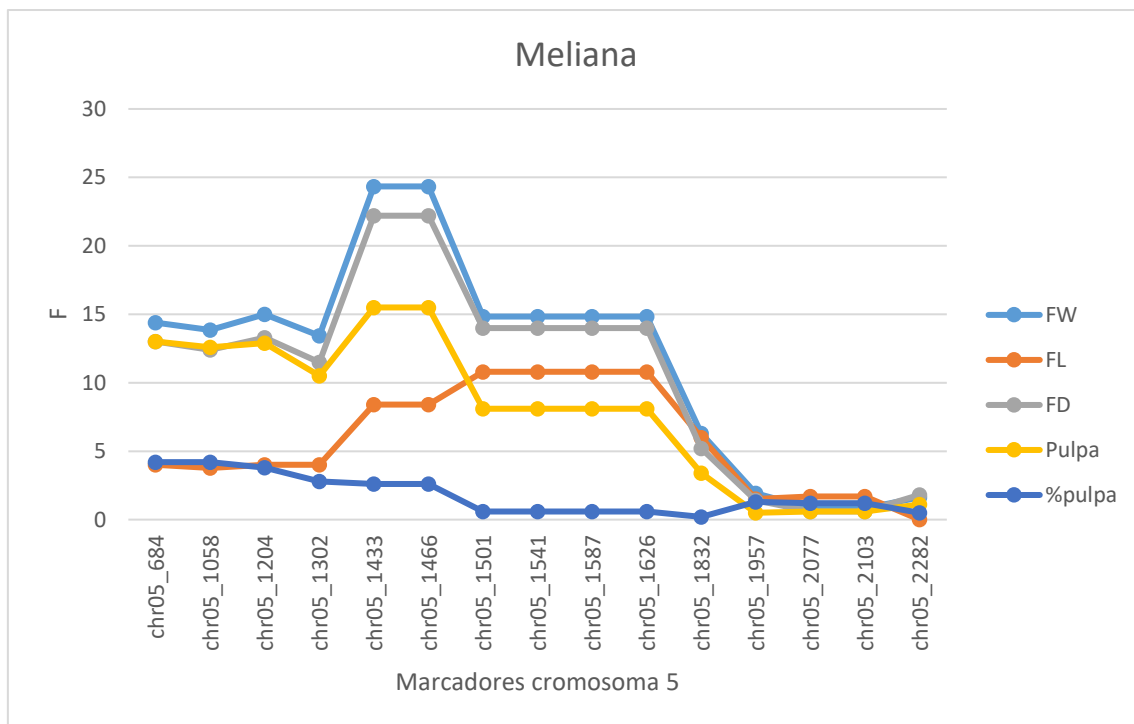


Fig 10. Asociación de los distintos caracteres evaluados con cada marcador representada con el estadístico F obtenido del ANOVA para el ensayo de Meliana.

En el eje X se representan los distintos marcadores y en el eje Y los valores de F, con respecto a cada carácter.

En la gráfica (Fig. 10) se observa que, para la mayoría de los caracteres, hay un pico pronunciado alrededor de los marcadores chr05_1433 y chr05_1626 (posiciones 1.432.542 y 1.626.117 pb), lo que indica que los marcadores abarcados entre estos dos marcadores tienen una alta probabilidad de estar asociados con ellos, a diferencia del porcentaje de pulpa que no arroja valor significativo en ningún marcador. Además, los valores P para estos marcadores indican asociación significativa ($P < 0,005$), lo que refuerza el resultado. Al alejarse de esta región de marcadores con mayor valor de F, todos los caracteres presentan una caída en la probabilidad de asociación, por lo que más allá de este punto la probabilidad de que los marcadores estén asociados disminuye considerablemente, desapareciendo prácticamente a partir del marcador chr05_1957.

En la Tabla 6 se resumen los resultados de los ANOVA para cada carácter en el que se ha observado significación y para el marcador con mayor valor del estadístico F para cada carácter.

Tabla 6. Análisis de asociación de caracteres con los marcadores del cromosoma 5 empleados en el ensayo de Meliana.

Se indican los valores de aditividad (a), dominancia (d), acción génica $d/[a]$ y r^2 de aquellos marcadores con mayor probabilidad de asociación junto con su valor de significancia (p).

	F	P* (<0.005)	a	d	d/[a]	r^2
FW (chr05_1433)	24,3	<0,0001	708,5	460,5	0,65	0,48
FL (chr05_1626)	10,8	0,0001	1,6	1,4	0,87	0,29
FD (chr05_1433)	22,2	<0,0001	1,4	1,0	0,71	0,46
Pulpa (chr05_1433)	15,5	<0,0001	1,2	0,6	0,50	0,37

* con corrección Bonferroni

Se observa que los caracteres con mayor probabilidad de estar asociados con marcadores son el peso y el diámetro (siendo el marcador chr05_1433), seguidos por pulpa y la longitud (marcadores chr05_1433 y chr05_1626). No obstante, todos los caracteres tienen valores P extremadamente significativos, lo que confirma que las asociaciones son reales y no producto del azar. Con respecto al modo de acción génica, se observa que es >0,5, lo que indica una dominancia parcial, en la que el valor heterocigoto se aproxima al valor del homocigoto TRI.

Estos datos sugieren que, puesto que los SNPs más asociados son chr05_1433 y chr05_1466, los marcadores flanqueantes chr05_1302 y chr05_1501 estarían acotando el QTL de tamaño de fruto del cromosoma 5 de la IL TRI05-2 a una región de unas 200 Kpb. Sin embargo, no podemos descartar la zona que abarca hasta el marcador chr05_1832, pues también presenta un valor alto del estadístico F.

4.3.3. Experimento en La Mayora

Simultáneamente al análisis del ensayo en Meliana, se realizó un análisis por familia con los datos recopilados de la cosecha de La Mayora donde se analizaron 45 plantas de cada una de las familias F₃ 24M20 y 24M21. Se recogieron los datos de la cosecha y se obtuvieron las medias, desviación estándar y las distribuciones de cada familia (Tabla 8, Fig. 11).

Tabla 7. Genotipo de las madres F₂ utilizadas para obtener la descendencia estudiada F₃ en Meliana

Pedigree F3	Pedigree madres F2	chr05_684	chr05_1058	chr05_1204	chr05_1302	chr05_1433	chr05_1466	chr05_1501	chr05_1541	chr05_1587	chr05_1626	chr05_1832	chr05_1957	chr05_2077	chr05_2103	chr05_2282
24M20	23M50-119	H	H	H	H	H	H	H	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M21	23M50-181	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Tabla 8. Medias y desviaciones estándar para FW de las líneas 24M20, 24M21, PS y TRI05-2 en La Mayora.

Genotipo	FW (g)
24M20	3335,88±762,35
24M21	2873,85±867,49
PS	1666,22±256,34
TRI05-2	3140,20±514,54

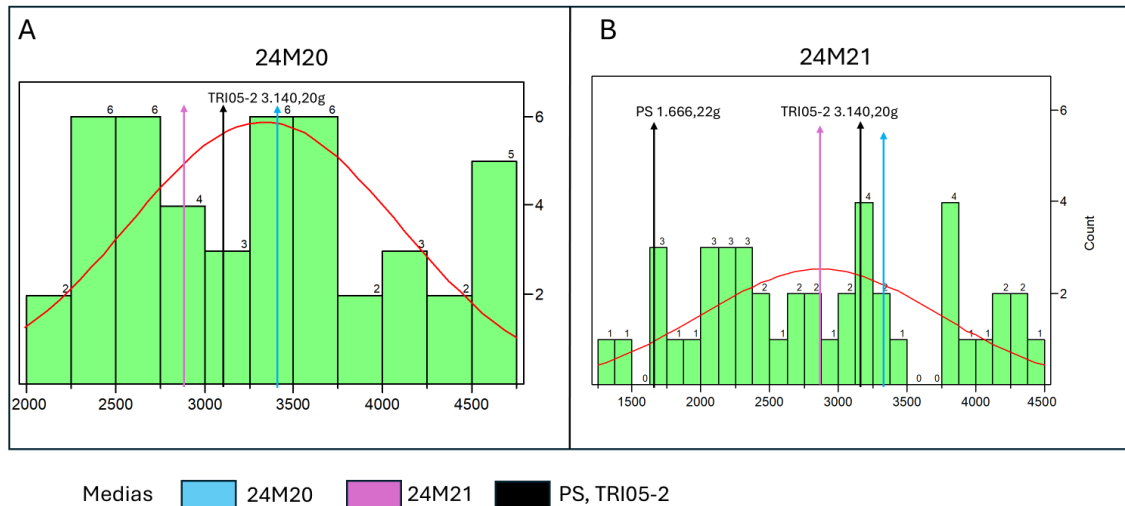


Fig. 11. Distribución de la población 24M20 y 24M21 en La Mayora con respecto al peso (FW) de los frutos.

(A) Distribución de la población 24M20. (B) Distribución de la población 24M21. En el eje X se presentan los distintos pesos y se señala con una barra negra donde se encuentran las medias de TRI05-2 y PS en este ensayo. Cada barra representa la cantidad de frutos comprendidos entre cada intervalo de peso. La curva roja representa la línea de tendencia.

La familia 24M20 mostró una distribución concentrada de pesos de fruto (FW), con valores entre 2.000 y 4.750 gramos. Esta distribución está centrada en la media de TRI05-2, lo que sugiere que el QTL asociado a esta línea está fijado y no segrega. Los pesos de PS no se representan en este rango, ya que son considerablemente inferiores al mínimo registrado en esta familia, lo que confirma que los frutos de PS presentan pesos significativamente menores en comparación con los de 24M20.

Por otro lado, la familia 24M21 presentó una distribución más amplia de pesos, con valores entre 1.500 y 4.000 gramos. Esto refleja segregación para FW, con frutos que presentan características similares a PS y a TRI05-2. Aunque los valores de la distribución están centrados aproximadamente con la media de TRI05-2, los valores más bajos están cercanos a la media de PS, indicando una mayor heterogeneidad en esta familia en comparación con 24M20.

Los resultados del genotipado con la plataforma iPLEX y la técnica PACE de la población de plántulas F3 de este ensayo de La Mayora se muestra en la Tabla S4 (anexos). Estos se analizaron junto con los datos de fenotipado para tratar de acotar el QTL. Al contrario que en el ensayo de Meliana, en este caso se realizó un ANOVA de cada familia por separado para separar el análisis de las dos regiones segregantes, para las que no había solape antes de incluir nuevos marcadores en estas dos familias: la región a la izquierda del marcador chr05_1501 en la familia 24M20, y la región a la derecha del marcador chr05_1433 en la familia 24M21. (Tabla S4) (anexos).

Los datos que aporta la familia 24M20 sugieren que en la región chr05_684 a chr05_1501, no existe ninguna asociación significativa con ninguno de los caracteres por lo que no está el QTL en esa región.

La familia 24M21 presenta un valor estadístico F significativo en los marcadores de la región segregante, (comprendida entre los SNPs chr05_1433 y chr05_2282) por lo que esta región

sería la implicada en el carácter. En la Fig. 12 se representa, para cada carácter, el valor del estadístico F para cada marcador de la región segregante. En la Tabla 9 se presenta el resumen de los resultados de los ANOVAs realizados para cada carácter analizado que ha presentado significación.

Tabla 9. Análisis de asociación de caracteres con marcadores del cromosoma 5 en la familia 24M21 de La Mayora.

Se indican los valores de aditividad (a), dominancia (d), acción génica d/[a] y r² de aquellos marcadores con mayor probabilidad de asociación junto con su valor de significancia (p).

	F	P* (<0,0005)	a	d	d/[a]	r ²
FW (chr05_2077)	12,6	<0,0001	706,5	272,5	0,39	0,38
FL (chr05_2077)	11,7	0,0003	1,85	0,95	0,51	0,49
FD (chr05_1626)	13	0,0001	1,35	1,85	1,37	0,52
Pulpa (chr05_1626)	9,4	0,001	0,5	2,1	4,2	0,43

*con corrección Bonferroni

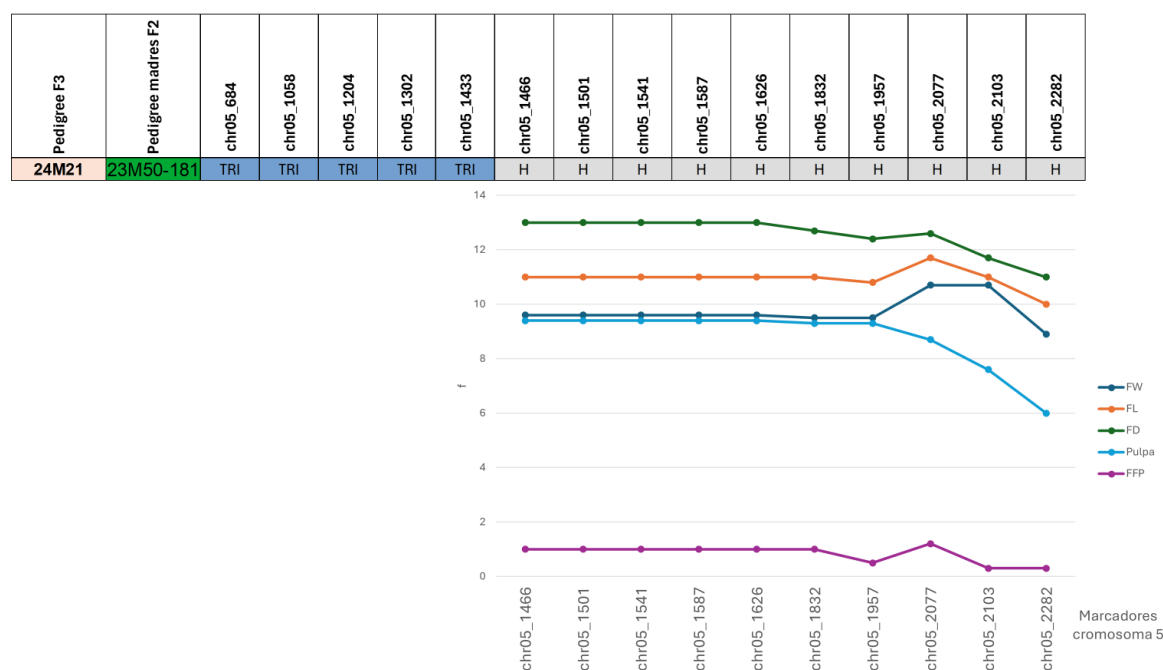


Fig 12. Asociación de los distintos caracteres evaluados con cada marcador representada con el estadístico F obtenido del ANOVA para la familia 24M21 del ensayo de La Mayora.

Con respecto a la familia 24M21, podemos observar en la Fig. 12, que el valor del estadístico F que mide la asociación para el carácter peso se encuentra entre 9 y 11, siendo todos significativos (P < 0.0005). No obstante, estos valores son altos en todos los marcadores para los distintos caracteres en la región segregante de esta familia. Por otra parte, la relación entre dominancia y aditividad sigue indicando que el modo de acción génica es dominancia parcial.

La variación del estadístico F a lo largo de la región es muy pequeña, ya que el número de recombinantes es bajo, por lo que no puede determinarse la posición del QTL dentro de la región de la introgresión de 24M21. El hecho de que no exista asociación en la región segregante a la izquierda del marcador chr05_1501 refuerza la idea de que el QTL se encuentra a la derecha de esa zona.

4.3.4. Integración de resultados y mapeo final

Al analizar la asociación de marcadores en La Mayora y Meliana, se determinan dos resultados:

-En Meliana, se observa la asociación más probable en la región comprendida entre los marcadores chr05_1433 y chr05_1466. También está asociada con menor probabilidad la zona que abarca hasta el marcador chr05_1832.

-En La Mayora, no existe asociación en la región segregante de la familia 24M20, lo que indica que el QTL está a la derecha del marcador chr05_1501. Por otro lado, la región segregante de la familia 24M21, presenta un alto valor estadístico F de asociación en los caracteres, siendo esta la comprendida entre los marcadores chr05_1466 y chr05_2282.

Estos resultados permitieron generar un mapa físico (Fig. 13) que integró los resultados observados en las diferentes localizaciones para que acote aún más la región en la que más probablemente se encuentre el QTL.

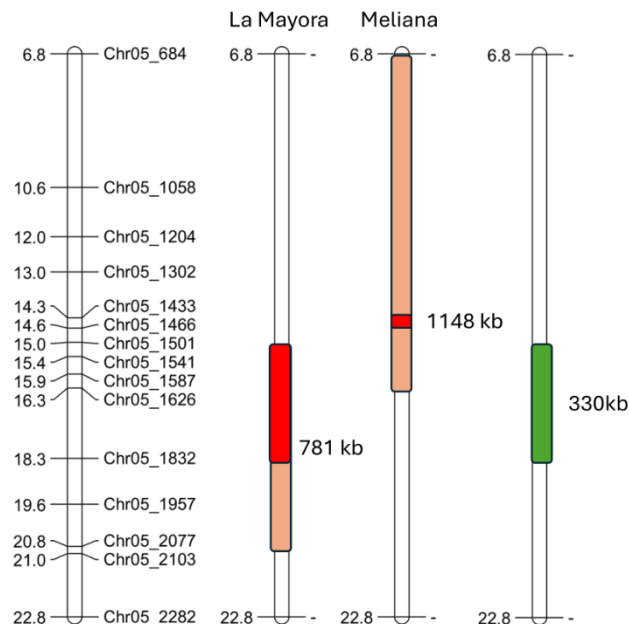


Fig 13. Mapas físicos que integran los resultados obtenidos en la asociación de marcadores en La Mayora y Meliana.

El mapa físico contiene la posición física (Mb) en el genoma DHL92 v4.0. En marrón se marcan las regiones asociadas, en rojo la región más asociada dentro de cada localidad, y en verde la región resultante de combinar ambos resultados.

En La Mayora, la región asociada abarca un intervalo de 781kb, con una subregión más estrecha marcada en rojo que indica el área con mayor probabilidad de contener el QTL estudiado (valor más alto de F). Por otro lado, en Meliana, la región asociada es más amplia, cubriendo 1.148kb, aunque también se identifica una subregión más específica en rojo que concentra la asociación más fuerte.

Al combinar los resultados de ambas localidades, se obtiene una región común más precisa de 330kb, representada en verde. Este intervalo es la zona de mayor interés, pues está presente en ambas localidades y condensa las asociaciones más significativas, lo que la convierte en una región candidata para estudios posteriores.

En este análisis se destaca la importancia de trabajar con datos de diferentes entornos para identificar regiones genómicas relevantes. La superposición de los resultados reduce el intervalo a un segmento más específico que el inicial de 1.714kb proveniente de la línea de introgresión generada por Campos et al. (2023), lo que facilita futuros análisis. La región en verde será el objetivo principal para profundizar en el estudio del QTL.

Adicionalmente, en la región mapeada se identificaron 32 genes anotados en el genoma de referencia (DHL92 PacBio v4.0) (Tabla S5) (anexos). Aunque el genoma de TRI (ensamblaje CuTRI v.1 no publicado aún) aún está en proceso de mejora en cuanto a la anotación, se utilizó la información disponible y se localizaron 40 genes en este intervalo. Estudios futuros de alineamiento entre estas regiones de los dos genomas, una vez esté más acotado el QTL, serán requeridos para buscar genes candidatos y detectar posibles variantes estructurales entre los parentales. Entre los genes que se localizan en esta región del genoma de referencia v.4, destaca el gen de la proteína YABBY. Este gen ha sido estudiado anteriormente en tomate, donde se ha demostrado que mutaciones regulatorias en YABBY están vinculadas a la evolución de frutos de gran tamaño durante la domesticación. También, su relevancia se amplifica al considerar el estudio de Xu et al. (2015), quienes demostraron que mutaciones en el locus *fas*, una inversión de 294kb que interrumpe el primer intrón del gen YABBY y se sitúa 1kb aguas arriba de *SICLV3* en tomate están asociadas con alteraciones en el tamaño del meristemo apical y una regulación defectuosa en la vía de señalización CLAVATA-WUSCHEL (CLV-WUS). Estas alteraciones contribuyen a fenotipos de fasciación que impactan directamente en la arquitectura de las plantas y en características agrícolas como el tamaño de los frutos (Xu et al., 2015). Sin embargo, en este caso no se observa fasciación, lo que puede explicarse considerando la función diversificada de la familia YABBY en diferentes especies. En el estudio de Zhao et al. (2024) se describe que el gen CRABS CLAW (CRC) de la familia YABBY, que aunque participa en el desarrollo del carpelo y nectarios en *Arabidopsis* y en la determinación floral en tomate, su papel en cucurbitáceas como el pepino y el melón se centra principalmente en la elongación del fruto. En pepino, promueve la elongación al activar una proteína de respuesta a auxinas (*CsARP1*), que estimula la expansión celular, un proceso que no implica cambios en la fasciación ni en el número de carpelos. Además, la regulación de CRC por genes como *CsSEP2* modula específicamente la longitud del fruto sin impactar en otros rasgos relacionados con la arquitectura floral o el desarrollo de carpelos. Este módulo SEP2-CRC, conservado también en melón, refuerza la idea de que el papel de CRC en esta especie está limitado a la variación en la forma y tamaño del fruto (Zhao et al., 2024).

4.4. Análisis de nuevos recombinantes (ensayo COMAV)

Además del mapeo fino, en este trabajo final de máster se analizó cuántos recombinantes nuevos se habían generado en el intervalo entre los marcadores de la región de interés para conocer la frecuencia de recombinación. Se identificaron 36 plantas recombinantes en las familias 20M11-15 durante el genotipado indicado en el apartado 4.3.2. que se trasplantaron al COMAV y se fenotiparon, de las cuales finalmente sobrevivieron y se obtuvo fruto de 23 (Tabla 10). Al igual que en La Mayora y Meliana, se realizó la técnica PACE con los cuatro nuevos marcadores en las plantas recombinantes entre chr05_1433 y chr5_1626 y se imputaron los resultados al resto. No se realizó asociación con los marcadores porque el número de plantas era demasiado bajo para tener suficiente potencia estadística.

Tabla 10 . Genotipo de las plantas del ensayo del COMAV para generar nuevos recombinantes.

PS indica homocigoto para el alelo PS, TRI indica homocigoto para el alelo TRI y H indica heterocigoto.

PLANTA	chr05_684	chr05_1058	chr05_1204	chr05_1302	chr05_1433	chr05_1466	chr05_1501	chr05_1541	chr05_1587	chr05_1626	chr05_1832	chr05_1957	chr05_2077	chr05_2103	chr05_2282
24M10-2	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	TRI	TRI	TRI
24M10-11	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11-34	PS	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M11-38	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11-49	PS	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M12-4	H	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M12-31	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M12-36	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12-59	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12-60	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13-9	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13-13	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13-15	PS	PS	H	H	H	H	H	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS
24M13-20	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS
24M13-24	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS
24M13-42	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13-43	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	TRI	PS	PS	PS	PS
24M14-9	PS	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS
24M14-29	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M14-48	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M14-55	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M15-6	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H
24M15-23	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H

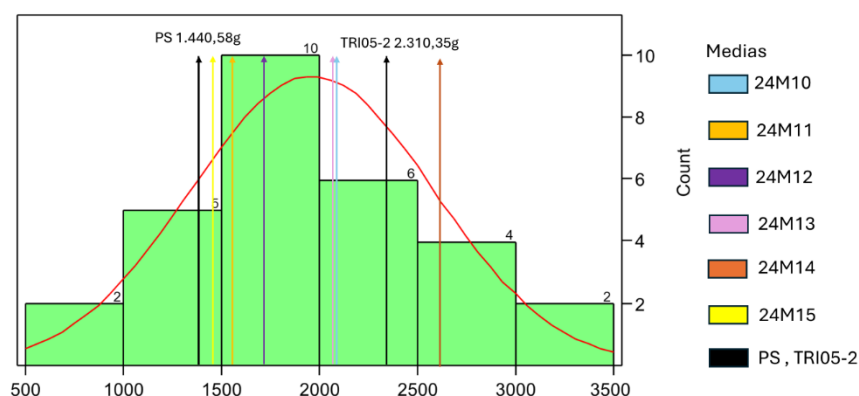


Fig 14. Distribución de la población del COMAV con respecto al peso (FW) de los frutos.

En el eje X se presentan los distintos pesos y se señala con una barra negra donde se encuentran las medias de TRI05-2 y PS. Cada barra representa la cantidad de frutos comprendidos entre cada intervalo de peso. La curva roja representa la línea de tendencia.

Para el carácter FW (Fig. 14), se observó una dispersión en la distribución del peso de los frutos, desde unos 500g hasta cerca de 3500g. La mayoría de frutos (55%) presentaron valores de FW en el rango de 1.500-2.500g. La distribución es bastante simétrica, con pocos pesos en los extremos. La distribución engloba las medias de TRI05-2 y PS, lo que indica que el QTL está segregando en la población. No todas las plántulas son homocigotas para TRI05-2 en la región del QTL, lo que explica frutos más pequeños, similares a PS, y frutos más grandes, cercanos a TRI05-2. Es probable que los FW en el rango superior provengan de plántulas homocigóticas TRI, mientras que aquellos en el rango inferior reflejan la ausencia de alelos de TRI05-2 en su genoma. Es necesario realizar estudios posteriores para comprobar la presencia del QTL en esas plántulas.

Tabla 11. Frecuencia de recombinación observada en el ensayo del COMAV.

	chr05_684	chr05_1058	chr05_1204	chr05_1302	chr05_1433	chr05_1466	chr05_1501	chr05_1541	chr05_1587	chr05_1626	chr05_1832	chr05_1957	chr05_2077	chr05_2103	chr05_2282
rec/2marcadores ¹	3	1	1	1	3	3	1	0	1	2	1	1	0	0	0
Distancia (Kb) ²	400	150	100	130	23	40	40	45	40	200	120	100	30	180	
rec/100Kb ³	0,8	0,7	1,0	0,8	13,0	7,5	2,5	0,0	2,5	1,0	0,8	1,0	0,0	0,0	
Posición ⁴	683.991	1.057.534	1.204.452	1.302.201	1.432.542	1.462.252	1.501.986	1.541.116	1.587.366	1.626.117	1.831.800	1.957.110	2.077.480	2.103.264	2.282.430

¹ Número de recombinantes entre cada marcador y el posterior

² Distancia física entre dos marcadores

³ Relación entre recombinantes entre 2 marcadores y la distancia física

⁴ Posición física del marcador en el genoma v4.0 (Castanera et al., 2020)

En la Tabla 11, se representan en cada columna las posiciones de los SNPs a lo largo de la región de interés entre 683.991kb y 2.282.430 kb. Se contabilizaron el número de recombinantes entre marcadores consecutivos con el fin de identificar regiones genómicas con intercambio genético. La región con mayor cantidad de recombinantes fue la comprendida entre la posición 683,991kb y 1,462,252kb.

Además, se observa que cada 100kb, hay por lo menos un recombinante. No obstante, se observan zonas con supresión de recombinación, como es el caso de las últimas 200kb o entre los marcadores chr05_1541 y chr05_1587.

Por otro lado, la región con mayor frecuencia de recombinación es la comprendida entre las posiciones 1,432,542kb y 1,626,117kb. Esta región podría indicar un punto importante de recombinación, mientras que una zona con poca recombinación o mayor ligación podría ser aquella comprendida entre 2,077,480kb y 2,282,430kb al no encontrar nuevos recombinantes.

Se encontraron cuatro plantas recombinantes nuevas en la zona de mapeo final entre los marcadores chr05_1501 y chr05_1832, las cuales servirán para seguir acotando la región del QTL en estudios posteriores (Tabla 12). A pesar de que los dos recombinantes generados 24M13-15 y 24M15-6 son los más interesantes pues están en la zona más probable, es importante explorar la región entre los marcadores Chr05_1626 y Chr05_1832 para poder descartarla y seguir diseñando nuevos marcadores.

Tabla 12. Genotipo de las plantas seleccionadas del ensayo COMAV recombinantes en la región entre los marcadores chr05_1501 y chr05_1832.

PLANTA	chr05_684	chr05_1058	chr05_1204	chr05_1302	chr05_1433	chr05_1466	chr05_1501	chr05_1541	chr05_1587	chr05_1626	chr05_1832	chr05_1957	chr05_2077	chr05_2103	chr05_2282
24M13-15	PS	PS	H	H	H	H	H	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS
24M15-6	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H
24M13-24	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M13-43	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	TRI	PS	PS	PS	PS

A mayor separación física entre los marcadores, aumenta la probabilidad de que ocurran eventos de recombinación. La variación en la frecuencia de recombinación a lo largo del genoma ha sido ampliamente documentada en diversas especies (Stapley et al., 2017). Curiosamente, también se observan intervalos con recombinación mínima o nula. Este fenómeno de supresión de la recombinación ocurre principalmente en los centrómeros y telómeros. Los centrómeros son áreas extensas, por lo que la baja recombinación en algunos intervalos no se puede atribuir a regiones centroméricas. La frecuencia de recombinación puede verse influenciada por alteraciones estructurales en el cromosoma, como reorganizaciones, inversiones, deleciones o translocaciones. Las inversiones, en particular, son bien conocidas por generar cambios en la recombinación, ya que la recombinación se ve suprimida en individuos heterocigotos para la inversión debido a los problemas que genera en el emparejamiento y segregación durante la meiosis (Stapley et al., 2017). De manera similar, una deleción aparece como una región sin recombinación, ya que no pueden formarse quiasmas entre los cromosomas homólogos, dado que uno de los cromosomas carece de la secuencia de ADN correspondiente. Por lo tanto, es probable

que existan alteraciones estructurales en parte de esta región entre los genomas de PS y TRI.

5. Conclusiones

-El QTL de la línea TRI05-2 fue validado en dos localidades, confirmando un incremento significativo en peso y tamaño del fruto frente al control PS sin presentar efecto de localidad ni de la interacción genotipo x ambiente.

-El estudio comparativo del desarrollo del fruto ha mostrado que TRI05-2 adelanta el máximo crecimiento del fruto en comparación con PS, aumentando su tamaño final gracias a un desarrollo temprano acelerado.

-El mapeo fino llevado a cabo delimitó el QTL a una región de 330 Kb en el cromosoma 5, facilitando la búsqueda de genes candidatos.

-Se obtuvieron cuatro nuevas líneas recombinantes en la zona de mapeo final que permitirán avanzar en el mapeo fino y la identificación de genes relacionados con el tamaño del fruto en futuras campañas.

Bibliografía

- Boissot, N., Thomas, S., Sauvion, N., Marchal, C., Pavis, C., & Dogimont, C. (2010). Mapping and validation of QTLs for resistance to aphids and whiteflies in melon. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(1), 9-20. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1287-8>
- Burger, Y., Sa'ar, U., Paris, H. S., Lewinsohn, E., Katzir, N., Tadmor, Y., & Schaffer, A. A. (2006). Genetic variability for valuable fruit quality traits in Cucumis melo. *Israel Journal of Plant Sciences*, 54(3), 233-242. https://doi.org/10.1560/IJPS_54_3_233
- Campos, M., Gonzalo, M. J., Díaz, A., Picó, B., Gómez-Guillamón, M. L., Monforte, A. J., & Esteras, C. (2023). A Novel Introgression Line Library Derived from a Wild Melon Gives Insights into the Genetics of Melon Domestication, Uncovering New Genetic Variability Useful for Breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10099. <https://doi.org/10.3390/ijms241210099>
- Castanera, R., Ruggieri, V., Pujol, M., Garcia-Mas, J., & Casacuberta, J. M. (2020). An improved melon reference genome with single-molecule sequencing uncovers a recent burst of transposable elements with potential impact on genes. *Frontiers in plant science*, 10, 1815.
- Castro, G., Perpiñá, G., Monforte, A. J., Picó, B., & Esteras, C. (2019). New melon introgression lines in a Piel de Sapo genetic background with desirable agronomical traits from dudaim melons. *Euphytica*, 215(10), 169. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2479-1>
- Chevalier, C., Nafati, M., Mathieu-Rivet, E., Bourdon, M., Frangne, N., Cheniclet, C., Renaudin, J.-P., Gévaudant, F., & Hernould, M. (2011). Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Annals of Botany*, 107(7), 1159-1169.
- Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. (1920). <https://www.gbif.org/es/species/2874621>
- Cong, B., Liu, J., & Tanksley, S. D. (2002). Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13606-13611. <https://doi.org/10.1073/pnas.172520999>
- Diaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J. E., Zalapa, J. E., Cuevas, H. E., Dace, G., Oliver, M., Boissot, N., Dogimont, C., Pitrat, M.,

- Hofstede, R., van Koert, P., Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., ... Monforte, A. J. (2011). A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, *11*(1), 111. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-111>
- Díaz, A., Forment, J., Argyris, J. M., Fukino, N., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Katzir, N., Garcia-Mas, J., & Monforte, A. J. (2015). Anchoring the consensus ICuGI genetic map to the melon (*Cucumis melo* L.) genome. *Molecular breeding*, *35*, 1-7.
- Díaz, A., Martín-Hernández, A. M., Dolcet-Sanjuan, R., Garcés-Claver, A., Álvarez, J. M., Garcia-Mas, J., Picó, B., & Monforte, A. J. (2017). Quantitative trait loci analysis of melon (*Cucumis melo* L.) domestication-related traits. *Theoretical and Applied Genetics*, *130*(9), 1837-1856. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2928-y>
- Díaz, A., Zarouri, B., Fergany, M., Eduardo, I., Álvarez, J. M., Picó, B., & Monforte, A. J. (2014). Mapping and Introgression of QTL Involved in Fruit Shape Transgressive Segregation into 'Piel de Sapo' Melon (*Cucumis melo* L.). *PLOS ONE*, *9*(8), e104188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104188>
- Doyle, J. (1991). DNA Protocols for Plants. En G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston, & J. P. W. Young (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy* (pp. 283-293). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Eduardo, I., Arús, P., & Monforte, A. J. (2005). Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theoretical and Applied Genetics*, *112*(1), 139-148. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0116-y>
- Endl, J., Achigan-Dako, E. G., Pandey, A. K., Monforte, A. J., Pico, B., & Schaefer, H. (2018). Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. *American Journal of Botany*, *105*(10), 1662-1671. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1172>
- Esteras, C., Rambla, J. L., Sánchez, G., Granell, A., & Picó, M. B. (2020). Melon Genetic Resources Characterization for Rind Volatile Profile. *Agronomy*, *10*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101512>
- Esteras, C., Rambla, J. L., Sánchez, G., López-Gresa, M. P., González-Mas, M. C., Fernández-Trujillo, J. P., Bellés, J. M., Granell, A., & Picó, M. B. (2018). Fruit flesh volatile and carotenoid profile analysis within the *Cucumis melo* L. species reveals unexploited variability for future genetic breeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(10), 3915-3925. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8909>
- FAOSTAT. (2024, septiembre 24). <https://www.fao.org/faostat/es/#compare>

- Frary, A., Nesbitt, T. C., Frary, A., Grandillo, S., Knaap, E. van der, Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., & Alpert, K. B. (2000). Fw2. 2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, *289*(5476), 85-88.
- Gabriel, S., Ziaugra, L., & Tabbaa, D. (2009). SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Current Protocols in Human Genetics*, Chapter 2, Unit 2.12. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0212s60>
- Galpaz, N., Gonda, I., Shem-Tov, D., Barad, O., Tzuri, G., Lev, S., Fei, Z., Xu, Y., Mao, L., Jiao, C., Harel-Beja, R., Doron-Faigenboim, A., Tzfadia, O., Bar, E., Meir, A., Sa'ar, U., Fait, A., Halperin, E., Kenigswald, M., ... Katzir, N. (2018). Deciphering genetic factors that determine melon fruit-quality traits using RNA-Seq-based high-resolution QTL and eQTL mapping. *The Plant Journal*, *94*(1), 169-191. <https://doi.org/10.1111/tpj.13838>
- Ghebretinsae, A. G., Thulin, M., & Barber, J. C. (2007). Nomenclatural Changes in Cucumis (Cucurbitaceae). *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, *17*(2), 176-178. [https://doi.org/10.3417/1055-3177\(2007\)17\[176:NCICC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/1055-3177(2007)17[176:NCICC]2.0.CO;2)
- Gonzalo, M. J., Díaz, A., Dhillon, N. P. S., Reddy, U. K., Picó, B., & Monforte, A. J. (2019). Re-evaluation of the role of Indian germplasm as center of melon diversification based on genotyping-by-sequencing analysis. *BMC Genomics*, *20*, 448. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5784-0>
- Gonzalo, M. J., & Monforte, A. J. (2017). Genetic mapping of complex traits in cucurbits. *Genetics and genomics of cucurbitaceae*, 269-290.
- Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Lotan-Pompan, M., Lev, S., Cohen, S., Dai, N., Yeselson, L., Meir, A., Libhaber, S. E., Avisar, E., Melame, T., van Koert, P., Verbakel, H., Hofstede, R., Volpin, H., Oliver, M., Fougadoire, A., Stalh, C., ... Katzir, N. (2010). A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(3), 511-533. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1327-4>
- Higashi, K., Hosoya, K., & Ezura, H. (1999). *Histological analysis of fruit development between two melon (Cucumis melo L. reticulatus) genotypes setting a different size of fruit.*
- Kesh, H., & Kaushik, P. (2021). Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update. *Scientia Horticulturae*, *282*, 110045. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110045>
- Leida, C., Moser, C., Esteras, C., Sulpice, R., Lunn, J. E., de Langen, F., Monforte, A. J., & Picó, B. (2015). Variability of candidate genes, genetic structure and association

- with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genetics*, 16(1), 28.
<https://doi.org/10.1186/s12863-015-0183-2>
- Linné, C. von, Linné, C. von, & Salvius, L. (1753). *Caroli Linnaei ... Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas...* (Vol. 2, pp. 1-673). Impensis Laurentii Salvii.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.669>
- Liu, J., Van Eck, J., Cong, B., & Tanksley, S. D. (2002). A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 13302-13306.
<https://doi.org/10.1073/pnas.162485999>
- Lyu, X., Xia, Y., Wang, C., Zhang, K., Deng, G., Shen, Q., Gao, W., Zhang, M., Liao, N., Ling, J., Bo, Y., Hu, Z., Yang, J., & Zhang, M. (2023). Pan-genome analysis sheds light on structural variation-based dissection of agronomic traits in melon crops. *Plant Physiology*, 193(2), 1330-1348. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad405>
- Mardis, E. R. (2013). Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6(Volume 6, 2013), 287-303. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
- McCREIGHT, J. D., Nerson, H., & Grumet, R. (1993). 20 - Melon: *Cucumis melo* L. En G. Kalloo & B. O. Bergh (Eds.), *Genetic Improvement of Vegetable Crops* (pp. 267-294). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-040826-2.50024-2>
- Melonomics v4.0*. (2024). <https://www.melonomics.net/melonomics.html#/>
- Monforte, A. J., Diaz, A., Caño-Delgado, A., & van der Knaap, E. (2014). The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: Lessons from tomato and melon. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4625-4637. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru017>
- Muños, S., Ranc, N., Botton, E., Bérard, A., Rolland, S., Duffé, P., Carretero, Y., Le Paslier, M.-C., Delalande, C., Bouzayen, M., Brunel, D., & Causse, M. (2011). Increase in Tomato Locule Number Is Controlled by Two Single-Nucleotide Polymorphisms Located Near WUSCHEL. *Plant Physiology*, 156(4), 2244-2254.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.173997>
- Naudin, C. (1859). Espèces et des variétés du genre *Cucumis*. *Ann. Sci. Nat.*, 11, 5-87.
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1570009750241108864>
- Oliver Seros, M., Garcia-Mas, J., Morales, M., Dolcet-Sanjuan, R., Vicente, M., Gomez, H., Leeuwen, H., Monfort, A., Puigdomènech, P., & Arús, P. (2000). The Spanish melon

- genome project: Construction of a saturated genetic map. En *Acta Horticulturae* (Vol. 510, p. 378). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.510.59>
- Oren, E., Tzuri, G., Dafna, A., Rees, E. R., Song, B., Freilich, S., Elkind, Y., Isaacson, T., Schaffer, A. A., Tadmor, Y., Burger, J., Buckler, E. S., & Gur, A. (2022). QTL mapping and genomic analyses of earliness and fruit ripening traits in a melon recombinant inbred lines population supported by de novo assembly of their parental genomes. *Horticulture Research*, 9, uhab081. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab081>
- Paris, H. S., Amar, Z., & Lev, E. (2012). Medieval History of the Duda'im Melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 66(3), 276-284. <https://doi.org/10.1007/s12231-012-9205-4>
- Pereira, L., Santo Domingo, M., Argyris, J., Mayobre, C., Valverde, L., Martín-Hernández, A. M., Pujol, M., & Garcia-Mas, J. (2021). A novel introgression line collection to unravel the genetics of climacteric ripening and fruit quality in melon. *Scientific Reports*, 11(1), 11364. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90783-6>
- Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A. J., & Picó, B. (2016). A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits. *BMC Plant Biology*, 16(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0842-0>
- Phan, N. T., & Sim, S.-C. (2017). Genomic Tools and Their Implications for Vegetable Breeding. *Horticultural Science and Technology*, 35(2), 149-164. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170018>
- Pitrat, M. (2013). Phenotypic diversity in wild and cultivated melons (*Cucumis melo*). *Plant Biotechnology*, 30(3), 273-278. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.0813a>
- Pitrat, M. (2017). Melon Genetic Resources: Phenotypic Diversity and Horticultural Taxonomy. En R. Grumet, N. Katzir, & J. Garcia-Mas (Eds.), *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae* (pp. 25-60). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/7397_2016_10
- Renner, S. S., Schaefer, H., & Kocyan, A. (2007). Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*, 7, 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-58>
- Ruggieri, V., Alexiou, K. G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., Nonaka, S., Ezura, H., Latrasse, D., Boualem, A., Benhamed, M., Bendahmane, A., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., Puigdomènech, P., Casacuberta, J. M., & Garcia-Mas, J. (2018).

- An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. *Scientific Reports*, 8(1), 8088. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26416-2>
- Santo Domingo, M., Mayobre, C., Pereira, L., Argyris, J., Valverde, L., Martín-Hernández, A. M., Garcia-Mas, J., & Pujol, M. (2022). Fruit Morphology and Ripening-Related QTLs in a Newly Developed Introgression Line Collection of the Elite Varieties ‘Védrantais’ and ‘Piel de Sapo’. *Plants*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223120>
- Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14269-14273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005338107>
- Stapley, J., Feulner, P. G. D., Johnston, S. E., Santure, A. W., & Smadja, C. M. (2017). Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: Patterns and processes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1736), 20160455. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0455>
- von Maydell, D. (2023). PCR Allele Competitive Extension (PACE). En Y. Shavrukov (Ed.), *Plant Genotyping: Methods and Protocols* (pp. 263-271). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2_18
- Wei, M., Huang, Y., Mo, C., Wang, H., Zeng, Q., Yang, W., Chen, J., Zhang, X., & Kong, Q. (2023). Telomere-to-telomere genome assembly of melon (*Cucumis melo* L. var. *Inodorus*) provides a high-quality reference for meta-QTL analysis of important traits. *Horticulture Research*, 10(10), uhad189. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad189>
- Xu, C., Liberatore, K. L., MacAlister, C. A., Huang, Z., Chu, Y.-H., Jiang, K., Brooks, C., Ogawa-Ohnishi, M., Xiong, G., Pauly, M., Van Eck, J., Matsubayashi, Y., Van Der Knaap, E., & Lippman, Z. B. (2015). A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*, 47(7), 784-792. <https://doi.org/10.1038/ng.3309>
- Yu, J., Wu, S., Sun, H., Wang, X., Tang, X., Guo, S., Zhang, Z., Huang, S., Xu, Y., Weng, Y., Mazourek, M., McGregor, C., Renner, S. S., Branham, S., Kousik, C., Wechter, W. P., Levi, A., Grumet, R., Zheng, Y., & Fei, Z. (2023). CuGenDBv2: An updated database for cucurbit genomics. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1457-D1464. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac921>

- Zamir, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 983-989. <https://doi.org/10.1038/35103590>
- Zhao, G., Lian, Q., Zhang, Z., Fu, Q., He, Y., Ma, S., Ruggieri, V., Monforte, A. J., Wang, P., Julca, I., Wang, H., Liu, J., Xu, Y., Wang, R., Ji, J., Xu, Z., Kong, W., Zhong, Y., Shang, J., ... Huang, S. (2019). A comprehensive genome variation map of melon identifies multiple domestication events and loci influencing agronomic traits. *Nature Genetics*, 51(11), 1607-1615. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0522-8>
- Zhao, J., Song, W., & Zhang, X. (2024). Genetic and molecular regulation of fruit development in cucumber. *New Phytologist*.

ANEXOS

Fig S1. Variación en caracteres de calidad de fruto en las 22 líneas de introgresión TRI (ILs). tomada de Campos et al. 2023

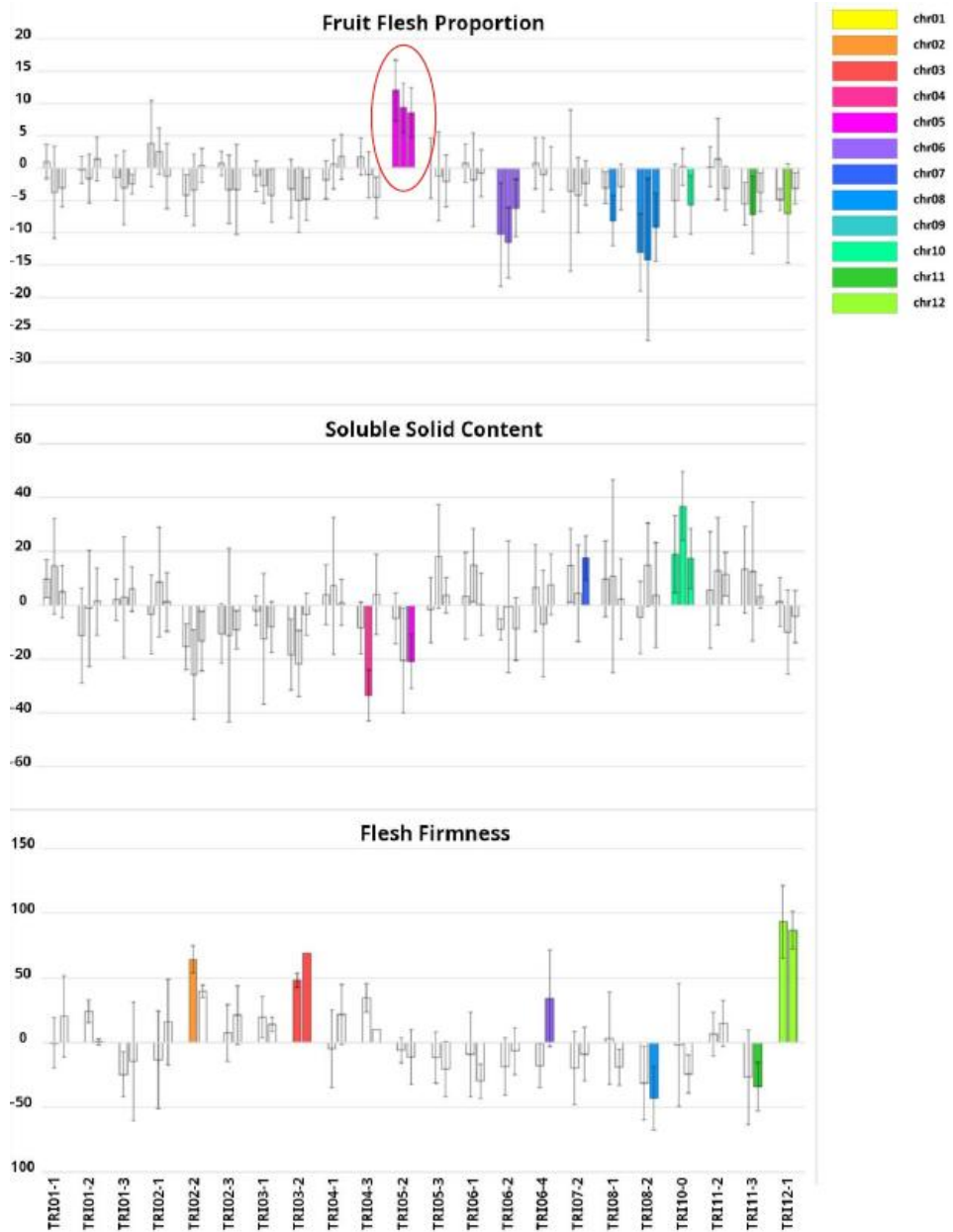


Fig S2. Variación en caracteres de morfología de fruto en las 22 líneas de introgresión de TRI (ILs). Tomada de Campos et al. 2023

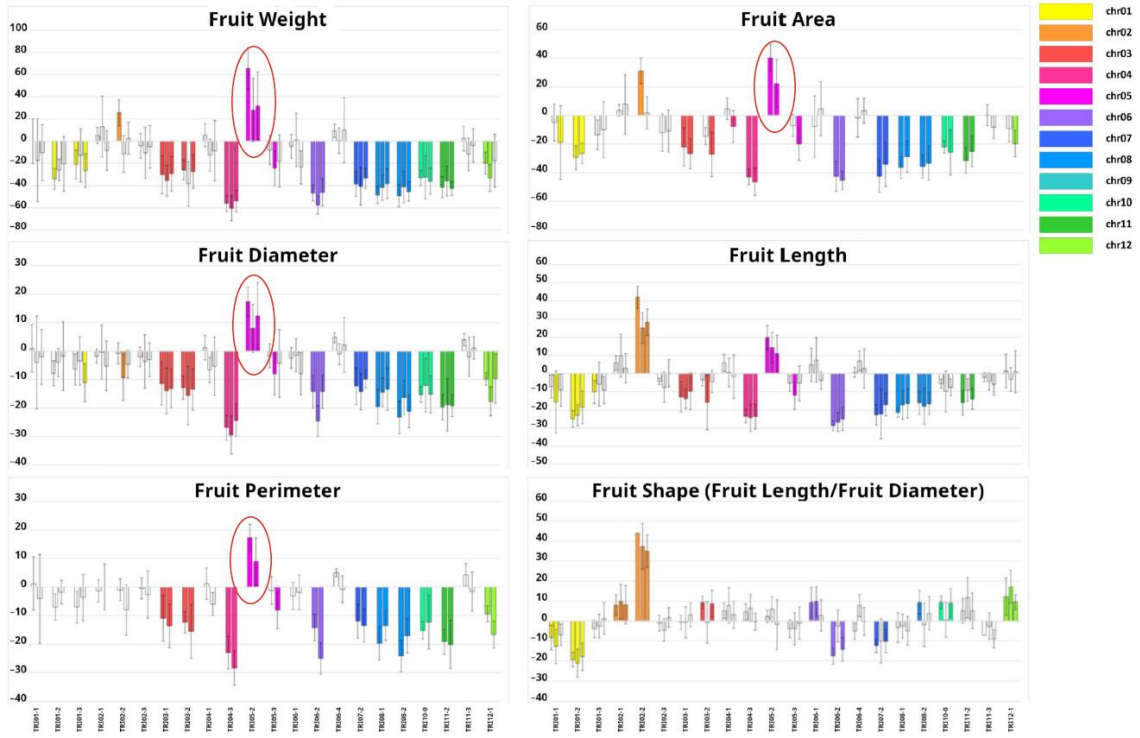


Tabla S1. Marcadores empleados para el genotipado iPLEX MassARRAY en la región entre 683,991pb y 2,398,882pb de la versión v4.0 del genoma de melón.

Reference	Position	ReferenceAllele	AlternateAllele(s)	PS	TRI	TRI05-2	Secuencia
chr05	683,991	T	C	TT	C/C	C/C	TGAAAGAACCAGTTGTCATTTTCATGAAATAATCTCCACCACGTTTAAATGACCTGGCAATGTTGTGTCCATGAAAATCCCTATAGCTCCAAATCCCTATTCGTTTCCCCTTTCTTCTCTGCACT
chr05	1,057,534	G	A	G/G	AA	AA	AAATCCAATTTTGTACCAATACAAACAAAAGTGCCAGCTATTATACCTGAAAGACCCCAAACTAATGAMGTAAAC
chr05	1,204,452	T	C	TT	C/C	C/C	TAAATTATTTTCTTTTAGCGTCTTATGTGACATGAGGCACAAATTTGAAAAAGTCCACTAGTATGAAATAAACAGAGAGTGTGTGAAACATAGTGTG/AIACACTGTGACCCTGCTATTGCCGTAGA
chr05	1,302,201	T	C	TT	C/C	C/C	GATACAAATAGGTGCCCCAACAAAGCAAGTGTGTTCCCTTCCCTAACATGTTCCTCATATAACAATGGCTGCTG
chr05	1,432,542	G	C	G/G	C/C	C/C	AGAAAAGATTGGGCAATTGCCAATGGAATTCCTGACCACGACCAAGCTCTTGTTCCCTGATGAAACCAGTAGTGCCCTTGAACAGTGCCTGCTTCTTGTTC/ATTTCAAAGCACTTAGAGATTTGCT
chr05	1,626,117	C	T	TT	C/C	C/C	AGAAACAGATTGGGCATTTGGGACATGTGAGAGAAAGTTAGGAGAAAGTTGGACCAATGATTTGAGAGAGACAGTGTTGCAGAAAAGTATGGCCGCAATTGIG/CJAGAAGAAGGGGATCGAGAA
chr05	1,831,800	C	T	TT	C/C	C/C	TGGAAACATGGCCGCAATTTGGGACATGTGAGAGAAAGTTAGGAGAAAGTTGGACCAATGATTTGAGAGAGACAGTGTTGCAGAAAAGTATGGCCGCAATTGIG/CJAGAAGAAGGGGATCGAGAA
chr05	1,831,800	C	T	TT	C/C	C/C	TGGAAACATGGCCGCAATTTGGGACATGTGAGAGAAAGTTAGGAGAAAGTTGGACCAATGATTTGAGAGAGACAGTGTTGCAGAAAAGTATGGCCGCAATTGIG/CJAGAAGAAGGGGATCGAGAA
chr05	1,957,110	T	C	TT	C/C	C/C	TGGAAACATGGCCGCAATTTGGGACATGTGAGAGAAAGTTAGGAGAAAGTTGGACCAATGATTTGAGAGAGACAGTGTTGCAGAAAAGTATGGCCGCAATTGIG/CJAGAAGAAGGGGATCGAGAA
chr05	2,077,480	C	T	C/C	TT	TT	TTCCTTTTGTGTTACTGAGAGGTTTGCAGACTTTAATGTCAGGCAAGAAATGAAATTAATTTCAATACATATGTAAGCCATTTGATGATGCT/TTTTTACACTGCCCTGCTCTTTTAT
chr05	2,103,264	C	T	C/C	TT	TT	CCCGATGTCATCAAAGGTATGCAAAATGATGATGACCTTTTACTCTCTATCGAACACTACGATGTCAAACCTTTCAAATACTCTTTGGGGTTGCAATTTCT/PAAGAGAACAAAACAAGCTTGGAGGACA
chr05	2,282,430	A	G	AA	GG	GG	GATGAAAGATTTCGGAGCAAGAAATGCTTGGAGTGAACCCCGTCAATCAATTCGCCGCTCTCTGTAGTGCAGACAC
chr05	2,282,430	A	G	AA	GG	GG	TTTAGGATTTAAAAACATAAAGTAGTAGGTGTGTGATGAGAGTGTTCCTTAAGTACAAATCGAACAGAGATGGAGTTAATGATGTGGAAGTC/TTAAAGCAATTAGTGAAGTTGACTAT
chr05	2,282,430	A	G	AA	GG	GG	GTTGGGTTGGGGTGACTTTAAGAACGGATGCTCTCAAAAGAAATTTGGTTTGTGACTCAAAGCCACGCTCA CTGTGGCATTCAGCAATCATCAAGCAAAACACTGCTACTCATCAAGCAAGAGATCAATGTTCAAAACCCTACTTTGAAATTTAGTAAATTAAGTAAATTAAGTAAATTAAG

Tabla S2. Marcadores generados en la zona comprendida entre 1,432,542kb y 1,626,117kb.

SNP_ID_melonomicsv4	Nombre	Posición	Cambio	TRI	T111	SEQ PacBio TRI
chr05:1462252	chr05_1462	1,462,252	SNV G->A	G/G	AAA	TTCTAGTTTTATGAACTTTTTCTGTAGCTGCGAAGATTTATCACCCCGAAGTACATATTCGATTAAAGTATTTTTCTTCTTCTTAAATAGTAAAGTTGGAGC TTACTAATAATTGAGCGATTTAATGTTCTGGTTATTGTACATTTGTTCTCACTGCTGGGTATCTTACATTGACTGATTGAATTAATTTTCAC
chr05:1501986	chr05_1501	1,501,986	SNV G->T	G/G	TTT	CAGCTGGAGCAAAAGGAAAGTGGCAGCTTTGGCTTCAGCCTCTGAATCAITTTTCAAAAGCCACATCAATTGTAGCATTTGAAGAAAGCTTGATCGTTACCGTGTGC TGTAACTTGTGCTGCCAAAAGACTTGCATCCCTGTGGAGGGTATGCTTAAATAAATCCCATACTCCATAAATATCCAACCTTGACATTGATCTG
chr05:1541116	chr05_1541	1,541,116	SNV A->G	AAA	G/G	GGGCTAACCCTAGCTCATAGGGGAGGGGGTGTATGTTCTTTTGTGTTTTTACAGTATTTATCTTGTGTTAGCTGGACTACATATTTGGCATTTGAAJTA TATATAATACACAGTGGCTGCTCTGTTTTGCCATTAAAGTAGCAATATAGCTTCTAGTGTAGAAACCTTACAGAAATATTAATTGATAAA
chr05:1587266	chr05_1587	1,587,266	SNV C->T	C/C	TTT	ATGCACAAATACAAAAGTATAAAATGTAACCCATTGAAATTTACAGATTGAAATGAGAGACAGCTAATAGTCCAGCGGTTTGATAACTAATTCCTAT GATTTCAATAACATTTCAATAAATAGTCCCAATCATAGGACTAAATTTAACCTTTCCGACCATTTGAAATTTGCAATTTAACCCCATAT

Tabla S3. Genotipado de plantas no recombinantes en Meliana.

Genotipo	Planta	ch05_684	ch05_1058	ch05_1204	ch05_1302	ch05_1433	ch05_1466	ch05_1501	ch05_1541	ch05_1587	ch05_1626	ch05_1832	ch05_1957	ch05_2077	ch05_2103	ch05_2282
24M10	M10-11	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M10	M10-15	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M10	M10-2	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	TRI	TRI	TRI
24M10	M10-20	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M10	M10-22	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M10	M10-27	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M10	M10-29	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M10	M10-30	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M10	M10-32	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M10	M10-35	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24M10	M10-42	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M10	M10-43	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M10	M10-9	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-11	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-15	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-16	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-18	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-19	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-2	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-22	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-31	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-35	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-36	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-38	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-4	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-40	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-42	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M11	M11-5	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-52	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M11	M11-53	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M12	M12-15	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M12	M12-20	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M12	M12-31	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M12	M12-32	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12	M12-36	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12	M12-37	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M12	M12-4	H	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M12	M12-45	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12	M12-46	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12	M12-5	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12	M12-53	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M12	M12-59	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12	M12-6	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M12	M12-60	TRI	TRI	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M12	M12-7	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13	M13-11	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M13	M13-13	PS	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13	M13-20	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13	M13-23	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13	M13-24	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13	M13-26	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13	M13-28	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M13	M13-42	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13	M13-43	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS
24M13	M13-5	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M13	M13-50	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13	M13-53	H	H	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13	M13-54	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M13	M13-58	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M13	M13-6	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS
24M13	M13-9	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-14	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-2	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-32	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-33	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-34	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-36	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-41	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-44	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-47	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-48	TRI	TRI	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-50	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-54	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-55	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	PS	PS	PS	PS	PS
24M14	M14-7	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	PS	PS	PS	PS	PS
24M15	M15-13	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M15	M15-15	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M15	M15-23	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	H	H	H	H
24M15	M15-25	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
24M15	M15-27	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M15	M15-51	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M15	M15-7	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI
24M15	M15-8	PS	PS	PS	PS	PS	PS	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI	TRI

Tabla S5. Listado de genes anotados en el cromosoma 5 en la región de interés en PacBio v4.0

Cromosoma	Pos. Inicial	Pos. Final	Referencia	
chr05	1,504,792	1,507,513	MELO3C014546.2.1	Octanoyltransferase
chr05	1,508,842	1,511,778	MELO3C014544.2.1	Axoneme-associated protein MST101(2) protein
chr05	1,512,718	1,550,904	MELO3C014542.2.1	ARM repeat superfamily protein
chr05	1,552,503	1,556,819	MELO3C014540.2.1	blue copper protein-like
chr05	1,561,691	1,568,361	MELO3C014538.2.1	Transferase, transferring glycosyl groups, putative
chr05	1,569,834	1,571,992	MELO3C031057.2.1	Pectinesterase
chr05	1,579,347	1,583,147	MELO3C014534.2.1	G2/mitotic-specific cyclin S13-7
chr05	1,584,401	1,588,393	MELO3C014533.2.1	Cysteine desulfurase family protein
chr05	1,584,718	1,584,877	MELO3C030580.2.1	Unknown protein
chr05	1,654,360	1,667,286	MELO3C014527.2.1	YABBY protein
chr05	1,589,629	1,597,912	MELO3C014532.2.1	nuclear pore complex protein NUP96
chr05	1,599,820	1,623,993	MELO3C014531.2.1	Nuclear control of ATPase 2
chr05	1,625,434	1,629,419	MELO3C014530.2.1	Nuclear transcription factor Y subunit C8
chr05	1,632,282	1,644,828	MELO3C014528.2.1	replication factor C subunit 1
chr05	1,703,164	1,706,844	MELO3C014524.2.1	Receptor-like kinase
chr05	1,709,712	1,712,301	MELO3C014523.2.1	CSL zinc finger domain-containing protein
chr05	1,720,070	1,734,671	MELO3C014522.2.1	Serine/threonine-protein phosphatase
chr05	1,752,969	1,754,238	MELO3C014520.2.1	RING-type E3 ubiquitin transferase
chr05	1,679,322	1,689,848	MELO3C014526.2.1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative
chr05	1,693,230	1,697,710	MELO3C014525.2.1	Zinc knuckle (CCHC-type) family protein
chr05	1,699,456	1,699,945	MELO3C031059.2.1	B3 domain-containing protein At1g05920-like
chr05	1,738,545	1,740,644	MELO3C014521.2.1	Protein FAF-like, chloroplastic
chr05	1,763,777	1,767,716	MELO3C014519.2.1	BEL1-like homeodomain protein 1
chr05	1,786,927	1,793,282	MELO3C014518.2.1	Serine/threonine-protein kinase
chr05	1,797,679	1,798,933	MELO3C014517.2.1	Late embryogenesis abundant protein
chr05	1,803,632	1,804,661	MELO3C014516.2.1	NDR1/HIN1-like protein 12
chr05	1,806,061	1,808,337	MELO3C014515.2.1	Aspartyl/glutamyl-tRNA (Asn/Gln) amidotransferase subunit B
chr05	1,809,326	1,815,345	MELO3C014514.2.1	Transcription factor
chr05	1,882,018	1,884,751	MELO3C014503.2.1	Nuclear transcription factor Y subunit B
chr05	1,816,065	1,818,144	MELO3C014513.2.1	Protein FAM210B-like protein
chr05	1,819,150	1,819,926	MELO3C014512.2.1	Ribonuclease CAF1
chr05	1,824,256	1,825,115	MELO3C014511.2.1	E3 ubiquitin-protein ligase