



"Estudio genético de la maduración del fruto en melón en la línea isogénica SC3-5-1"

**Memoria de Investigación presentada al Departamento de Genética
para la obtención del grado de**

DOCTOR EN GENÉTICA

por la Universidad Autònoma de Barcelona

VºBº

El Candidato:

Los directores:

El tutor:

Juan Vegas Renedo

Jordi Garcia-Mas

Ricard Marcos

Antonio Monforte Gilabert

Memoria de la investigación realizada en el Departamento de Genética Vegetal perteneciente al Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG).

RESUMEN

La maduración de los frutos es un proceso fisiológico complejo y altamente regulado en el que se producen una serie de cambios bioquímicos en el fruto: color, aroma, estructura del mismo; hasta el completo desarrollo del fruto maduro. Este proceso es regulado principalmente por el etileno en frutos climatéricos, mientras que en el caso de los frutos no climatéricos se desconoce el mecanismo de regulación aunque se ha demostrado el papel de otras hormonas como las auxinas, los brasinoesteroides y el ácido abscísico. La coexistencia en melón de variedades climatéricas y no climatéricas junto con disponibilidad de un gran número de herramientas genéticas y genómicas hacen del mismo un sistema adecuado para el estudio de la maduración de los frutos.

Para el estudio genético de la maduración se generó una población F₂ a partir del cruzamiento entre el parental no climatérico Piel de Sapo (PS) y la línea climaterica SC3-5-1, en la que previamente se había descrito un QTL en el GL III (*ETHQB3.5*), que inducía la maduración climatérica de los frutos. Durante este trabajo de tesis se detectó un segundo QTL (*ETHQV6.3*) en el GL VI de la misma línea. Ambos QTLs son capaces de inducir, de forma individual, la maduración climatérica de los frutos, siendo los efectos de *ETHQV6.3* mayores que los de *ETHQB3.5* sobre la misma. Éstos además interactúan de forma epistática resultando en una precocidad de los frutos, que requieren de un menor tiempo para madurar que en el caso de poseer exclusivamente uno de los QTLs. Se desarrolló un mapa genético de alta resolución en torno a *ETHQV6.3*, localizándolo dicho locus en una región de 4.5 Mb en la región centromérica del GL VI.

Durante la segunda parte de este trabajo de tesis se llevó a cabo un análisis transcriptómico en fruto maduro de la línea climatérica SC3-5-1 y el parental no climatérico PS, que permitió definir una serie de genes candidatos en el intervalo del locus *ETHQV6.3*. Finalmente, se caracterizó un miembro de la familia de los factores de transcripción NAM/NAC, MELO3C016536, identificándose una mutación que produce un cambio aminoacídico en la secuencia de la proteína, una serina en el parental PS se convierte en prolina en la línea SC3-5-1.

ABSTRACT

Fruit ripening is a highly and complex physiological process, with a set of biochemical changes, including the conversion of starch to sugars, fruit softening, accumulation of pigments such as carotenoids, and synthesis of aroma volatiles. The ripening process is mainly regulated by ethylene in climacteric fruits; whereas in non-climacteric fruits other hormones such auxines, brassinosteroids, and abscisic acid seem to be more important though a general model still remains unclear. The co-existence in melon of both climacteric and non-climacteric varieties and the availability of a set of genetic and genomic resources make melon a suitable model for genetic studies of fruit ripening.

A F2 population generated from the cross between the climacteric NIL SC3-5-1, that harbours a QTL (*ETHB3.5*) in LG III for fruit ripening, and the non-climacteric line Piel de Sapo (PS) was used to study the genetic control of fruit ripening in the climacteric line. In the current study a new QTL, *ETHQV6.3*, was detected in LG VI in the same NIL inducing climacteric fruit ripening. These QTLs are capable, individually, of inducing climacteric ripening in the nonclimacteric background, being the effects of *ETHQV6.3* greater than that of *ETHQB3.5*. The QTLs interact epistatically advancing the timing of ripening, reducing the time needed to produce mature fruits. *ETHQV6.3* was fine-mapped to a 4.5 Mb physical region of the melon genome, probably in the centromeric region of LG VI.

The study of the transcriptome of ripe fruits from the climacteric line SC3--5-1 and the non-climacteric parental PS, allowed us to define a set of candidate genes in the region of *ETHQV6.3*. Finally, a member of the transcription factor family NAM/NAC, MELO3C016536, was characterized identifying a non synonymous mutation that results in the substitution of a serine in PS by a proline in the line SC3-5-1.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. El melón (<i>Cucumis melo</i> L.)	17
1.1.1. Origen y taxonomía.....	17
1.1.2. Importancia económica y biológica de la especie.	23
1.1.3. Herramientas genéticas y genómicas disponibles en melón.	24
1.2. Análisis de QTLs	36
1.2.1. Análisis de marcadores individuales.....	37
1.2.2. Mapeo por intervalos simples (SIM).....	37
1.2.3. Análisis por intervalos compuestos (CIM).....	38
1.2.4. Análisis por intervalos múltiples (MIM)	38
1.2.5. Mapeo de QTLs en melón.....	39
1.2.6. Clonaje posicional en melón.	41
1.3 Maduración del fruto.....	44
1.3.1. Mecanismos de maduración del fruto.	44
1.3.2. La maduración de los frutos en melón.	50
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
3.1 Material vegetal y cultivo	55
3.2 Evaluación fenotípica	55
3.3 Extracción de DNA genómico.....	57
3.4 Marcadores moleculares.....	57
3.4.1 AFLP (“ <i>Amplified Fragment Length Polimorphism</i> ”)	57
3.4.2 Microsatélites o SSR (“ <i>Simple Sequence Repeats</i> ”)	59
3.4.3 CAPS (“ <i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i> ”).....	60
3.4.4. Mapeo de los nuevos marcadores	61
3.5. Clonaje en plásmido.....	61
3.5.1 Cepa de <i>E. coli</i>	61
3.5.2 Transformación de <i>E. coli</i>	61

3.5.3 Extracción y purificación del DNA plasmídico: mini preparación.....	62
3.6 Secuenciación del DNA	62
3.6.1 Reacción de PCR de secuencia	62
3.6.2 Precipitación de las reacciones de secuencia en placa.....	62
3.6.3 Análisis de las secuencias	63
3.7 Estudio genético de la maduración en la línea SC3-5-1.....	62
3.7.1 Mapeo de QTL de maduración en LGs III y VI	63
3.7.2. Mapeo de alta resolución de <i>ETHQV6.3</i>	64
3.7.3. Interacción entre <i>ETHQV3.5</i> y <i>ETHQV6.3</i>	65
3.8. Análisis estadístico.....	66
3.9 Estudio transcriptómico mediante hibridación de Micromatriz de DNA.	66
3.9.1. Diseño experimental.....	66
3.9.2. Normalización y análisis de los datos	68
3.10. Estudio transcriptómico mediante secuenciación masiva de alto rendimiento	70
3.10.1. Diseño experimental.....	70
3.10.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	70
3.10.3. Expresión del gen control para la maduración en fruto de melón.....	71
3.10.4. Extracción de RNA para secuenciación de alto rendimiento	71
3.10.5. Purificación del RNA (poliA+)	72
3.10.6. Secuenciación masiva de alto rendimiento mediante 454.....	73
3.10.7. Normalización de los datos	74
3.11. Aislamiento y análisis de secuencias de los miembros de la familia NAC	74
4. ESTUDIO DEL CONTROL GENÉTICO DE LA MADURACIÓN CLIMATÉRICA EN	
SC3-5-1	77
4.1. INTRODUCCIÓN	77
4.2. RESULTADOS.....	78
4.2.1. Caracterización genética del climaterio en la línea SC3-5-1.....	78
4.2.2. Construcción de un mapa genético de mediana resolución del locus <i>ETHQV6.3</i>	82
4.2.3. Estudio de la interacción entre <i>ETHQV3.5</i> y <i>ETHQV6.3</i>	86
4.3 DISCUSIÓN.....	89

5. CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE ALTA RESOLUCIÓN DEL LOCUS <i>ETHQV6.3</i> EN UNA POBLACIÓN F2.....	93
5.1. INTRODUCCIÓN	93
5.2. RESULTADOS.....	96
5.2.1. Desarrollo de una nueva población para el mapeo fino del locus <i>ETHQV6.3</i>	96
5.2.2. Saturación de la región en la que se encuentra el locus <i>ETHQV6.3</i> mediante marcadores moleculares	97
5.2.3. Construcción de un mapa de alta resolución en la región del locus <i>ETHQV6.3</i>	92
5.3. DISCUSIÓN.....	105
6. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE LA LINEA SC3-5-1	107
6.1. INTRODUCCION	107
6.2. RESULTADOS.....	110
6.2.1. Normalización y análisis de la calidad de los datos transcriptómicos	110
6.2.2. Mapman: expresión génica en forma de rutas metabólicas.....	116
6.2.3. Selección de genes candidatos para <i>ETHQB3.5</i> y <i>ETHQV6.3</i>	121
6.2.4. Secuenciación masiva del transcriptoma mediante 454	122
6.3 DISCUSION.....	126
7. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE UN GEN CANDIDATO PARA <i>ETHQV6.3</i>.....	133
7.1. INTRODUCCIÓN	133
7.2. RESULTADOS.....	135
7.2.1. Análisis de los genes candidatos.....	135
7.3 DISCUSIÓN.....	144
8. DISCUSIÓN GENERAL.....	149
9. CONCLUSIONES.....	157
10. BIBLIOGRAFIA.....	159
APÉNDICES.....	175

Índice de tablas

Tabla 1.1. Descripción de los principales grupos botánicos en los que se divide <i>Cucumis melo</i> según Pitrat et al. (2008). Adaptado de Esteras et al. (2012).....	20
Tabla 1.2. Principales mapas genéticos de melón publicados. Se indican los parentales de cada población, el tipo de población (DHL, Líneas Doble Haploides, RIL, Líneas recombinantes consanguíneas, F ₂), el número de individuos que componen cada población, el tipo y número de marcadores utilizados, genes y QTLs localizados en el mapa. (Adaptado de Ezura y Fukino (2009).....	28
Tabla 1.3. Genes clonados en melón	43
Tabla 3.1. Listado de muestras de cada uno de los genotipos (Dulce, Vèdrantais, SC3-5-1, PS y SC) a distintos tiempos de desarrollo del fruto (15, 25, 35 DAP y punto de cosecha o harvest) hibridadas en la micromatriz de melón.	68
Tabla 3.2. Secuencias de los cebadores y condiciones para la amplificación de los genes CmACO1 y CYP7.	70
Tabla 4.1. Análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para estudiar el efecto de los marcadores PSI_18-D10 (<i>ETHQB3.5</i>) y CMN61_14 (<i>ETHQV6.3</i>), y su interacción sobre el tipo de maduración de los frutos en la población 2008-F ₂	79
Tabla 4.2. Segregación del tipo de maduración en las familias F ₃ originadas a partir de los recombinantes 2008-F ₂ y mapeo por sustitución de <i>ETHQV6.3</i>	84
Tabla 4.3. Mapeo de <i>ETHQV6.3</i> en algunos recombinantes 2008-F ₂ del estudio de progenie.....	82
Tabla 4.4. Fenotipos asociados a la maduración para las líneas de genotipos fijos durante 2009 y 2010.	86
Tabla 5.1. Bandas AFLPs secuenciadas y mapeadas en la secuencia del genoma.....	101
Tabla 5.2. Mapeo fino de <i>ETHQV6.3</i> en las plantas recombinantes 2010-F ₂ a partir del estudio de su progenie considerando el locus como un marcador más, cuyo genotipo es inferido a partir del estudio de progenie después del test de Dunnet (Figura 5.5).....	101
Tabla 5.3. Mapeo de <i>ETHQV6.3</i> en los recombinantes de la progenie 2010-F ₂	101
Tabla 6.1. Genotipo de las muestras de la línea SC3-5-1, a distintos tiempos de desarrollo del fruto (DAP), hibridadas en la micromatriz.....	114

Tabla 6.2. Listado de genes donde se han encontrado mutaciones que alteran las maduración del fruto en tomate.	119
Tabla 6.3. Genes candidatos para <i>ETHQB3.5</i> y <i>ETHQV6.3</i> obtenidos a partir de los datos de expresión de la micromatriz.	120
Tabla 6.4. Rendimiento de las dos carreras de secuenciación GS-FLX (454) en las muestras PS y SC3-5-1	122

Índice de figuras

Figura 1.1. Clasificación de <i>Cucumis</i> basada en los datos de DNA cloroplástico y nuclear propuesta por Renner et al. (2007).....	19
Figura 1.2. Esquema para la síntesis, percepción y transmisión de la señal del etileno.....	48
Figura 3.1. Poblaciones utilizadas durante este proyecto de tesis para el estudio de la genética de la respuesta climática en la línea SC3-5-1.....	66
Figura 3.2. Genotipos climáticos (Dulce, Vèdrantais y SC3-5-1) y no climáticos (PS y PI) a distintos tiempos de desarrollo del fruto utilizados en el estudio transcriptómico mediante micromatriz de DNA.....	66
Figura 4.1. Producción de etileno en DAP (días después de la polinización) en las líneas SC3-5, SC3-5-1, PS, SC y el híbrido SC3-5-1xPS (media \pm DS, n= 3).....	76
Figura 4.2. Frutos representativos de “Piel de Sapo” (PS), SC3-5, SC3-5-1 y el híbrido SC3-5-1xPS. A) PS, B) híbrido SC3-5-1xPS, C) SC3-5-1 y D) SC3-5, donde se observa las diferencias externas debidas a las diferencias en maduración.....	79
Figura 4.3. Perfil para valores en distintas posiciones de los A) LOD y B) R ² para QTLs que afecten al modo de maduración, la firmeza de la carne y el contenido en azúcares de los frutos en los GL III y VI.	78
Figura 4.4. Comparación de medias para la firmeza de la carne y la acumulación de azúcares (SSC) entre frutos climáticos y no climáticos.	81
Figura 4.5. Interacción entre los alelos de dos marcadores significativamente ligados a ambos QTLs <i>ETHB3.5</i> y <i>ETHQV6.3</i>	80
Figura 4.6. Mapa genético de baja resolución del locus <i>ETHQV6.3</i>	85
Figura 4.7. Líneas genotipos fijos.....	85
Figura 4.8. Producción de etileno (μ L/Kg·h) en DAP (días después de la polinización) en las líneas 8M29, 8M35, 8M40 y 8M31 (media \pm DS, n = 3).....	85

Figura 5.1. Esquema de las poblaciones e individuos utilizados para la generación de la población 2010-F ₂	94
Figura 5.2. Fragmentos AFLP generados por la combinación de oligos selectivos Pst13-AAG en las muestras PS, SC6-4 y los individuos del "bin set" separados en gel de acrilamida tras marcaje radioactivo.	95
Figura 5.3. Fragmentos de DNA extraídos de las bandas AFLP obtenidas combinaciones con las combinaciones de oligos Pst12-AGC, Pst12-ACT, Pst13-AAG y Pst13-ACG que fueron polimórficas entre las muestras PS y SC6-4, separadas en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio	96
Figura 5.4. Histograma de distribución de frecuencias para la dehiscencia de los frutos (DAP) en los recombinantes de la población 2010-F ₂	98
Figura 5.5. Test de Dunnet's para analizar las diferencias entre las medias de la dehiscencia (DAP) de las familias del estudio de progenie de plantas de la población 2010-F ₂ y la línea climatérica SC3-5-1 como control.	100
Figura 5.6. Mapa genético de media resolución del locus <i>ETHQV6.3</i>	102
Figura 6.1. Normalización de los datos de la micromatriz de DNA mediante RMA (" <i>Robust Multichip Average</i> ").	108
Figura 6.2. El efecto de la normalización de LOWESS sobre la señal de hibridación obtenida para los chips SC3-5-1_12a y SC3-5-1_22a se muestra en un gráfico M-A	109
Figura 6.3. Análisis de componentes principales (PCA) mostrando el agrupamiento de las muestras por estadio de desarrollo (15, 25, 35 DAP y punto de cosecha) en PC1 y por genotipo (Dulce, Vèdrantais, SC3-5-1, PS y SC) en PC2.	110
Figura 6.4. Clúster jerárquico de todas las muestras con los valores normalizados.....	112
Figura 6.5. Esquema de la síntesis percepción y transcripción del etileno realizado en MAPMAN.	116
Figura 6.6. Frutos de las líneas fijas PS, 8M35 (<i>ETHQB3.5</i>), 8M40 (<i>ETHQV6.3</i>) y la línea SC3-5-1 (<i>ETHQB3.5</i> + <i>ETHQV6.3</i>) en distintos estadios de desarrollo desde 15 DAP hasta el punto de cosecha (H).....	121
Figura 6.7. Cuantificación de la expresión en fruto de <i>CmACO1</i> en la línea 8M29 (PS) (a la izquierda) y la línea climatérica SC3-5-1 (a la derecha) a distintos estadios de desarrollo en gel de agarosa al 2%.....	122

Figura 6.8. Número de lecturas por muestra obtenidas mediante secuenciación masiva usando 454 en las dos carreras.....	123
Figura 7.1. Amplificación del ORF de MELO3C016536 a partir de muestras de cDNA de PS y SC3-5-1, y visualización en gel de agarosa al 2 % mediante bromuro de etidio.	134
Figura 7.2. Alineamiento de la secuencia del cDNA de MELO3C016536 en PS y la línea SC3-5-1.....	135
Figura 7.3. Alineamiento de las secuencias proteicas de MELO3C016536 en el parental no climatérico PS y en la línea climatérica SC3-5-1, deducidas a partir de la secuencia de DNA. ..	136
Figura 7.4. Marcador CAPS desarrollado a partir del polimorfismo detectado en el unigen cCL1154 tras la digestión del producto de PCR con la enzima BtgZI y genotipado en PS, SC (PI), e individuos de la progenie de la familia 90.....	137
Figura 7.5. Datos medios de expresión normalizados (RMA) a distintos tiempos de maduración (15, 25, 35 DAP y punto de cosecha) para los genotipos climatéricos (“Dulce”, “Vèdrantais”) y no climatéricos (“Piel de Sapo”, “Songwan Charmi”) por triplicado obtenidos a partir de los datos transcritómicos de la micromatriz de melón.....	138
Figura 7.6. Reconstrucción filogenética de la familia de las NAM-like proteins en <i>Cucumis melo</i> . Para la construcción del árbol fueron utilizadas las secuencias proteicas completas obtenidas a partir del filoma de melón (phylomeDB.org). El árbol fue construido siguiendo el método de Maximum Likelihood con MEGA 5.0.....	140
Figura 7.7. Árbol filogenético obtenido mediante neighbor-joining en MEGA 5.0 de las proteínas de melón MELO3C016536 y MELO3C016540 con otras proteínas NAC de distintas especies y de función conocida.....	141

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El melón (*Cucumis melo* L.)

1.1.1. Origen y taxonomía

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie dicotiledónea con genoma diploide y número básico de cromosomas $n=12$ que pertenece a la familia de las cucurbitáceas, la cual incluye más de 825 especies representadas en 118 géneros muchos de ellos de importancia económica (Jeffrey 1990). Por ejemplo, especies del género *Cucumis* (pepino; *C. sativus* var. *sativus* L; melón; *C. melo* L.), *Citrullus* (sandía, *C. lanatus*) y *Cucurbita* (calabaza; *C. moschata*; calabacín; *C. pepo*).

El género *Cucumis* comprende 33 especies incluyendo tanto especies cultivadas como el pepino (*C. sativus*), el melón (*C. melo*) o el kiwano (*C. metuliferus*) como un gran número de especies silvestres mayoritariamente africanas como *C. globosus*, *C. africanus* y *C. sagittatus*. Tradicionalmente *C. melo* se ha dividido en dos subespecies atendiendo a la pilosidad del ovario, subespecies *melo* (ovario piloso, distribución desde la India a Europa y Estados Unidos) y *agrestis* (ovario glabro, propias del sudeste asiático hasta Japón y África) (Jeffrey, 1980). Ambas subespecies incluyen variedades comestibles y plantas silvestres, siendo el número de estas últimas especialmente elevado en África y en el subcontinente Índico. En un primer momento se estableció un posible origen africano para *C. melo*, basándose en la coincidencia en el número cromosómico de *C. melo* ($n=12$) con algunas especies silvestres africanas, en contraste con *C. sativus* y la especie silvestre de origen asiático *C. hystrix* Chakravarty que presentan un número menor ($n=7$), por lo que se infirió que esta especie sería de origen asiático (Kirkbride 1993; Chen et al. 1998). Recientemente, nuevos estudios apuntan a un posible origen asiático de *C. melo* (Renner et al. 2007; Schaefer et al. 2008). Sebastian et al. (2010) a partir del análisis de 100 secuencias de DNA, cloroplásticas y nucleares, de accesiones del género *Cucumis* provenientes de África, Asia y Australia concluyeron que el pepino y su especie hermana *Cucumis hystrix* son filogenéticamente más próximas a especies australianas y del sudeste asiático y que además *C. melo* se encuentra más próxima a éstas que a las especies africanas. Sorprendentemente la

accesión más cercana al melón es la australiana *Cucumis picrocarpus*. Según los autores, hace unos 10 millones años el ancestro australiano de *C. melo* divergiría de su parientes asiáticas relacionadas con *C. sativus* y probablemente *C. melo* podría haberse originado hace aproximadamente 3 millones de años en alguna región de la zona biogeográfica denominada Wallacea, donde confluirían el sudeste asiático y Australia, para posteriormente haber llegado al subcontinente indio donde se habría producido una mayor diversificación de la especie.

El melón ha sufrido un intenso proceso de diversificación, existiendo centros primarios y secundarios que abarcan desde la región mediterránea hasta el sudeste asiático comprendiendo zonas de Japón, China, India, Afganistán, Irán, Iraq o Turquía (Robinson and Decker-Walter 1997; Yi et al. 2009). Así la región índica es considerada un centro de diversificación primario mientras que la región mediterránea y el sudeste asiático serían centros secundarios, habiéndose observado una progresiva erosión genética en los mismos (Kerje and Grum 2000; Monforte et al. 2003). Probablemente gracias a las rutas comerciales se introdujeron semillas tanto en la península ibérica como en el sudeste asiático (Luan et al. 2008; Walters 1989). En el caso de Europa probablemente la primera introducción de la especie se produjo en el periodo grecorromano siguiendo tres rutas diferentes: por el este a través de Rusia, Bulgaria y Hungría; a través de la península balcánica y desde el sur por Italia (Pitrat et al. 1999; Szabó et al. 2005). Finalmente gracias a Colón llegaría a América donde se ha convertido en una de las frutas más consumidas propiciando el desarrollo de un considerable número de nuevas variedades.

Tras la domesticación, durante el proceso de diversificación varietal se generaron cultivares con una gran variabilidad morfológica en caracteres de hoja, planta y especialmente de fruto. Esta variabilidad hizo que en un primer momento muchas de estas variedades fueran consideradas especies diferentes (*C. melo*, *C. flexuosus*, *C. dudaim*, *C. callosus*, *C. chate*, *C. conomon* y *C. momordica*). En una primera clasificación Naudin (1859) definió 9 “tribus” de melones cultivados y una salvaje. Más recientemente Pitrat et al. (2008) han descrito 16 grupos botánicos incluidos en la subespecie *agrestis* (var. *conomon*, var. *makuwa*, var. *chinensis*, var. *momordica* y var.

acidulus) y en la spp. *melo* (var. *cantalupensis*, var. *reticulatus*, var. *adana*, var. *chandalak*, var. *ameri*, var. *inodorus*, var. *flexuosus*, var. *chate*, var. *tibish*, var. *dudaim* y var. *chito*); que incluyen diferentes cultivares consumidos en distintas partes del planeta (Tabla 1.1).

La diversidad genética en melón se ha analizado en melón utilizando distintos tipos de marcadores moleculares: “Restriction Fragment Polimorphism”(RFLPs) (Neuhausen 1992; Silberstein L. et al. 1999), “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPDs) (Silberstein L. et al. 1999; Staub et al. 2000; Zhuang et al. 2004), “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLPs) (Garcia-Mas et al. 2000), microsatélites o “Simple Sequence Repeats” (SSRs) (Danin-Poleg et al. 2000; Staub et al. 2000; Monforte et al. 2003; Zhuang et al. 2004), y “Single Nucleotide Polymorphism” (SNPs) (Deleu et al. 2009). En todos los casos las relaciones obtenidas son similares, subdividiendo la especie en los dos grupos principales (ssp. *melo* y ssp. *agrestis*) (Figura 1.1). En general, se ha encontrado una mayor variabilidad genética en las variedades originarias de la región índica que en las áreas mediterráneas o del mar de China.

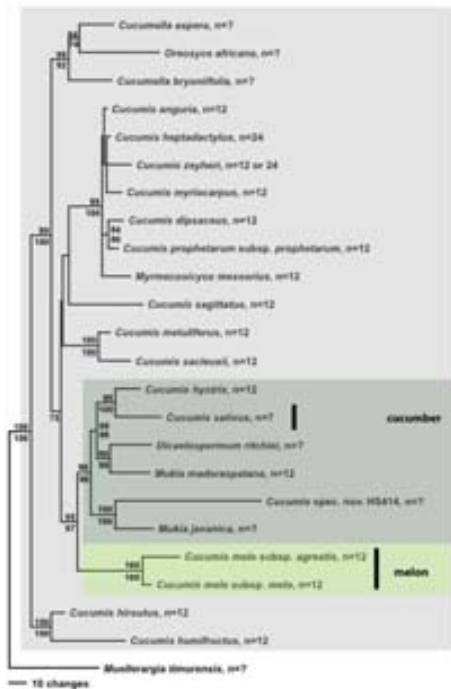












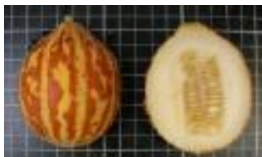


Figura 1.1. Clasificación del género *Cucumis* basada en los datos de DNA cloroplástico y nuclear propuesta por Renner et al. (2007). Las especies en fondo gris claro son de distribución africana (*C. prophetarum* se extiende hasta la región índica), la de gris oscuro son especies australianas, del sudeste asiático, China e India (*Mukia maderaspatana* se extiende incluso hasta la región de Yemen y el África subsahariana), por último en verde *C. melo*, cuya distribución no esta clara. Esta se subdivide en dos subespecies *agrestis* y *melo*.

Tabla 1.1. Descripción de los principales grupos botánicos en los que se divide *Cucumis melo* según Pitrat et al. (2008). Adaptado de Esteras et al. (2012)

Variedad	Distribución	Mecanismo determinación sexual	Tipo de fruto	Color pulpa	Piel externa	Dulce	Aroma	Tipo de maduración	
<i>conomon</i>	Sudeste asiático	Andromonoica	Alargado	Blanco	Lisa	No	No	No climatérico	
<i>makuwa</i>	Sudeste asiático	Andromonoica	Ovalado	Blanco	Lisa con o sin suturas	Si	Debil	Climatérico	
<i>chinensis</i>	China, Corea	Andromonoica y algunas hermafroditas	Forma de pera	Verde-Naranja	Lisa	Medio	Debil o sin aroma	Climatéricos y no climatéricos	
<i>momordica</i>	India	Monoica	Plano, alargado	Blanco	Liso con algún nervio	Poco	Debil	Climatérico	

Variedad	Distribución	Mecanismo determinación sexual	Tipo de fruto	Color pulpa	Piel externa	Dulce	Aroma	Tipo de maduración	
<i>acidulus</i>	India	Monoica	Oval-elíptico	Blanco	Liso	No	No	No climatérico	
<i>tibish</i>	Sudan	Andromonoica	Pequeño, oval	Blanco		No	No	No climatérico	
<i>chate</i>	Mediterraneo Oriente Medio	Monoica (con algunos genotipos andromonoicos)	Alargado	Blanco o naranja claro	Algo nervudo	No	No	Climatérico	
<i>flexuosus</i>	Norte Africa, Turquía, Iran e India	Monoica	Muy alargado,	Blanco o naranja claro	Nervudo	No	No	Climatérico	

Variedad	Distribución	Mecanismo de determinación sexual	Tipo de fruto	Color pulpa	Piel externa	Dulce	Aroma	Tipo de maduración	
<i>cantalupensis</i>	Europa, Oriente Medio, Norte y Sur de América	Andromonoica	Oval, muy redondeado	Naranja, a veces verde	Lisa a veces con arrugas	Si	Si	Climatérico	
<i>reticulatus</i>	Europa, asia, Norte y Sur de America	Andromonoica	Oval, redondeado	Naranja	Lisa	Si	Si	Climatérico	
<i>ameri</i>	Oriente Medio Central Asia	Andromonoica	Oval-alargado	Blanco o naranja claro	Lisa	Si	Poco	Climatérico	
<i>inodorus</i>	Mediterraneo, Asia central, Norte y Sur de América	Andromonoica	Eliptica	Blanco	Arrugada	Si	No	No Climatérico	
<i>dudaim</i>	Asia central	Andromonoica	Pequeños y redondos	Blanco	Pilosa	No	Fuerte	Climatérico	

1.1.2. Importancia económica y biológica de la especie.

El melón es una de las principales especies hortícolas cultivadas en el mundo con una producción de más de 27 millones de toneladas en el año 2011 (<http://faostat.fao.org>); especialmente importante en el caso de España que es el séptimo productor mundial con un volumen de 877,926 toneladas y una superficie cultivada de 29,400 hectáreas en 2011 (MARM, Ministerio del Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). El empleo de cultivares híbridos ha supuesto un aumento significativo en la producción convirtiendo a España en el primer exportador mundial tanto en términos económicos como en cuanto al número de toneladas exportadas (FAOSTAT, 2011). El principal destino de las exportaciones son los países de la Unión Europea, con un 95 % del total exportado destacando como países receptores Francia, Reino Unido y Alemania.

Además de su importancia económica, miembros de la familia de las cucurbitáceas poseen una serie de características biológicas únicas, como la estructura de su sistema vascular, las diferencias en el modo de transmisión de los genomas mitocondriales entre las distintas familias, el modo de determinación sexual, la variabilidad en modos de maduración, etc, que les convierten en un excelente sistema para estudiar estos procesos.

Las variedades de melón presentan diferencias en la determinación sexual, pudiendo encontrarse variedades monoicas (flores estrictamente masculinas y femeninas en la misma planta), andromonoicas (flores masculinas y hermafroditas), hermafroditas (únicamente flores hermafroditas) y ginoicas (únicamente flores femeninas). Los melones silvestres son monoicos, así como muchas variedades de origen hindú cercanas al centro primario de diversificación, mientras que una alta proporción de las variedades más comúnmente cultivadas son andromonoicas, siendo los tipos hermafroditas y ginoicos específicos de unas pocas variedades. La determinación sexual está controlada por dos genes *a* (andromonoico, flores masculinas y hermafroditas) y *g* (ginoico, flores femeninas y hermafroditas); cuya expresión puede ser inducida o reprimida mediante la aplicación de etileno o inhibidores del mismo. Así la aplicación de la hormona induce la formación de flores femeninas mientras que el tratamiento de plantas ginoicas con inhibidores de etileno induce la formación de

estambres y anteras originando flores hermafroditas (Byers et al. 1972). Recientemente estos dos genes han sido clonados (Boualem et al. 2008; Boualem et al. 2009; Martin et al. 2009) permitiendo una mayor comprensión del mecanismo de determinación sexual de las plantas y su aplicación a la producción de híbridos en cucurbitáceas.

El transporte de macromoléculas a través del floema es otro de los campos en los que el melón, debido a su extenso y bien definido sistema vascular, se ha convertido en un modelo de referencia (Haritatos et al. 1996; Gómez et al. 2005).

Cabe destacar la importancia del melón como sistema para estudios de desarrollo y maduración de frutos debido a la diversidad morfológica, fisiológica y bioquímica de los mismos. Especialmente remarcable es la coexistencia de variedades climatéricas y no climatéricas en la misma especie, lo que permite estudiar los distintos mecanismos de maduración y las diferencias existentes entre ambos. Estas diferencias se deben principalmente a cambios en la síntesis o percepción del etileno en el fruto (Giovannoni 2007).

1.1.3. Herramientas genéticas y genómicas disponibles en melón.

Debido al interés biológico y económico de muchas cucurbitáceas, en el año 2005 en Barcelona se organizó el workshop "*Cucurbit Genomics*" donde se estableció un consorcio internacional "*International Cucurbit Genomics Initiative*" (ICuGI: <http://www.icugi.org/>) para el desarrollo de herramientas genómicas en este grupo de especies. Así mismo, debido al desarrollo previo de algunas de estas herramientas y a su interés comercial se estableció que fuese el melón la especie modelo dentro de la familia de las cucurbitáceas. Por ello el desarrollo de estas nuevas herramientas y los esfuerzos coordinados de distintos grupos de investigación están permitiendo el estudio y comprensión de distintos procesos biológicos en plantas haciendo uso de miembros de las cucurbitáceas, especialmente del melón.

Durante los últimos 15 años se han desarrollado una serie de herramientas genéticas y genómicas en melón que están facilitando y acelerando el descubrimiento y la caracterización de nuevos genes y permitiendo la comprensión de procesos biológicos complejos. Actualmente se dispone de mapas genéticos altamente saturados, una colección de líneas casi-isogénicas ("*Near Isogenic Lines*", NILs) (Eduardo

et al. 2005), varias colecciones de ESTs (*“Expressed Sequence Tags”*) (Blanca et al. 2011, Clepet et al. 2011, Gonzalez-Ibeas et al. 2007) recogidas en bases de datos públicas (www.icugi.org), genotecas de BACs (*“Bacterial Artificial Chromosome”*) (Luo et al. 2001; van Leeuwen et al. 2003; Boualem et al. 2008; Martin et al. 2009), colecciones de mutantes obtenidos a través de plataformas de TILLING (Dahmani-Mardas et al. 2010, Ezura and Fukino 2009, Gonzalez et al. 2011, Tadmor et al. 2007) una micromatriz de DNA (Mascarell-Creus et al. 2009) y recientemente la secuencia completa del genoma del melón (Garcia-Mas et al. 2012).

1.1.3.1. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son polimorfismos en la secuencia del DNA heredables de forma mendeliana simple, cuya variabilidad puede detectarse y utilizarse para el análisis genético. Existen distintos tipos de marcadores moleculares entre los que caben destacar por haber sido los más ampliamente utilizados: RFLPs, AFLPs, RAPDs, SSRs y SNPs. Los microsatélites o SSRs que son secuencias cortas de dos, tres o cuatro nucleótidos repetidas en tándem presentan ciertas ventajas frente a otros tipos de marcadores (Collard et al. 2005) y por eso han sido muy utilizados para la construcción de mapas genéticos, identificación de variedades, análisis de QTLs, estudios filogenéticos y en la selección asistida mediante marcadores (Varshney et al. 2007). Actualmente, el uso de marcadores moleculares basados en cambios en un único nucleótido (SNPs) ha ido aumentando gracias al desarrollo de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, su abundancia en el genoma y la aplicación de tecnologías de genotipado de alto rendimiento, que han permitido una detección más eficiente y barata de los mismos. Hasta hace unos años los métodos de detección de SNPs se basaban en la presencia de dianas de restricción en la secuencia, en la hibridación (total o parcial) de una secuencia complementaria en el caso de los chips de SNPs o en una reacción de secuenciación lo que encarecía el uso de dichos marcadores (Rounsley and Last 2010) e impedía su utilización a gran escala (Pérez-de-Castro et al. 2012).

En melón se han desarrollado todo tipo de marcadores moleculares que se han utilizado tanto en estudios de diversidad genética como en la construcción de mapas genéticos. Así aunque en un primer momento se utilizaron isoenzimas (Akashi et al.

2002; Perl-Treves and Galun 1985; Staub et al. 1997), rápidamente se comenzaron a desarrollar y utilizar todo tipo de marcadores moleculares: RFLPs (Neuhausen 1992; Silberstein et al. 1999), RAPDs (Garcia-Mas et al. 2000; Silberstein et al. 1999; Staub et al. 2000; Stepansky et al. 1999; Zhuang et al. 2004), AFLPs (Garcia-Mas et al. 2000), SSRs (Danin-Poleg et al. 2001; Fernandez-Silva et al. 2008a; Fukino et al. 2007; Katzir et al. 1996; Mliki et al. 2001; Monforte et al. 2003; Ritschel et al. 2004; Staub et al. 2000; Zhuang et al. 2004) y finalmente SNPs (Blanca et al. 2012; Deleu et al. 2009; Esteras et al. 2013; Gonzalez-Ibeas et al. 2007; Morales et al. 2004; Ophir et al. 2010).

1.1.3.2. Mapas genéticos

Un mapa genético es una representación simplificada del genoma, en la que los marcadores genéticos se sitúan unos en relación con otros en función de su frecuencia de recombinación a lo largo de grupos de ligamiento, que representan los cromosomas. Los mapas genéticos se basan en el principio de ligamiento. Los alelos de dos loci situados en un mismo cromosoma próximos entre sí se transmitirán de forma conjunta a la descendencia. Durante la meiosis los cromosomas homólogos recombinaran intercambiando segmentos cromosómicos y darán lugar a cromosomas (recombinantes) con combinaciones alélicas distintas a la de los parentales. La recombinación en general se produce al azar y depende de la distancia física entre loci. Determinando la frecuencia de recombinación entre dos loci se puede estimar la distancia en el mapa de los mismos generalmente expresada en centimorgans (cM).

La construcción de un mapa genético requiere una población recombinante segregante originada a partir del cruzamiento entre dos parentales lo más distantes posible genéticamente para identificar el mayor número de polimorfismos. Las poblaciones de mapeo más empleadas son: F₂, retrocruzamiento (RC), líneas doble haploides (LDHs) y líneas puras recombinantes (RILs).

Los mapas genéticos tienen diversas aplicaciones como su utilización para el clonaje de genes de interés o su uso en estudios de genética cuantitativa para el análisis de QTLs y su posterior introducción en programas de mejora mediante el uso de marcadores (MAS). Además sirven de base para la construcción de mapas físicos y el uso combinado de éstos con los mapas genéticos es la base para el ensamblado de

secuencias de cualquier proyecto de secuenciación de genomas completos. Otras aplicaciones de los mapas genéticos saturados son el estudio de las epistasis, el análisis del desequilibrio de ligamiento o la comparación de genomas de distintas especies relacionadas.

Los primeros mapas genéticos de melón se desarrollaron hace aproximadamente veinte años a partir de poblaciones tipo F2 y BC mediante el uso de marcadores tipo RFLP, AFLP, y RAPD (Baudracco-Arnas and Pitrat 1996; Wang et al. 1997; Liou et al. 1998). Estos primeros mapas presentaban una serie de limitaciones al ser mapas poco saturados y compuestos por una mayoría de marcadores que no eran transferibles a otras poblaciones. Posteriormente se utilizaron un mayor número de RFLPs (Oliver et al. 2001, Daning-Poleg et al- 2002,) permitiendo el mapeo de genes asociados a caracteres de interés como la resistencia a enfermedades (Daning-Poleg et al. 2002), y más tarde se utilizaron SSRs (Gonzalo et al. 2005; Oliver et al. 2001) y finalmente SNPs (Deleu et al. 2009). Adicionalmente, el desarrollo de poblaciones de mapeo inmortales como las líneas doble haploides (LDHs) y las líneas puras recombinantes (RILs) permitieron llevar a cabo estudios consistentes para la detección de marcadores asociados a caracteres cuantitativos de herencia compleja y su uso en mejora. Actualmente existen distintos mapas de gran calidad originados a partir de distintos cruzamientos que incluyen variedades con un interés comercial alto (Tabla 1.2). Los más relevantes son: población de RILs obtenida a partir del cruzamiento del cultivar cantalupo "Vèdrantais" con la accesión coreana PI 161375 "Songwhan Charmi"(SC) (Perin et al. 2002b); la población de LDHs (Monforte et al. 2004) y una F2 (Oliver et al. 2001) procedentes del cruce entre el cultivar español "Piel de Sapo" T111 (PS) y SC (Gonzalo et al. 2005; Fernandez-Silva et al. 2008a); una población de RILs y una F2 construidas a partir del cruzamiento del cultivar Wester Shipper "Top Mark" con el híbrido "USDA 846-1" (Cuevas et al. 2008) y con "Q 3-2-2" (Cuevas et al. 2009), respectivamente; una población de RILs originada tras el cruce de las variedad de cantalups "Hakurei 3" y "AR 5" (Fukino et al. 2008); dos poblaciones de RILs construidas a partir del cruzamiento de "Vèdrantais" con "PI 124112" (Perchepied et al. 2005a) y el cultivar "Isabelle" (Perchepied et al. 2005b); otra colección de RILs originada a partir del cruzamiento entre "Top Mark" y "PI 124112" (Silberstein et al.

2003) y una población de RILs generada tras el cruce del cultivar galia “Dulce” con “PI 414723” (Harel-Beja et al. 2010).

Tabla 1.2. Principales mapas genéticos de melón publicados. Se indican los parentales de la población, el tipo de población (RIL, F₂), el número de individuos que componen la población, el tipo y número de marcadores, genes y QTLs localizados en el mapa. Adaptado de Ezura y Fukino (2009).

Parentales	Tipo de Población	Nº Individuos	Marcadores	Longitud (cM)	Genes	QTLs	Referencia
Vèdrantais x PI 161375	RIL	154	346 AFLPs 113 IMA	1.411	Resistencia enfermedades		Perin et al. 2002b
Vèdrantais x PI 414723	RIL	63	233 AFLP 65 ISSR 5 SSR 2 RFLP	1.180	Determinación sexual (<i>g</i>) Color verde carne (<i>gf</i>)		
PI 124112 x Vèdrantais	RIL	120	465 AFLP 17 SSR 26 ISSR	1.150	Determinación sexual (<i>a</i>) <i>Papaya Ring Spot</i> Resistencia a virus	Resistencia a oídio Resistencia a mildiú	Perchepped et al. 2005a
Isabelle x Vèdrantais	RIL	120	39 AFLP 45 SSR 46 IMA <i>Fom-2</i>	641		Resistencia a <i>Fusarium</i>	Perchepped et al. 2005b
PI 124112 x Top Mark	F2	113	41 RFLP 74 RAPD 3ISSR 16 SSR 42 AFLP	1.421	Determinación sexual (<i>a</i>) <i>Vat</i> Color de la semilla		Silberstein et al. 2003
Piel de Sapo x PI 161375	F2	93	52 SSR 235 RFLP	1.240			Oliver et al.2001 Gonzalo et al. 2005
	DHL	69	90 SSR 79 RFLP 3 SNP	1.223	<i>Nsv</i>	Calidad del fruto, peso, forma, contenido azucares	Monforte et al. 2004
	DHL (bin mapping)	14	80 RFLP 212 SSR 3 SNP	1.261			Fernandez-Slva et al. 2008
USDA 846-1 x Top Mark	RIL	81	114 RAPD 43 SSR 32 AFLP	1.116	Determinación sexual (<i>a</i>)	Relacionados con la productividad Calidad de fruto	Zalapa et al. 2007 Paris et al. 2008
			104 SSR 7 CAPS 4 SNP 140 Otros	1.180	Determinación sexual (<i>a</i>)	Carotenoides	Cuevas et al. 2008
Top Mark x Q 3-2-2	F2	117	154 SSR 8 CAPS 7 SNP	1.095		Carotenoides Maduración del fruto	Cuevas et al. 2009
Dulce x PI 414723	RIL	94	713	1.654		Resistencia a áfidos	Perin et al. 2002 Boissot et al. 2010
AR5 x Hakurei 3	RIL	93	157 SSR 7 SCAR	877	Color pulpa <i>Vat</i> <i>Nsv</i>	Resistencia oídio	Fukino et al. 2008

Recientemente ha sido publicado un mapa de referencia que unifica todos los mapas anteriores en un solo mapa consenso. Este mapa consenso incluye un total de 1,592 marcadores (335 SNPs, 640 SSRs, 252 AFLPs, 239 RFLPs, 89 RAPDs, 11 indels, 15 IMAs y 11 marcadores morfológicos) que abarcan una longitud total de 1,150 cM distribuidos en 12 grupos de ligamiento con una distancia media entre marcadores de 0.72 cM (Diaz et al. 2011).

Especialmente exitoso ha sido el uso de mapas genéticos en el estudio de caracteres de herencia simple como los genes de resistencia a enfermedades producidas por virus en melón. Así, a partir de un estudio realizado utilizando una colección de RILs originadas sobre el fondo genético de una variedad comercial de tipo cantalupo se detectaron genes para la resistencia al virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zym, Zucchini mosaic virus*), al virus de las manchas necróticas del melón (*nsv, Necrotic Spot Virus*) y el virus de las manchas anulares de la papaya (*Prv, Papaya Ring Spot Virus*) en los GL II, XII, y XI respectivamente (Perin et al. 2002b). Esta última resistencia fue mapeada posteriormente en la misma población de RILs y se encontró que estaba ligado al gen *Fom-1* que otorga resistencia a la fusariosis (Brotman et al. 2005). En el caso de *nsv*, Morales et al. (2005) construyeron un mapa genético de alta resolución mediante el uso de una población *back cross* (BC₁) en una variedad de tipo cantalupo y una población F₂ tipo inodorus. En otro estudio mediante el uso de una colección de NILs de melón originada sobre la variedad tipo inodorus T111 (Eduardo et al. 2005) se mapeó un gen de resistencia recesivo al virus del mosaico del pepino (*cmv1, "Cucumber Mosaic Virus"*) (Essafi et al. 2009).

1.1.3.3. Genoteca de NILs de melón ("*Near Isogenic Lines*")

Las líneas de introgresión o NILs son líneas homocigóticas cuyo genoma presenta una única introgresión o fragmento exógeno, procedente de un genoma donante. En el caso de obtener una colección de NILs, cada una de ellas con un introgresión distinta, y que el conjunto de introgresiones representen la mayoría del genoma donante, la colección de NILs puede ser definida como una librería genómica de introgresiones solapantes del genoma donante sobre un genoma denominado receptor o recurrente (Eshed and Zamir 1995) . Normalmente se obtienen mediante el retrocruzamiento recurrente de plantas obtenidas a partir de uno o varios individuos

híbridos (un individuo F1, individuos F2 o LDHs), monitorizando cada generación con marcadores moleculares de posición conocida, hasta obtener individuos con un único segmento cromosómico introgresado definido por marcadores en un fondo genético homogéneo recurrente, que también es verificado con marcadores.

En el caso del melón se desarrolló una colección de NILs (Eduardo et al. 2005) utilizando como material de partida la población de LDHs procedentes del cruce entre el cultivar “Piel de Sapo” (PS) y la accesión coreana PI 161375 (SC) (Gonzalo et al. 2011). La colección está formada por 57 NILs que contienen un fragmento del genoma de SC en el fondo genético de PS. Las introgresiones cubren el 85% del genoma de SC con un tamaño medio de 41 cM por introgresión. Las líneas parentales son genéticamente muy distantes entre sí: pertenecen a los tipos cultivares *chinensis* (SC) e *inodorus* (PS) con importantes diferencias tanto morfológicas como moleculares lo que la convierten en una excelente herramienta para el estudio de caracteres cuantitativos (Zamir 2001).

Esta colección ha sido utilizada en distintos estudios de calidad de fruto, como peso, morfología, color externo de fruto, color de la pulpa o el contenido de sólidos solubles (Eduardo et al. 2007), y azúcares (Obando et al. 2009), comportamiento post-cosecha (Dos-Santos et al. 2011; Fernández-Trujillo et al. 2007; Tijskens et al. 2009). Se ha aplicado también al estudio de resistencia frente a patógenos (Essafi et al. 2009) o al estudio de la heterosis en la forma de los frutos (Fernandez-Silva et al. 2008b). Además sorprendentemente, pese a que ninguno de los parentales a partir de los que se originó la población de NILs era climatérico, algunas líneas presentaban maduración climatérica (Moreno et al. 2008) constituyendo un sistema idóneo para el estudio de la maduración del fruto en melón. Al ser el principal objetivo de la tesis el estudio de la maduración del fruto utilizando una de estas líneas, se discutirá esta parte con mayor detenimiento en otros apartados.

1.1.3.4. Genotecas de BAC (“*Bacterial artificial chromosomes*”) y mapas físicos

Los BACs son herramientas clave en el campo de la genómica, su uso ha permitido la secuenciación de genomas, el estudio de la microsintenia entre diferentes especies, el clonaje posicional de genes o la construcción de mapas físicos. En melón se

han generado distintas genotecas de BACs (Luo et al. 2001; van Leeuwen et al. 2003; Boualem et al. 2008; Martin et al. 2009) que han sido principalmente utilizadas para el clonaje posicional de genes. Particularmente importante ha sido la genoteca de BACs generada por Gonzalez et al. (2010) para el ensamblado del genoma del melón mediante la secuenciación de extremos de BACs pertenecientes a la misma.

Dos genotecas de BAC fueron construidas a partir de una línea de introgresión de melón (MR-1) resistente a distintas enfermedades como el oídio y *Fusarium*. La genoteca *HindIII* contiene 68,000 clones de los cuales el 95% contiene inserto con una longitud media de 118 Kb, cubriendo 15.4 veces el tamaño del genoma; mientras que la genoteca *EcoRI* estaba formada por 85,000 clones de los que el 96% contienen inserto con una longitud media de los mismos de 114 Kb cubriendo 18.7 veces el genoma (Luo et al. 2001).

Durante el proceso de clonaje de genes asociados a la determinación sexual en melón se desarrollaron tres genotecas de BACs. La primera genoteca (*Hind III*) se construyó a partir la accesión monoica PI 124112, ésta contiene 93,700 clones con una longitud media de 100 Kb y representa aproximadamente 20 veces el genoma completo. Otra de las genotecas (*EcoRI*) fue creada a partir de la variedad andromonoica Vèdrantais y está formada por 120,000 clones con una longitud media de 100 Kb y cubre 26 veces la totalidad del genoma (Boualem et al. 2008). La tercera de las genotecas se origino a partir del cultivar ginoico *Gyanodu* y contiene 50,000 clones que representan más de 10 veces el genoma haploide de melón (Martin et al. 2009).

A partir de una LDH de melón (LDH 92) que proviene de un cruce previo entre las variedades PS y SC (van Leeuwen et al. 2003) también se construyó una genoteca que consta de 23,040 clones que cubren 6.2 veces el genoma del melón y cuyos insertos tienen un tamaño medio de 139 Kb. La misma población de LDHs fue utilizada para la construcción del primer mapa físico de melón (González et al. 2010); formado por 1,355 "contigs" y 441 "singletons", con una longitud estimada de 407 Mb cubriendo aproximadamente 0.9 veces el genoma. Además 845 clones BAC fueron anclados al mapa genético de melón usando 178 marcadores moleculares (11 RFLPs, 76 SNPs y 2

SSRs); esto permitió anclar 183 contigs de BACs del mapa físico en el mapa genético, aproximadamente 55 Mb (12%) del genoma de melón.

1.1.3.5. Secuencia del genoma de melón

En el marco del proyecto MELONOMICS “*Developing genomics tools in Cucurbitaceae, including the sequencing of the melon genome, and their applications to improve these crops*” (Genoma España, 2009-2011), coordinado por el CRAG, se ha secuenciado el genoma del melón utilizando tecnología de secuenciación de alto rendimiento 454 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El sistema Roche 454 GS FLX Titanium XL+ se basa como sus versiones anteriores en tecnología de pirosecuenciación (Margulies et al. 2005); este sistema mejorado produce lecturas con una longitud que puede llegar hasta 1Kb, el 85% de las secuencias generadas tienen una longitud mayor a los 700 pb, y es capaz de producir en una sola carrera 700 Mpb con una precisión del 99,997%. Es uno de los sistemas que ha sido utilizado para la secuenciación de genomas completos *de novo*. En melón mediante esta tecnología se han secuenciado y ensamblado 375 Mb del genoma de la línea doble haploide DHL92, que representa aproximadamente el 83.3% de las 454 Mbp de tamaño esperado (Arumuganathan and Earle 1991). Se han predicho 27,427 genes y se han generado 22,218 árboles filogenéticos, que posibilitan el estudio de parálogos y ortólogos en otras especies secuenciadas (García-Mas et al. 2012). El uso de la secuencia genómica nos permite el desarrollo casi ilimitado de marcadores moleculares, la identificación de genes con valor agronómico para su uso en programas de mejora, el estudio de la estructura del propio genoma o la comparación con genomas de otras especies.

Además, actualmente se está llevando a cabo la resecuenciación del genoma de distintas variedades de melón mediante tecnología Illumina (San Diego, Ca, USA) que permitirán conocer fuentes de diversidad genética en la especie y la detección de polimorfismos (SNPs) que puedan ser utilizados en los programas de mejora. La tecnología de secuenciación empleada por Solexa-Illumina se basa en la secuenciación por síntesis con terminadores reversibles, capaz de generar 50 Gbp/carrera formada por lecturas cortas con una longitud de 100 pb (Simpson et al. 2009). Estas características, mayor número de lecturas pero más cortas que el sistema Roche 454, han hecho que esta tecnología sea principalmente usada para la resecuenciación de

genomas, estudios transcriptómicos (RNA-Seq) y para estudios de inmunoprecipitación de la cromatina con secuenciación masiva paralela (Chip-Seq), entre otras muchas aplicaciones.

1.1.3.6. Colecciones de ESTs (“Expressed Sequence Tags”)

Los ESTs o marcadores de secuencia expresadas son secuencias de nucleótidos transcritos, habitualmente producidos mediante la secuenciación de genotecas de cDNA (Adams et al. 1991). Las secuencias resultantes suelen ser fragmentos cortos, generalmente de 500 a 800 nucleótidos, que corresponde a la longitud de secuenciación de los secuenciadores automáticos basados en secuenciación Sanger. Los ESTs suelen almacenarse en bases de datos, ya sean generalistas como Genbank (incluyendo un gran número de organismos) o concretas para cada especie o familia como es el caso de Gramene (cereales), Tair (*Arabidopsis*) o SGN (solanaceas) entre muchas otras. Su uso ha permitido: (1) acelerar el descubrimiento de genes, (2) estudiar relaciones filogenéticas, (3) facilitar la construcción de mapas físicos y genéticos, (4) la identificación de transcritos alternativos mediante distintos métodos de “*splicing*” y (5) estudiar la expresión génica a gran escala (Rudd 2003).

La primera de las colecciones importantes de ESTs desarrolladas en melón se obtuvo dentro del contexto del “Proyecto Español de Genómica de Melón” (MELOGEN) a partir de ocho genotecas de cDNA que fueron construidas utilizando material vegetal procedente de cuatro variedades de melón (PS, SC, Cantaloupe y la accesión PI 137275 de la subespecie *agrestis*) (Gonzalez-Ibeas et al. 2007). Se tomaron muestras de fruto en distintos estadios de desarrollo, raíces sanas e infectadas por el hongo *Monosporascus cannonballus*, y hojas sanas y cotiledones infectados por *Cucumber Mosaic Virus* (CMV). En total más de 30,000 ESTs fueron agrupados en 16,637 secuencias no redundantes o unigenes y más de 1,400 marcadores moleculares potenciales de tipo SNP fueron identificados in silico.

La segunda colección de ESTs fue desarrollada dentro del proyecto ICuGI por Clepet et al. (2011) a partir de 15 librerías genotecas de cDNA obtenidas de varios tipos de tejido (cotiledones, hojas, raíces, flores, frutos y callos) y cultivares (Dulce, SC, PS y Vèdrantais). Se seleccionaron distintos estadios de desarrollo en el caso de flores y

frutos y se construyeron genotecas de hojas, raíces y cotiledones infectados con *Melon Necrotic Spot Virus* (MNSV). Se generaron más de 90,000 ESTs que se integraron a las anteriores colecciones de ESTs en la base de datos pública de la “*International Cucurbit Genomics Initiative*” (www.icugi.org), que contiene 129,067 ESTs que se corresponden con 24,444 unigenes., en 24,444 unigenes.

Dentro del proyecto MELONOMICS se han generado secuencias a partir de RNAseq. Un primer experimento (Blanca et al. 2011) se desarrolló a partir de la secuenciación del transcriptoma de dos genotecas sin normalizar de las variedades PS y SC y dos genotecas normalizadas de los cultivares “Piñonet” y “Vèdrantais”. Mediante tecnología de secuenciación de alto rendimiento Roche 454 (RNAseq) se generaron 689,054 ESTs que fueron ensamblados en 53,252 unigenes en consenso con las dos colecciones de ESTs mencionadas anteriormente. El análisis informático de las secuencias permitió la identificación de SNPs en 14,417 secuencias de las que 11,655 cumplían los criterios para el análisis mediante plataformas de genotipado de alto rendimiento y 453 mediante CAPS. El segundo experimento de RNAseq se originó a partir de la resecuenciación mediante tecnología SOLID™ de 67 variedades de melón de distintos orígenes representando la diversidad de la especie. Se secuenciaron los transcriptomas de los distintos genotipos, se seleccionaron aquellos que presentaban una cobertura de 6x identificándose 303,883 SNV (“*Single Nucleotide Variants*”: INDELS cortos y SNPs). Este trabajo contiene el mayor número de SNPs de melón hasta la fecha, incluyendo por primera vez un gran número de variedades salvajes, exóticas y cultivadas lo que permite su uso para futuros estudios de genética poblacional y facilita el descubrimiento de nuevas variedades alélicas que pueden ser usadas en los procesos de mejora de variedades (Blanca et al. 2012). Recientemente se han generado también datos de RNA-seq a partir de distintos genotipos y tejidos de melón, utilizando pirosecuenciación 454 (Portnoy et al. 2011; Corbacho et al. 2013).

1.1.3.7. Micromatriz de DNA

Un chip de DNA o micromatriz de DNA es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de DNA. Los chips de DNA se usan para analizar la expresión diferencial de genes, monitorizándose los niveles de miles de ellos de forma simultánea. Su funcionamiento consiste, básicamente, en medir el nivel de hibridación

entre una sonda específica que está unida covalentemente al chip, y la molécula diana marcada generalmente mediante fluorescencia mediante un análisis de imagen, lo cual nos indicará el nivel de expresión del gen.

En el caso del melón, se diseñó una micromatriz (Mascarell-Creus et al. 2009), usando la tecnología de la compañía Nimblegene, desarrollado a partir de la colección de 33,418 ESTs construida por Gonzalez-Ibeas et al. (2007). La longitud de las sondas es de 60 nucleótidos con once sondas por unigen y dos réplicas internas de todo el conjunto. En el mismo artículo, los autores validaron la plataforma con tres diseños experimentales para la búsqueda de diferencias a nivel transcripcional entre las dos etapas de maduración del fruto, entre raíces sanas e infectadas por *M. cannonballus*, y entre cotiledones sanos e inoculados con CMV ("*Cucumber mosaic Virus*").

Otra aplicación de los chips de DNA es el genotipado masivo de individuos mediante la detección de SNPs. Recientemente se ha desarrollado un chip de DNA con 768 SNPs de melón en la plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego CA, USA) (Blanca et al. 2011; Esteras et al. 2013).

1.1.3.8. Colecciones de mutantes

La genética inversa permite mediante el uso de colecciones de mutantes el estudio de la función y el efecto de los genes sobre el fenotipo. Existen diversas técnicas como la mutagénesis insercional mediante transposones (T-DNA) o el RNA de interferencia, que requieren un protocolo de transformación eficaz y que sólo son aplicables a un número limitado de especies. En melón, aún siendo posible la transformación genética, su rendimiento es muy bajo y existe una frecuencia alta de tetraploidia lo que dificulta el uso de estas técnicas. Una alternativa es el TILLING ("*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*"), éste consiste en la mutagenización química que produce cambios puntuales y aleatorios en el genoma que son detectados principalmente mediante secuenciadores de alto rendimiento (Till et al. 2003). Mutágenos químicos como el metanosulfonato de etilo (EMS) producen cambios nucleotídicos heredables originando una serie alélica. En otras ocasiones este cambio nucleotídico puede dar lugar a mutaciones sin sentido, codones de parada, que truncan la proteína y por tanto impiden generalmente que ésta desarrolle su función. En ambos

casos estos nuevos alelos originados nos permiten estudiar la función de los genes y además la introducción de nuevos alelos en los programas de mejora.

En melón existen varias colecciones de mutantes que utilizan diferentes líneas. Una de las primeras poblaciones fue originada a partir del cultivar Noy Yizre'el y está formada por 3,000 familias M2 originadas mediante el uso de EMS (Tadmor et al. 2007). De la misma forma se han desarrollado plataformas de TILLING para el cultivar Harukei3 (Ezura and Fukino 2009) compuesta por 600 familias M2, o las generadas a partir del cultivar monoico Char Mono perteneciente a la variedad "Charentais" con 4,023 familias M2 (Dahmani-Mardas et al. 2010). Esta última colección ha permitido el estudio y la caracterización de genes responsables de la determinación sexual en melón (Boualem et al. 2008; Martin et al. 2009) y la búsqueda de genes relacionados con la maduración del fruto. Existe otra plataforma de TILLING particularmente interesante desde el punto de vista de esta tesis al haber sido originada a partir de la línea M62-113 proveniente del cultivar "Piel de Sapo" y compuesta por 2,368 familias M2 (González et al. 2011). El uso de esta colección puede permitirnos el estudio de genes implicados en la maduración de frutos de melón en el cultivar "Piel de Sapo".

1.2. Análisis de QTLs

Podemos definir un QTL ("*Quantitative trait loci*") como una región del genoma cuya variación alélica está relacionada con la variación de un carácter cuantitativo. El análisis de QTLs se basa en la detección de la asociación entre el fenotipo y el genotipo de los marcadores; de forma que los QTLs puedan ser mapeados y sus efectos puedan estimarse (Wu et al. 2007). Los marcadores son utilizados para dividir la población en grupos genotípicos distintos y determinar si existen diferencias significativas entre estos grupos para el carácter estudiado (Collard et al. 2005). Una diferencia significativa entre las medias fenotípicas de los grupos dependiendo del genotipo de un marcador y del tipo de población, nos indicara el marcador que se encuentra ligado al QTL que controla el carácter. En otras palabras se trata de descomponer la variación continua de caracteres cuantitativos en factores mendelianos discretos que expliquen una parte significativa de la varianza (Paterson et al. 1988) de manera que estimemos

su posición en el genoma, la magnitud de sus efectos (aditivo), la relación de dominancia entre alelos del mismo loci, la proporción de la varianza que explica la variación del QTL (R^2) o las interacciones entre alelos en distintos loci (epistasia).

La eficacia en la detección de QTLs depende de la disponibilidad de mapas genéticos suficientemente saturados que permitan encontrar marcadores ligados al carácter, el uso de poblaciones segregantes de gran tamaño que presenten un elevado número de recombinaciones y de la precisión en el fenotipado del carácter. Además podemos minimizar el efecto ambiental mediante un aumento del número de replicas biológicas, y verificar la estabilidad de los efectos en distintas localizaciones/años distintos.

1.2.1. Análisis de marcadores individuales

Es el método más simple y se basa en buscar asociaciones entre el QTL y los marcadores moleculares uno a uno. Los métodos estadísticos utilizados en el análisis de marcadores individuales son: t-Student, análisis de la varianza (ANOVA) y la regresión lineal simple.

Las ventajas de este método son su sencillez en el análisis de los resultados, la posibilidad de utilizar diversos programas estadísticos básicos y la no dependencia de un mapa genético completo. Una de sus principales limitaciones es la subestimación de los efectos del QTL debido a la recombinación entre el marcador y el QTL; aunque esta limitación puede paliarse parcialmente usando marcadores que estén situados entre ellos a una mínima distancia entre 10-15 cM (Tanksley 1993).

1.2.2. Mapeo por intervalos simples (SIM)

Este método hace uso de mapas de ligamiento y analiza intervalos entre pares de marcadores adyacentes y ligados a lo largo de los cromosomas, en lugar de analizar un sólo marcador (Lander and Botstein 1989). El uso de marcadores ligados para el análisis compensa la posibilidad de eventos de recombinación entre los marcadores y el QTL, por lo tanto se considera estadísticamente más fiable que el análisis de un solo marcador (Lander and Botstein 1989; Liu 1998).

El intervalo definido por dos marcadores ligados se divide en incrementos, el algoritmo calcula la probabilidad de que el QTL se encuentre en cada una de las

posiciones del intervalo expresada como LOD (*“logarithm of the odds”*), siendo éste el logaritmo en base diez del cociente entre la probabilidad de que se encuentre el QTL en esa posición y la probabilidad de que no se encuentre. Existen diferentes programas como Mapmaker (Lander et al. 1987), QGENE (Nelson 1997) o QTL *Express* (Seaton et al. 2002), que utilizan este método y todos ellos suelen representar de forma gráfica los valores de LOD frente a cada una de las posiciones o marcadores. Gracias a este método se superan las dificultades para detectar un QTL cuando se encuentra alejado del marcador, pudiéndose estimar los efectos del QTL en su posición genómica más probable. El principal problema es que cada intervalo se analiza de forma independiente, por lo que no se tienen en cuenta otros QTLs ni las posibles interacciones epistáticas entre los mismos.

1.2.3. Análisis por intervalos compuestos (CIM)

Este método permite analizar varios QTLs de forma simultánea combinando el mapeo por intervalos y la regresión lineal simple, introduciendo como cofactores a marcadores que se encuentran fuera del intervalo que se investiga con el objetivo de eliminar la variación asociada a otros QTLs y obtener una mayor resolución de la posición de los QTLs (Zeng 1994). Este modelo a pesar de tener en cuenta los efectos de otros QTLs no contempla la epistasia entre ellos.

1.2.4. Análisis por intervalos múltiples (MIM)

Los modelos estadísticos multidimensionales permiten detectar QTLs independientes o ligados y las interacciones epistáticas entre ellos, a lo largo de todo el genoma. Aunque en un principio parece una idea simple, la implementación de estos métodos es compleja debido al enorme número de QTLs posibles y al número y naturaleza de las interacciones epistáticas que pueden producirse entre los mismos. Una de las primeras aproximaciones fue el método de *“Multiple Interval Mapping”* o MIM (Kao et al. 1999) que consiste en localizar primero todos los posibles QTLs para después construir un modelo estadístico con todos los QTLs y sus interacciones, y llevar a cabo una búsqueda unidimensional de las interacciones significativas. La principal limitación de este método es la exclusión de QTLs que no han sido detectados de forma individual pese a que quizás las interacciones de estos QTLs si tienen un efecto sobre el carácter (Doerge 2002).

1.2.5. Mapeo de QTLs en melón.

Los primeros estudios sobre el uso de marcadores moleculares para la identificación de QTLs fueron llevados a cabo en la década de los 80 del siglo XX en caracteres de calidad de fruto de tomate (Paterson et al. 1988). Estos primeros estudios demostraron la posibilidad de descomponer los caracteres cuantitativos en factores mendelianos discretos como había propuesto Sax (1923). Desde entonces se han llevado a cabo muchos estudios de análisis de QTLs en distintas especies.

El desarrollo de los primeros mapas genéticos de melón y la construcción de distintas poblaciones de mapeo pusieron la base para la identificación de más de 300 QTLs en melón en los últimos quince años.

Diversos QTLs relacionados con la calidad del fruto han sido recientemente identificados en distintas poblaciones de melón, en el fondo genético de *inodorus* (Monforte et al. 2004; Eduardo et al. 2007) y *cantalupensis* (Zalapa et al. 2007; Cuevas et al. 2009). En un estudio llevado a cabo en distintas localizaciones en el que se evaluaron distintos caracteres en una población de LDHs, originada a partir del parental Piel de Sapo, se detectaron nueve QTLs relacionados con una aceleración del tiempo necesario para la formación del fruto maduro (en inglés *earliness*), seis para peso de fruto y cinco para el contenido de sólidos solubles (Monforte et al. 2004). En un estudio posterior cuatro de los QTLs para peso del fruto detectados previamente (*fw5.1*, *fw5.2*, *fw12.1* y *fw12.2*) fueron confirmados en una población de NILs (Eduardo et al. 2005) originada a partir de los mismos parentales que la población de LDHs. Adicionalmente en ese mismo estudio se detectaron QTLs para el contenido de sólidos solubles, diámetro del fruto, y para la forma del fruto y del ovario (Eduardo et al. 2007). Utilizando la misma colección de NILs se llevó a cabo un análisis más completo de los QTLs detectados previamente (Monforte et al. 2004; Eduardo et al. 2005) asociando el contenido en sólidos solubles con distintos tipos de azúcares mediante el uso de tecnología HPLC ("*high performance liquid chromatography*") (Obando et al. 2009).

La gran diversidad genética respecto a caracteres del fruto, como la forma, el color de la pulpa, la concentración de azúcares o la producción de aromas han sido objeto de un gran número de estudios utilizando diferentes poblaciones lo que ha

permitido confirmar y localizar la presencia de muchos QTLs en los distintos fondos genéticos.

Así, QTLs para forma del fruto han sido descritos con frecuencia en los GLs I, II, VIII, XI y XII, (Perin et al. 2002a; Monforte et al. 2004; Eduardo et al. 2007; Paris et al. 2008). Otro ejemplo es el color de la pulpa del fruto, así los genes *green flesh* (*gf*, Hugues, 1948) y *white flesh* (*wf*, Imam et al., 1972) han sido mapeados en los GL VIII (Monforte et al., 2004) y GL IX (Fukino et al. 2008), respectivamente. En un principio se propuso un modelo epistático entre estos dos genes que controlaba la variedad de colores de fruto observadas. Las combinaciones alélicas de *gf* y *wf* crean frutos con pulpa naranja (*wf⁺-/gf⁺-* y *wf⁺-/gf⁺gf*), blanca (*wfwf/gf⁺-*) y verde (*wfwf/gf⁺gf*), siguiendo segregaciones 12:3:1 (naranja:blanco:verde) y 3:1 (blanco:verde) (Clayberg 1992; Monforte et al. 2004). Adicionalmente, también se han descrito QTLs que están asociados a la intensidad de color. Así, en un estudio utilizando una colección de RILs originadas a partir de un parental de pulpa naranja se identificaron 8 QTLs asociados a las distintas intensidades de naranja (Cuevas et al. 2008). Uno de esos QTLs localizados en el GL VI cosegregaba con otros QTLs detectados en otras poblaciones (Monforte et al. 2004; Cuevas et al. 2009), así estos nuevos estudios utilizando poblaciones con distintos fondos genéticos han permitido la identificación de nuevos elementos reguladores del color de la pulpa de fruto en melón sugiriendo un mecanismo más complejo de control de este carácter.

Debido a su interés económico por parte de los productores uno de los principales campos donde se ha hecho uso de la genética cuantitativa es la detección de QTLs asociados a resistencia a patógenos. La fusariosis es una enfermedad de origen fúngico (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*) que produce grandes pérdidas anuales, cuando aparece es capaz de reducir la producción incluso por encima del 90%. Se han descrito dos genes de resistencia, *Fom-1* (Brotman et al. 2002; Oumouloud et al. 2008; Brotman et al. 2012) y *Fom-2* (Wang et al. 2000; Luo et al. 2001; Joobeur et al. 2004), frente a las cepas 0, 2 y 0, 1, respectivamente. Sin embargo la cepa 1.2 es capaz de superar la resistencia conferida por ambos genes. En un estudio se identificaron nueve QTLs que explicaban en una gran parte la resistencia a esta cepa y además siete de

ellos interactuaban epistáticamente dos a dos sugiriendo un control genético complejo de esta resistencia (Perchepped et al. 2005b).

El oídio causado por el hongo *Podosphaera xanthii* es una de las enfermedades más importantes y extendidas por todas las zonas de cultivo del melón. La mejora para resistencia a esta enfermedad presenta la dificultad de la gran variabilidad del patógeno, del que se han detectado numerosas razas fisiológicas. Distintos estudios han localizado QTLs de resistencia frente a distintas cepas de oídio. (Perchepped et al. 2005a) encontraron que la resistencia a oídio es específica de raza y que se encontraba controlada por dos QTLs *PmV.1* y *PmXII.1*. Fukino et al. (2008) también detectaron un QTL mayor de resistencia a las cepas 1 y N en la misma región que *PmXII.1* y otro en el GL II, ligado al gen *a*, usando una fuente de germoplasma totalmente diferente. Yuste-Lisbona et al. (2011) también localizaron un QTL mayor en el GL V a partir de la accesión TGR-1551, por lo que hay suficientes evidencias para concluir que los genes de resistencia más importantes se encuentran en los GLs II, V y XII.

Dentro de la iniciativa ICuGI se construyó un mapa consenso para melón en el que se incluyeron QTLs asociados con caracteres agronómicos de interés (Diaz et al. 2011). En este mapa se mapearon 370 QTLs para 63 caracteres que habían sido previamente identificados en 18 trabajos que incluían distintos genotipos entre los que se encontraban cultivares de interés comercial como “Charentais”, “Cantaloupe”, “Hami melon”, “Piel de Sapo” y “U.S. Western Shipper”. El uso de este mapa y la estandarización de la nomenclatura facilitarán la comparación de distintos estudios de genética cuantitativa en melón, lo que repercutirá en un mayor avance en la comprensión del control genético de los caracteres y facilitará la identificación del gen o genes responsables de dicho control. Así, como hemos mencionado antes, en el mapa genético se pueden observar colocalizaciones de distintos QTLs asociados a un mismo carácter que sugieren un mismo y único control genético.

1.2.6. Clonaje posicional en melón.

La estrategia del clonaje posicional de genes ha permitido identificar con éxito numerosos genes en plantas, tanto para caracteres de herencia monogénica simple (Ronen et al. 2000; Xiao et al. 2008; Saito et al. 2010; Makarevitch et al. 2012), y

compleja (Frary et al. 2000,). Esta técnica se basa en la identificación de marcadores de DNA estrechamente ligados al gen y de eventos de recombinación próximos al mismo. Mediante el uso de poblaciones de mapeo, con un elevado número de individuos (2000-3000), los marcadores son posicionados en relación a los eventos de recombinación para la construcción de un mapa genético de alta resolución. Los marcadores flanqueantes que se encuentran más ligados al gen son utilizados para la construcción de un mapa físico de la región que nos permita identificar el gen. Tradicionalmente estos marcadores flanqueantes eran utilizados en el rastreo de secuencias en genotecas de BACs mediante el paseo cromosómico ("*chromosome walking*") (Craig Chinault and Carbon 1979). Esta técnica se basa en el solapamiento sucesivo de los clones identificados que permitirá cubrir la distancia física que separa al marcador del gen de interés, para finalmente identificar el BAC que lo contiene. Sin embargo, en ocasiones la distancia que separa al marcador más próximo y el gen es tan elevada que el esfuerzo necesario para llegar a él es demasiado elevado. También es habitual que la presencia de secuencias repetitivas en la región dé lugar a problemas en la identificación de los fragmentos solapados y por tanto del BAC que incluye al gen. Para solucionar estos problemas técnicos se desarrolló el denominado aterrizaje cromosómico ("*chromosome landing*") (Tanksley et al. 1995); que consiste en la identificación de marcadores tan ligados al gen que permiten identificar un único clon BAC o un número muy reducido de ellos. El "*chromosome landing*" ha sido posible gracias al desarrollo de tecnologías que han permitido la identificación de marcadores muy ligados al gen de interés, un buen ejemplo hoy en día puede ser la combinación de secuenciación masiva de alto rendimiento y el uso del "*Bulk Segregant Analysis*" (Magwene et al. 2011). El uso de mapas genéticos de alta resolución y la disponibilidad creciente de un mayor número de genomas secuenciados debería permitir un incremento en el número de genes clonados en los próximos años. Finalmente, una vez identificado el gen se confirmará su función por complementación o silenciamiento mediante técnicas de transformación genética, el uso de genética inversa o el análisis de un panel de variedades de la especie, según el caso.

Sin embargo, el clonaje posicional no es un proceso sencillo y por ello hasta la fecha el número de QTLs clonados es bastante escaso en comparación con el ingente

número de trabajos de mapeo de los mismos. Se han clonado principalmente aquellos que presentan efectos mayores sobre el carácter y que han sido identificados en cruzamientos de parentales muy alejados genéticamente. Por tanto, antes de iniciar el clonaje posicional de un gen debemos tener en cuenta el material vegetal del que partimos y aprovechar todas las ventajas ofrecidas por los nuevos métodos de genotipado a gran escala, el uso de herramientas genómicas y la disponibilidad de un creciente número de genomas secuenciados (Salvi and Tuberosa 2005). En melón hasta la fecha no se ha clonado ningún QTL, tan sólo un puñado de genes han sido clonados por clonaje posicional (*Fom1*, *Fom-2*, *Vat*, *nsv*, *andromonoecious* y *gynoecious*) y todos ellos controlan caracteres de herencia simple (resistencias a fusariosis, virus transmitidos por áfidos, al virus de las manchas necróticas del melón y dos genes responsables de la determinación sexual) (Boualem et al. 2008; Brotman et al. 2013; Joobeur et al. 2004; Martin et al. 2009; Nieto et al. 2006; Pauquet et al. 2004). (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Genes clonados en melón. Se indican el nombre de los genes, el gen causante del polimorfismo, la función del gen, el tipo de polimorfismo causal, número de individuos que se necesitaron para identificar el BAC, cómo se llevo a cabo el examen funcional y la referencia.

Gen	Carácter	Gene	Función	Población	Polimorfismo causal	Examen funcional	Referencia
<i>Fom-2</i>	Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i>	Familia NBS-LRR	Gen de resistencia	662	Sustitución aminoácido	Evaluación panel accesiones	Joobeur et al. 2004
<i>Fom-1</i>	Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i>	Familia NBS-LRR	Gen de resistencia	1.190		Evaluación panel accesiones	Brotman et al. 2013
<i>Vat</i>	Resistencia a <i>Aphis gossypii</i>	Familia NBS-LRR	Gen de resistencia a la transmisión virus	6.000	Variante funcional (LRR)	Complementación	Pauquet et al. 2004
<i>Nsv</i>	Resistencia a la transmisión de <i>NSV</i>	eIF4E	Factor de inicio de la traducción	3.000	Sustitución aminoácido	Complementación	Nieto et al. 2006
<i>a</i>	<i>Andromonoecious (a)</i>	Cm-ACS7	Síntesis etileno	7.000	Codon stop prematuro	TILLING	Boualem et al. 2008
<i>g</i>	<i>Gynomoecious (g)</i>	CmWIP1	Factor de transcripción	12.660	Transposon	TILLING	Martin et al. 2009

1.3 Maduración del fruto

1.3.1. Mecanismos de maduración del fruto.

El desarrollo del fruto es uno de los procesos más importantes para la planta, en el que invierte una gran cantidad de recursos y energía tan solo compensados por las ventajas ofrecidas por la dispersión de las semillas facilitando la supervivencia y colonización. Además el desarrollo de los frutos ha sido alterado durante los procesos de domesticación sufridos por muchas especies, en un primer momento los agricultores y hoy en día los mejoradores son los que se encargan de realizar las selecciones encaminadas a satisfacer las preferencias de productores y consumidores.

El modelo general de desarrollo de fruto (Gillaspy et al. 1993) diferencia entre tres estadios principalmente: división celular, expansión celular y la maduración del fruto. La maduración de los frutos se ha dividido en dos tipos en función de la acción de una hormona, el etileno: (1) la maduración climatérica se caracteriza por un incremento en la respiración y la síntesis auto catalítica de la hormona al inicio del proceso; y (2) la maduración no climatérica, caracterizada por un decrecimiento en la tasa respiratoria y la ausencia de incremento en la síntesis de etileno (McMurchie et al. 1972). Sin embargo y a pesar de existir diferentes tipos de control hormonal existen una serie de características comunes entre la maduración de los frutos climatéricos y no climatéricos sugiriendo que deben existir rutas o procesos compartidos por ambos modelos.

El fruto sufre un gran número de cambios fisiológicos y bioquímicos al pasar de estado inmaduro a un estado maduro. Existen una serie de cambios, asociados al proceso de maduración, comunes a un gran número de especies: (1) la conversión de almidón en azúcares, (2) el ablandamiento de los frutos mediante mecanismos de degradación de la pared celular, (3) acumulación de pigmentos, como carotenoides, (4) degradación de clorofilas y (5) síntesis de compuestos volátiles aromáticos (Seymour 1993). Muchos de estos cambios están relacionados con las características organolépticas de los frutos y por ello han sido objeto de estudios fisiológicos y moleculares. Una comprensión del mecanismo molecular que controla todo este proceso podría tener un gran número de aplicaciones comerciales.

Desde hace más de 50 años la maduración de los frutos se ha convertido en uno de los campos que más interés han suscitado entre los investigadores, siendo el tomate la especie modelo para el estudio de la maduración de tipo climatérica en frutos carnosos. En un primer momento se llevó a cabo la caracterización bioquímica de biosíntesis de la hormona, y su papel regulador en otros procesos: resistencia a patógenos en plantas, germinación de las semillas, salida de la dormancia, formación de raíces adventicias, o en procesos de determinación sexual en el caso de las Cucurbitáceas, entre otros. La síntesis del etileno consiste en dos pasos: la S-adenosil-metionina es convertida en 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) por la acción de la ACC sintasa; y después el ACC es oxidado por la acción de la ACC oxidasa (ACO) para producir etileno. En tomate se han descrito ocho genes ACS, siendo *LeACS2* y *LeACS4* específicos para la maduración del fruto (Rottmann et al. 1991). Igualmente, en tomate se han descrito cuatro miembros de la familia de las ACO que mostraban expresión diferencial en función del tejido (Giovannoni 2007) y el estadio de desarrollo (Barry et al. 1996), siendo *ACO1* el único miembro inducible por etileno durante la maduración del fruto.

Durante los últimos quince años se han hecho grandes avances en la comprensión de los mecanismos de percepción y señalización del etileno asociada a procesos de maduración de los frutos, gracias al uso de mutantes de tomate que mostraban frutos con alteraciones durante dicho proceso. Así, distintos estudios genéticos señalan que los receptores de etileno actúan como reguladores negativos de la ruta, inhibiendo la respuesta a etileno (Hua and Meyerowitz 1998; Tieman et al. 2001). En tomate se han descrito siete receptores (*LeETR1*, *LeETR2*, *NR*, *LeETR4*, *LeETR5*, *LeETR6* y *LeETR7*) (Klee and Tieman 2002). Cabe destacar que únicamente la mutación de uno de los receptores, *NR*, confiere insensibilidad total al etileno (Lanahan et al. 1994), mientras que la pérdida de función en cualquiera de los otros receptores no implica pérdida de sensibilidad (Kevany et al. 2007). Actuando “aguas a bajo” de los receptores, un miembro de la familia de las MAP-kinasa kinasa kinasa (MAPKKK), denominado “*Constitutive Triple Response*” (*CTR1*) interactúa directamente con los receptores formando un complejo de señalización en *Arabidopsis*. En tomate han sido descritos cuatro miembros de esta familia de MAPKKK involucrados en el mecanismo

de percepción de la hormona: *LeCTR1*, *LeCTR3* y *LeCTR4* similares a *CTR1*, por tanto asociados a procesos de maduración del fruto, y *LeCTR2* más similar a una proteína de patogenez y posiblemente relacionado con la resistencia a procesos de respuesta de la planta frente a patógenos (Adams-Phillips et al. 2004).

En la ruta de señalización de la hormona se ha determinado que *EIN2* ("*Ethylene insensitive 2*") es activado directamente por *CTR1* (Hirayama and Alonso 2000). *EIN2* codifica para una proteína perteneciente a la familia de transportadores de metales Nramp. Distintos estudios señalan el papel de *EIN2* como lugar en el que confluyen e interactúan las señales de distintas hormonas (Fujita and Syono 1996; Beaudoin et al. 2000; Ghassemian 2000). Al final de la ruta de señalización, aguas abajo de *EIN2*, se localizan en el núcleo *EIN3* y miembros de la familia EIL (*EIN3*-like) que son factores de transcripción (Guo and Ecker 2004). En tomate han sido descritos cuatro genes EIL (Tieman et al. 2001), y uno de ellos, *EIN4*, ha sido clonado y se ha visto como es inducido por la acción del etileno durante la maduración del fruto (Yokotani et al. 2003). Éstos se unen a unas secuencias específicas PERE ("*Primary Ethylene-Response Elements*") de *ERF1*, que es un gen inducible por etileno miembro de la familia de los "*Ethylene Response Element Binding Protein*" (EREBP) (Solano et al. 1998). *ERF1* activa directamente la transcripción de un gran número de genes asociados tanto a respuestas de resistencia a patógenos como de maduración de los frutos (Klee and Giovannoni 2011).

El estudio de mutantes naturales de tomate con fenotipos que presentaban alteraciones en la maduración del fruto ha permitido conocer con más profundidad el complejo mecanismo de regulación de este proceso. Los mutantes: *rin* ("*ripening inhibitor*"), *nor* ("*non-ripening*") y *cnr* ("*colorless non-ripening*") presentan inhibición de la maduración y comparten una serie de características comunes: (a) completo desarrollo de frutos verdes con semillas viables, (b) incapacidad de producir etileno y ausencia del incremento de la tasa respiratoria, (c) insensibilidad a los tratamientos con etileno externo (Eriksson et al. 2004; Manning et al. 2006; Giovannoni 2007). Los tres genes responsables de estas mutaciones han sido clonados: *RIN* (Vrebalov et al. 2002), *CNR* (Manning et al. 2006) y *NOR* (patent US 6,762,347 B1). Otros factores de transcripción

de esta ruta han sido identificados en estudios de transcriptómica y su represión vía RNAi resulta en la inhibición de la maduración como es el caso de TAGL1 (Itkin et al. 2009) y LeHB-1 (Lin et al. 2008). Los reguladores mencionados hasta ahora son todos reguladores positivos de la maduración, pero recientemente se ha descrito un nuevo gen de la familia APETALA2 como el primer regulador negativo (Chung et al. 2011; Karlova et al. 2011). También durante el último año se ha identificado al gen responsable de la mutación *U* ("*uniform ripening*") como un factor de transcripción *Golden 2-Like (GLK)* que controla la transformación de los cloroplastos en cromoplastos durante las últimas fases de maduración del tomate (Powell et al. 2012). A pesar de todos los avances, todavía no se conocen todos los elementos e interacciones que forman la compleja red reguladora de la maduración climatérica de los frutos.

Aunque la maduración climatérica es un mecanismo bien conservado, se observan diferencias a la respuesta climatérica en función de la especie, existiendo diferencias entre frutos de manzana, melocotón o platano por mencionar algunos ejemplos de especies climatéricas. Estas diferencias ayudan a comprender mejor los procesos fisiológicos y biológicos que acontecen bajo la maduración dependiente de etileno. Por ejemplo, este es el caso de la acumulación de carotenos que ha sido descrito como un proceso dependiente de etileno en el caso del tomate (Lee et al. 2011) o papaya (Barreto et al. 2011), mientras que en melón tras inhibir la síntesis de etileno silenciando *ACO1* no se observó una disminución en el contenido de carotenoides (Ayub et al. 1996; Silva et al. 2004) sugiriendo una regulación al menos parcialmente independiente de la hormona.

En la siguiente figura (Figura 1.2) se muestra de forma esquemática el modelo propuesto para el control de la maduración de frutos de tomate controlado por la acción del etileno.

ETILENO

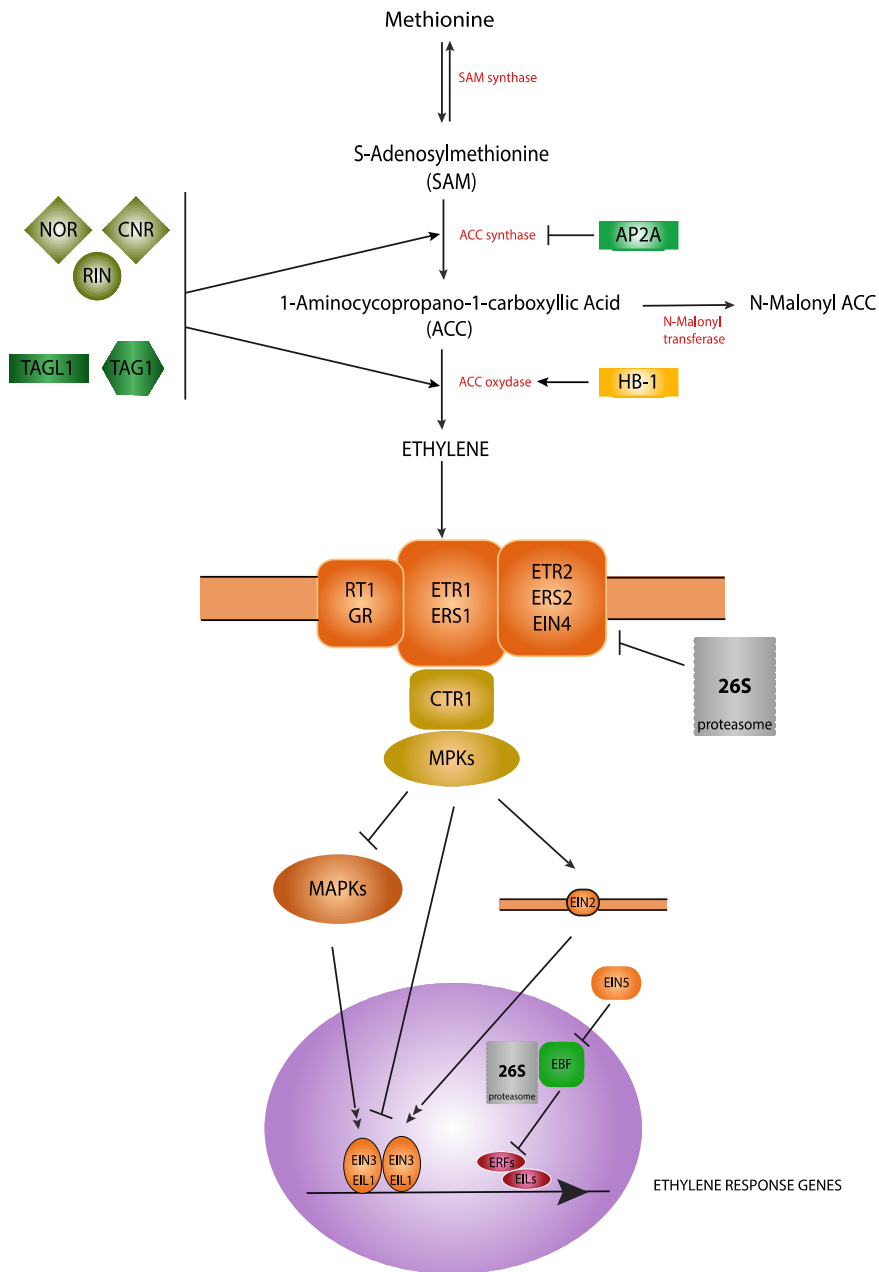


Figura 1.2. Esquema para la síntesis, percepción y transmisión de la señal del etileno. La síntesis se produce a partir de la metionina en dos pasos catalizados por las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa. Posteriormente la hormona se une a receptores en la membrana, y CTR1 es activado produciendo la transmisión de la señal mediante una cascada de MAP quinasas, activando a distintos miembros de la familia EIN, los cuales reconocen secuencias específicas activando la transcripción de ERFs (*ethylene responsive factors*) que son en última instancia los que producen la transcripción de genes asociados a la maduración del fruto y a procesos de patogenicidad. Adicionalmente se han incluido otros elementos reguladores como los genes *nor*, *rin*, *cnr*, *TAG1*, *TAGL1*, *AP2A*, *HB-1* y el proteosoma, que regula los niveles de receptores.

Los procesos que regulan la maduración de frutos no climatéricos como las fresas, las uvas o la piña han sido menos estudiados y se desconoce el mecanismo general que regula el proceso (Lelievre et al. 1997). Algunos estudios indican un posible papel de los brasinoesteroides (BRs) como potenciales promotores de la maduración en *Vitis*, donde los niveles de brasinoesteroides aumentan durante la maduración del fruto y este incremento viene acompañado por un cambio en la expresión de los genes responsables de su síntesis. Además, la aplicación tópica de BRs en uvas promovía la maduración mientras que la aplicación de brasinazole, un inhibidor de la síntesis de BRs, retrasaba la maduración (Symons et al. 2006). Igualmente, la aplicación de BRs en discos de tomate estimula la maduración sugiriendo que su implicación como molécula promotora no es exclusiva de las uvas (Vidya Vardhini and Rao 2002). Ya desde la década de los ochenta se había observado el papel de las auxinas en la maduración de las fresas (Given et al. 1988), relacionando el descenso en los niveles de las mismas en los aquenios con una modulación en la tasa de maduración. Posteriormente diversos estudios mostraban la inducción por auxinas de genes relacionados con la maduración del fruto, especialmente genes implicados en la síntesis de flavonoides y la degradación de la pared celular (Manning 1998; Castillejo et al. 2004; García-Gago et al. 2009). Otros trabajos muestran un posible papel del ácido abscísico (ABA) en la regulación global del proceso en fruta. Recientemente en un estudio pionero, el silenciamiento de uno de los genes clave en la síntesis de ABA (9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa, *FaNCED1*) mediante el sistema "VIGS" ("*virus induced gene silencing*") producía un descenso significativo en los niveles de la hormona resultando en la producción de frutos de fresa incoloros (Jia et al. 2011). En el mismo estudio al inhibir la expresión de un gen receptor de ABA (*FaCHLH/ABAR*) se obtenía el mismo fenotipo de frutos incoloros incapaces de acumular flavonoides. La aplicación externa de ABA era capaz de revertir el fenotipo en el primer caso mientras que el mismo tratamiento era incapaz de revertir el efecto del silenciamiento de *FaCHLH/ABAR*. Todos estos datos juntos parecen sugerir un papel del ABA en la maduración no climatérica de los frutos de fresa.

El papel del etileno en la maduración de los frutos no climatéricos ha sido reevaluado debido a su importancia en algunas de las fases del proceso. Por ejemplo,

algunos estudios en *Citrus* sugieren un comportamiento similar al de los frutos climatéricos en estadios poscosecha (Jacob-Wilk et al. 1999; Katz et al. 2004). Igualmente, el etileno promueve la acumulación de antocianinas en las uvas y la expresión de genes relacionados con la maduración del fruto (Chervin et al. 2004). Estos estudios parecen confirmar el papel que tiene el etileno en la maduración de frutos no climatéricos aunque el papel central parecen tenerlo otras hormonas.

1.3.2. La maduración de los frutos en melón.

En los últimos años el melón se ha erigido como un sistema alternativo al tomate para el estudio de la maduración de los frutos debido a la coexistencia de genotipos climatéricos y no climatéricos, pudiendo facilitar el estudio de la interacción entre los dos tipos de maduración. Al mismo tiempo, el reciente desarrollo de un conjunto de herramientas genéticas y genómicas hace posible el estudio molecular de este proceso.

Las variedades de melón de tipo *cantalupensis* muestran un claro comportamiento climatérico durante la maduración, por lo que han sido tradicionalmente usadas como modelo para el estudio de la maduración en melón (Ezura and Owino 2008). Uno de los primeros estudios fue el silenciamiento del gen *ACO1* inhibiendo la síntesis de etileno en plantas transgénicas de melón (Ayub et al. 1996). Tanto el tratamiento externo con etileno como la aplicación del inhibidor 1-metilciclopropano (1-MCP) en las mismas plantas transgénicas de melón confirmaron que el ablandamiento del fruto es un proceso dependiente de etileno (Nishiyama et al. 2007). Así, se han identificado procesos de la maduración de los frutos dependientes de etileno, como el ablandamiento del fruto, la producción de aromas, la abscisión del fruto, y el cambio de color en la piel externa; y procesos no dependientes entre los que se incluyen la acumulación de azúcares y carotenoides o la pérdida de acidez (Pech et al. 2008). Resultados similares se obtuvieron al estudiar plantas transgénicas de la variedad Charentais que expresaban en antisentido el gen *ACO1* de manzana. Estas líneas tenían inhibida la síntesis de la hormona y mostraban claramente la misma división entre procesos dependientes e independientes de etileno, sin embargo al tratar los frutos con etileno de forma exógena no se revertía el fenotipo no climatérico (Silva et al. 2004). Durante estos años se han ido sucediendo los estudios centrados en

distintos aspectos de la maduración climatérica en frutos de melón. Especial importancia ha tenido el estudio de la producción de compuestos volátiles aromáticos en melón, al observarse como híbridos de variedades Charentais que presentaban una mayor vida postcosecha pierden su característico aroma. Así, híbridos entre la línea transgénica generada por Ayub et al. (1996) y variedades charentais veían reducida la producción de compuestos volátiles entre un 60-80%, confirmándose la dependencia de etileno de este proceso. Otros estudios han llevado a caracterizar distintos miembros clave en la formación de aromas en frutos de melón, tanto en la familia de las alcohol acetil transferasas (ATT) (El-Sharkawy et al. 2005; Flores et al. 2002; Shalit et al. 2001; Yahyaoui et al. 2002) como de las alcohol deshidrogenasas (Manríquez et al. 2006).

Por el contrario la maduración no climatérica en melón apenas ha sido estudiada. Algunos estudios parecen indicar un papel del ABA en la maduración de los frutos en melón. Se han clonado distintos genes para enzimas responsables de la síntesis de ABA como 9-cis-poxycatotenóide dioxigenasa (NCED) (Zhang et al. 2009) o como el gen de la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GaILDH) (Pateraki 2004), y se ha observado como su expresión se encuentra asociada al proceso de maduración del fruto en melón. Estos estudios sugieren que el ABA tiene un papel en el inicio de la maduración de los frutos y que interactúa con el etileno a distintos niveles y de diferentes formas. Así, la acción de ABA inhibe la síntesis de etileno en frutos inmaduros mientras que promueve la síntesis del mismo en frutos maduros, promoviendo la maduración. A pesar de estos esfuerzos se desconocen los mecanismos moleculares y de control de este tipo de maduración y de su interacción con los procesos climatéricos.

Recientemente se han llevado a cabo algunos estudios genéticos sobre la variación natural de la maduración climatérica/no climatérica en melón. Périn et al. (2002c) analizaron una población de RILs originada a partir de la variedad climatérica "Charentais" y la accesión no climatérica de origen coreano PI 161375. Estudiaron la segregación en la abscisión de los frutos y la producción de etileno, y encontraron que ambos caracteres eran controlados por dos loci independientes denominados

“abscission layer” Al-3 y Al-4. Además, encontraron varios QTLs relacionados con la producción de etileno en las distintas líneas climatéricas de la colección de RILs.

En la genoteca de NILs originada a partir de los parentales no climatéricos “Piel de Sapo” y PI 161375 (Eduardo et al. 2005) se encontró que los frutos de la línea SC3-5 inesperadamente mostraban características de la maduración climatérica (Moreno et al. 2008). En un principio se determinó que un único gen del parental PI 161375 en el GL III era el responsable del comportamiento climatérico de los frutos de esa línea, pero una caracterización molecular más exhaustiva de la NIL SC3-5 permitió descubrir una segunda introgresión, que no había sido detectada previamente, en el GL VI (Vegas et al. 2010). Esta NIL con dos introgresiones se rebautizó como SC3-5-1 para distinguirla de la NIL con una única introgresión que se mantiene como SC3-5. Esta observación es el punto de inicio del presente proyecto de Tesis Doctoral, cuyo principal objetivo es el análisis genético y genómico de la maduración climatérica de los frutos en la línea SC3-5-1.

2. OBJETIVOS

El objetivo central de esta tesis doctoral es la descripción y la comprensión del control genético de la maduración climatérica del fruto en la línea isogénica de melón SC3-5-1, obtenida a partir de dos parentales no climatéricos. La comprensión de este mecanismo nos permitirá avanzar en el estudio de las diferencias entre los mecanismos de maduración climatéricos y no climatéricos en melón. Para llevar a cabo este trabajo nos hemos propuesto una serie de objetivos parciales.

1. El análisis de la asociación entre la maduración climatérica de los frutos y las introgresiones del parental PI 161375 (SC) en los GL III y GL VI de PS. Construcción de un mapa genético de baja resolución a partir de una población F₂ originada por el cruzamiento entre Piel de Sapo T111 y SC3-5-1.
2. El estudio de posibles interacciones entre las dos introgresiones y su efecto sobre la maduración.
3. La construcción de un mapa de alta resolución de la región de al menos uno de los QTLs, como paso previo al clonaje posicional del mismo.
4. El análisis transcriptómico mediante hibridación de micromatrices de la línea climatérica SC3-5-1 y el cultivar no climatérico Piel de Sapo, como herramienta para la identificación de genes candidatos en la región de los QTLs.
5. La identificación y caracterización de genes candidatos para la maduración climatérica del fruto en la línea SC3-5-1.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y cultivo

Las poblaciones utilizadas durante este trabajo de tesis derivan del cruce entre el cultivar de élite español “Piel de Sapo” T111 (PS) y la accesión exótica de origen coreano “Songwhan Charmi” (PI 161375, SC), ambos no climatéricos, de la que se originó la NIL climatérica de melón SC3-5. Varios trabajos relacionados con la maduración del fruto han sido realizados utilizando esta línea de introgresión: caracterizaciones fisiológicas como el perfil aromático (Obando-Ulloa et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2009) o la firmeza de la carne (Tijskens et al. 2009) y genéticos como la detección de un QTL para maduración de fruto en el GL III denominado previamente *eth3.5* (Moreno et al. 2008) y renombrado como *ETHQB3.5* siguiendo la nomenclatura de Diaz et al. (2011). Además se utilizaron los genotipos climatéricos Vèdrantais y Dulce. Todas las plantas se cultivaron en invernadero en sacos de plástico con turba (Cultivador-40) mediante cultivo hidropónico con fertirrigación (N:P:K proporción 1:0.45:1.97, 10 ppm de micro elementos, pH 6.0, conductividad 1.8 mS/cm), con un drenaje del 20-30 % y una separación entre plantas de 25 cm.

3.2 Evaluación fenotípica

Todas las plantas fueron autofecundadas de forma manual permitiendo sólo el desarrollo de un fruto por planta, que fue sometido a caracterización fenotípica. Para la determinación del fenotipo climatérico seguimos dos estrategias: (1) la determinación de la producción de etileno mediante cromatografía de gases (CG) y (2) mediante inspección visual de rasgos fenotípicos asociados a la maduración climatérica en melón.

Para el análisis del contenido de etileno mediante CG seguimos el protocolo descrito en Chiriboga et al. (2011). Los frutos fueron recolectados a 30 DAP, en estadio pre climatérico cuando mostraban las primeras señales de maduración como la formación de una zona de abscisión, fueron encerrados en urnas de cristal de 5 L aclimatadas a 20°C con flujo continuo de 1.5 L h⁻¹ de aire humidificado. Tras estabilizar

el flujo durante 24 h, se tomaron diariamente muestras de 1 mL de aire efluente con una jeringuilla y se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890, Wilmington, Alemania) equipado con un detector FID y una columna de alúmina F1 80/100 (2 m x 1/8 x 2.1, Teknokroma, Barcelona, España). Las temperaturas del inyector y el detector se mantuvieron a 120°C y 180°C respectivamente.

Para determinar más rápidamente si un fruto es climatérico aprovechamos el hecho de que las variedades de melón con maduración climatérica presentan una serie de características fenotípicas claras que no presentan aquellas no climatéricas como son la formación de una zona de abscisión o dehiscencia (Abeles 1992), el cambio de color de verde a amarillo en la piel externa del fruto, una menor duración del tiempo de conservación post cosecha y la producción de aromas (Ben-Amor et al. 1999; Guis et al. 1997). Observamos que un aumento en la producción de etileno estaba asociado a tres típicas respuestas climatéricas: cambio en el color de la piel externa de verde a amarillo, la dehiscencia de los frutos y la producción de aromas característicos. Además, las variedades climatéricas de melón se caracterizan por un mayor contenido en compuestos volátiles y por la presencia de compuestos tipo éster, especialmente derivados de acetatos, que confieren ese característico olor dulzón (J.C. Beaulieu 2003). Por el contrario variedades no climatéricas, como las de tipo *inodorus* (PS) producen un menor número de volátiles, no se han detectado compuestos de tipo éster y producen principalmente aldehídos y alcoholes, que son inodoros (Shalit et al. 2001). Estas diferencias en el perfil aromático han permitido la discriminación entre líneas climatéricas y no climatéricas en la colección de NILs de melón de la que deriva la línea SC3-5-1 (Obando-Ulloa et al. 2010). Por tanto, siguiendo los descriptores visuales, podemos distinguir si un melón sigue una maduración climatérica o no. Para asegurarnos una correcta clasificación, los frutos se mantuvieron en la planta hasta 60 días después de la antesis (DAP) o hasta el momento en el que mostraban los primeros síntomas de putrefacción, ya que los frutos climatéricos son dehiscentes antes de 40 DAP en SC3-5-1, por lo que el mantenimiento del fruto en la planta, junto con los otros descriptores, nos permitía discriminar entre las dos formas de maduración.

El contenido de sólidos solubles (SCC) fue medido como °Brix a partir de extracto crudo de la pulpa de los frutos con un refractómetro digital (PAL-1, Atago; Tokyo, Japan). La firmeza de la carne del fruto se midió usando un penetrómetro equipado con un cilindro de 8 mm (Fruit pressure tester, model FT-011; Italia).

3.3 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de material vegetal de melón, hojas tiernas y jóvenes para cada uno de los individuos con los que se trabajó siguiendo el método CTAB modificado (Doyle and Doyle 1990). La concentración y calidad del DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (bajo peso molecular del tipo EEO de Pronadisa) al 1 % y utilizando tampón NEB 0.25x (Tris 25 mM, EDTA 0.25 mM, acetato sódico 30 mM, pH 8.1). Las muestras se tiñeron con bromuro de etidio 0.1 µg/mL y fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV.

La extracción de las poblaciones F2, de las familias que formaban parte tanto del experimento de genotipos fijos como de los estudios de progenie se realizó en tubo eppendorf (Doyle and Doyle 1990) con algunas modificaciones para mejorar la calidad de la extracción (García-Mas et al. 2000). Este método fue adaptado para placas de 96 pocillos (Deltalab 409004) para poder realizar cribados de un número elevado de plantas en los que era necesaria la selección de plantas en periodos de tiempo cortos pues nos permitía trabajar con lotes de 400 plantas al día.

3.4 Marcadores moleculares

En esta tesis hemos utilizado y desarrollado diferentes tipos de marcadores moleculares para la detección y mapeo fino del locus *ETHQV6.3*. A continuación se describirán los marcadores moleculares utilizados y cuando corresponda, cómo se desarrollaron.

3.4.1 AFLP (“Amplified Fragment Length Polimorphism”)

La metodología AFLP se aplicó según el protocolo original de Vos et al. (1995) con pequeñas modificaciones, se sustituyó la enzima *EcoRI* por *PstI*. A pesar de que

EcoRI produce un mayor número de polimorfismos que *PstI*, distintos estudios muestran como los polimorfismos originados mediante el uso de *EcoRI* tienden a localizarse formando clusters en las regiones centroméricas mientras que en el caso de *PstI* los polimorfismos se distribuyen de una forma más homogénea cubriendo las zonas distales de los cromosomas (Vuylsteke et al.1999).

A continuación se describen las cuatro etapas principales en el proceso de obtención de los marcadores AFLP.

Digestión del DNA

El DNA genómico (500 ng) fue digerido con dos enzimas de restricción: uno de corte frecuente, *MseI* (diana de restricción: TTAA) y otro de corte poco frecuente, *PstI* (diana de restricción GACGTC).

Ligación de los adaptadores

Tras la digestión del DNA se ligaron adaptadores específicos a los sitios creados por los enzimas de restricción. Las secuencias de los adaptadores se encuentran en los apéndices A.4 y A.5.

Amplificación del DNA

Las amplificaciones se llevaron a cabo en dos etapas: (1) amplificación preselectiva de todos los fragmentos generados durante la digestión y ligación de los adaptadores y (2) amplificación selectiva de los fragmentos originados por el uso de cebadores *Pst* y *Mse* con dos y tres bases adicionales respectivamente.

En la primera PCR se utilizaron cebadores complementarios a los adaptadores *Pst* y *Mse* añadiendo una base adicional (A, T, C y G), *MseI*+1 y *PstI*+1 (Apéndices A.4 y A.5).

La segunda amplificación o amplificación selectiva utiliza los mismos cebadores pero con dos nucleótidos más en el extremo 3' del cebador *MseI*+1 (*MseI*+3) y uno en extremo 3' del cebador *PstI*+1 (*PstI*+2). Se analizaron 1024 combinaciones utilizando 64 cebadores *MseI*+3 y 16 *PstI*+2.

Visualización de los fragmentos AFLPs

Los fragmentos de PCR amplificados y marcados radioactivamente fueron separados mediante electroforesis vertical en geles desnaturizantes de acrilamida. Tras la amplificación se añadió a cada muestra 10 µl de tampón de carga (95 % de formamida desionizada, EDTA 10 mM pH 8.0, 0.01 % xilencianol, 0.01 % azul bromofenol) y se desnaturizaron a 96°C durante 10 min.

Se cargaron 4 µl de las muestras en geles de acrilamida al 6 % (19:1 acrilamida/bisacrilamida, urea 7.5 M, 0,005 % persulfato de amonio, 0.1% TEMED y tampón TBE 1x) y se corrieron las muestras durante 90 min a 100 W. Después de la electroforesis, el gel fue transferido a un papel Whatman 3MM, secado al vacío y expuesto a un film fotográfico AGFA Curix RP2 durante dos días. Pasado este tiempo, el film fue revelado y se analizaron los patrones de bandas.

Asilamiento y purificación de los fragmentos AFLP

Las bandas de interés se recortaron del papel Whatman en el que se había secado el gel y se rehidrataron con 30 µl de agua estéril durante toda la noche a 4°C. Se tomaron 2 µl para la amplificación de los fragmentos AFLP utilizando los mismos cebadores y condiciones de la segunda PCR selectiva. Estas bandas fueron visualizadas en geles de agarosa al 2 % a partir de los cuales fueron aisladas y purificadas mediante el kit de purificación QIAquick de Qiagen (QIAGEN INC., Chatsworth, CA: Cat No. 28104) para su clonaje en el vector pGEM-T "Easy Vector System™" (Promega, Branford, CT, EE.UU) y su posterior secuenciación.

3.4.2 Microsatélites o SSR ("*Simple Sequence Repeats*")

Los microsatélites utilizados en esta tesis provenían de: (1) EST y estaban descritos en la literatura (Diaz et al. 2011) y recogidos en la bases de datos de ICuGI (<https://icugi.org>), (2) desarrollados a partir de genotecas genómicas (Fernandez-Silva et al. 2008a) y (3) fueron facilitados por otros grupos de investigación. Durante el transcurso de esta tesis se desarrollaron nuevos SSRs a partir de la secuencia del genoma del melón (Garcia-Mas et al. 2012) en la región de la introgresión de SC en el GL VI usando el buscador de secuencias repetitivas "Tandem Repeat Finder"

(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) (G. Benson 1999) y se diseñaron cebadores flanqueando las repeticiones con Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen 2000). Todos los microsatélites, sus cebadores y condiciones de amplificación aparecen listados en la tabla A.1 del apéndice.

La temperatura de hibridación óptima (T_{an}) de aquellos marcadores desarrollados durante esta tesis se obtuvo tras realizar una PCR de gradiente utilizando muestras de PS y SC. Las reacciones de PCR se realizaron en volumen final de 15 μ l con tampón Lab 10x [15 mM $(NH_4)_2SO_4$, 100 mM Tris-HCl, 500 KCl, gelatina 0.01 %], 1.5-3.5 mM $MgCl_2$, 166 μ M dNTPs, 5 pmol de cada cebador, 2 U Taq y 20 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial a 94° durante 1 min, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 s, temperatura de hibridación 40-60° durante 30 s, 72°C durante 1 min y un ciclo final a 72°C 5 min. La visualización de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %. A uno de los cebadores de cada par se le añadió en el extremo 5' la secuencia de veinte nucleótidos del vector M13 (5' CACGACGTTGTAAAACGACC 3') para la visualización mediante fluorescencia en un secuenciador automático.

El genotipado de las distintas poblaciones utilizadas en esta tesis se realizó mediante PCR en las mismas condiciones descritas anteriormente y a la temperatura de hibridación óptima para cada par de cebadores pero añadiendo 2 pmol de cada cebador y 0.66 pmol de oligonucleótidos marcados con IRD700 o IRD800 complementarios a la secuencia de 20 nucleótidos del M13. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un secuenciador vertical tipo LI-COR IR² (Li-Cor Inc, Lincoln, Nebraska, USA). Las electroforesis fueron realizadas en condiciones desnaturizantes a 50 °C en tampón TBE 1x (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8,0) y 7.5 M urea en geles de poliacrilamida al 6 % (AccuGelTM 19:1/ Sequencing Grade; National Diagnostics).

3.4.3 CAPS (“*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*”)

Los marcadores de tipo CAPS (Konieczny and Ausubel 1993) se caracterizan por la detección del polimorfismo mediante digestión con un enzima de restricción. Los marcadores fueron amplificados mediante PCR en un volumen final de 25 μ l que

contiene tampón Lab 10x [15 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM Tris-HCl, 500 KCl, gelatina 0.01 %], 1.4 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 400 μM de cada cebador y 3 U de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las utilizadas con los SSRs. La digestión con la enzima de restricción se llevo a cabo en un volumen final de 20 μl que contenía: 2 μl de tampón de la enzima 10x, 2.5 U del enzima, 10 μl del producto de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante del enzima. El producto de la digestión fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. En la tabla A.1 del apéndice se encuentran las condiciones y enzimas para cada marcador de tipo CAPS utilizado.

3.4.4. Mapeo de los nuevos marcadores

El programa MAPMAKER 3.0 (Lander et al. 1987) fue utilizado para cartografiar el locus *ETHQV6.3* en la población 2008-F2 de 152 individuos. El cartografiado genético de los nuevos marcadores desarrollados en la población 2010-F₂ se llevó a cabo utilizando los eventos de recombinación respecto al locus *ETHQV6.3*. Las distancias físicas fueron directamente obtenidas a partir de la secuencia del genoma del melón.

3.5. Clonaje en plásmido

3.5.1 Cepa de *E. coli*

La cepa DH5-(alfa) (*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) de *E. coli* fue utilizada para el clonaje de los fragmentos polimórficos derivados de AFLPs en el vector pGEM-T “Easy Vector System™” (Promega, Branford, CT, EE.UU).

3.5.2 Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se realizó mediante electroporación en un electroporador Gene Pulser Cell Xcel en cubetas de 0.1 cm enfriadas en hielo según las condiciones del fabricante (25 μF capacitancia, 200 Ω, 1800 V). Se añadieron 2 μL de ligación a 20 μL de suspensión celular (DH5α). Después de la electroporación las células se transfirieron a 1 mL de medio L (bactro-trypona 1 %, extracto de levadura 0.5

%, NaCl 0.5 %, D-glucosa 0.1 %, glicerol 10 %, pH 7). Se incubaron las células a 37°C durante 1 hora con una agitación de 150 rpm.

Las células transformadas fueron seleccionadas, tras ser incubadas durante toda la noche a 37°C, en medio LB agar (bacto-triptona 0.5 %, extracto de levadura 0.25 %, NaCl 0.5 %, glicerol 10 %, agar 0.75 %, pH 7) complementado con ampicilina (50 µg/mL) o carbamicina (100 µg/mL). Además, para la selección por α -complementación se añadieron X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosidasa) (0.12 mg/mL) e IPTG (isopropiltio- β -D-galactosidasa) (40 µg/mL).

3.5.3 Extracción y purificación del DNA plasmídico: mini preparación.

La purificación del DNA del plásmido se llevo a cabo mediante el método basado en la lisis alcalina de las células bacterianas (Birnboim and Doly 1979) modificado, seguido de una neutralización y equilibrado en presencia de concentraciones altas de sales.

3.6 Secuenciación del DNA

3.6.1 Reacción de PCR de secuencia

La secuenciación de los productos de PCR clonados o de los productos de PCR directamente, se llevo a cabo en un secuenciador automático ABI PRISM 377® 3130xl (Applied Biosystem, Foster City, USA). La reacción de secuencia estándar se realizó en un volumen final de 10 µl a partir de 20-100 ng de DNA (para productos de PCR de tamaño entre 500-2000 pb) o de 200-500 ng de DNA (para productos de PCR clonados en vector), 2 µl de Big Dye TM Terminator Cycle DNA Sequencing Kit 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA), 3,2 pmol del cebador M13Forward (F) o M13Reverse (R) o del cebador específico de cada secuencia empleada, 200 mM Tris-HCl pH 9.0 y 5 mM MgCl₂. El programa de amplificación usado consistió en 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C y finalmente 4 min a 60°C.

3.6.2 Precipitación de las reacciones de secuencia en placa

Para eliminar los cebadores y los dideoxinucleótidos marcados no incorporados, se agregaron al volumen de reacción de secuenciación 10 µL de agua, 2 µL de acetato sódico 3 M (pH 4,6), 2 µL de EDTA 125 mM y 50 µL de etanol 96%.

Después de 15 min a temperatura ambiente se centrifugaron a 3.000 rpm y 4°C por 45 min. Posteriormente, los amplicones precipitados se lavaron en etanol 70 % y se centrifugaron a 3.000 rpm y 4°C por 15 min. Finalmente, los amplicones fueron resuspendidos en 12 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystem, Foster City, USA).

3.6.3 Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias fue realizado haciendo uso del programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). La detección y genotipado de los SNPs se realizó a través de la inspección visual de los cromatogramas. Para la comparación de secuencias se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa Clustal X (Thompson et al. 1997).

3.7 Estudio genético de la maduración en la línea SC3-5-1.

3.7.1 Mapeo de QTL de maduración en LGs III y VI

La línea isogénica SC3-5 (Eduardo et al. 2005), fue seleccionada por producir frutos climatéricos (Moreno et al. 2008) lo que se atribuyó inicialmente a la introgresión en el GL III procedente del parental SC. En un estudio posterior se detectó una segunda introgresión en el GL VI, por lo que esta línea con dos introgresiones en los GLs III y VI se pasó a denominar SC3-5-1, para distinguirla de la SC3-5 real que contiene una única introgresión en el GL III (Vegas et al. 2010). Se caracterizó el tipo de maduración en las líneas SC3-5-1, SC3-5, el híbrido (SC3-5-1 x PS) y los parentales PS y SC, midiéndose la producción de etileno en tres frutos de cada línea a lo largo del tiempo desde 30 DAP hasta la aparición del característico pico de la hormona en el caso de los frutos climatéricos o la aparición de los primeros síntomas de putrefacción.

Para determinar el control genético de la maduración climatérica en SC3-5-1, esta línea fue retrocruzada con PS, y posteriormente el híbrido se autofecundo para obtener una población F2 (2008-F₂) de 152 plantas donde segregaban las introgresiones de los GLs III y VI. El genotipo de cada uno de los individuos F2 fue verificado mediante los marcadores: A₁₆-C12 y PS₁₈-D10 para el GL III, y PSI₄₁-H06, CMTCN41, CMN61₁₄, TJ14 y CI₂₃-F08 para el GL VI. Un fruto de cada

individuo fue fenotipado y clasificado como climatérico o no climatérico. La asociación entre el tipo de maduración y las introgresiones de SC en los grupos de ligamiento III y VI fue estudiada mediante un test de contingencia ($p < 0.05$) y con el método de “*Composite Interval Mapping*” (CIM) (Zeng 1994) usando el programa qGENE (Nelson 1997) calculando el LOD “*score threshold*” para un nivel de significación $\alpha < 0.05$ mediante un test de permutación con 1000 interacciones. El estudio de interacción entre las dos introgresiones se realizó mediante un ANOVA de dos vías. Para el análisis de la correlación entre los distintos fenotipos estudiados (firmeza de la carne, índice brix) y el modelo de maduración se llevó a cabo un contraste de medias de dichos caracteres entre frutos climatéricos y no climatéricos usando la prueba de la t de student con un nivel de significación del 0,05.

3.7.2. Mapeo de alta resolución de *ETHQV6.3*

Tras verificar la presencia de un QTL de maduración en el GL VI (denominado *ETHQV6.3*), se planteó realizar un mapa de alta resolución de la región como primer paso para su clonaje posicional. Semillas de 9 individuos de la población 2008-F₂ recombinantes para la introgresión del GL VI con la introgresión del GL III fijada en homocigosis para el parental SC se seleccionaron para determinar si contenían *ETHQV6.3* mediante un test de progenie. Estos 9 recombinantes fueron autofecundados originando familias (progenies) compuestas por 20 individuos cada una. El genotipo de cada uno de los individuos fue verificado mediante los marcadores: A_16-C12 y PS_18-D10 para el GL III, y PSI_41-H06, MU10920, AI_19-F11, CMBR002, AI_03-B03, FR14-P22, CMTCN41, CMN61_14, TJ14 y CI_23-F08 para el GL VI. Un fruto de cada individuo fue fenotipado y clasificado como climatérico o no climatérico.

Posteriormente, autofecundando un individuo F₃, que poseía los alelos del parental SC en homocigosis para el QTL del GL III (*ETHQB3.5*) y en heterocigosis para la introgresión del GL VI, se desarrolló una segunda población F₃ de 967 individuos que a efectos genéticos se comportaba como una población F₂ por lo que pasó a denominarse como 2010-F₂. El uso de la misma nos permitió confirmar la existencia de un segundo QTL en el GL VI y aumentar la resolución del mapa genético de la región, hasta la identificación de un conjunto de genes candidatos. Se cribó la

población 2010-F₂ mediante marcadores flanqueantes (PSI_41-H06 y CMTCN 41) a *ETHQV6.3*, seleccionándose los individuos recombinantes entre ambos marcadores del tipo AH, HA y AB, siendo A=PS, B=SC y H=heterocigoto; pues eran los únicos que presentaban el fenotipo climatérico. Estos fueron trasplantados al invernadero para ser autofecundados y sus frutos fenotipados analizando además la dehiscencia de los frutos en DAP; cada individuo recombinante fue genotipado (PSI_41-H06, CMCT123, CMN21-37, MU10920, CI_56-B01, AI_19-F11, AI_03-B03, 28.37, FR14-P22 y CMCTN41). Posteriormente, se seleccionaron los individuos recombinantes del intervalo en el que se encontraba el QTL, éstos se autofecundaron dando lugar a familias (progenies) de 20 individuos cada una que fueron genotipados (PSI_41-H06, AI_03-B03, 28.37, AP2/ERF, 28.1723, FR14-P22, 28.3215, 28.3377 y CMCTN41) y fenotipados permitiéndonos la construcción de un mapa genético de alta resolución de *ETHQV6.3*. El análisis de la dehiscencia de los frutos en las familias del estudio de progenie se llevo a cabo comparando las medias obtenidas en cada familia con la línea control SC3-5-1 mediante un test de Dunnet's de dos colas con un nivel de significación del 0.05 ($\alpha < 0.05$). Adicionalmente, ya que la distribución de la dehiscencia se desviaba de la normal se llevo a cabo un test Kruskal-Wallis. Adicionalmente el uso de los nuevos recombinantes originados durante este estudio de progenie nos permitió identificar un conjunto de genes candidatos para el QTL

3.7.3. Interacción entre *ETHQV3.5* y *ETHQV6.3*

Por último para el estudio de la interacción entre ambas introgresiones y su efecto sobre el fenotipo climatérico se llevó a cabo un experimento denominado de genotipos fijos. Para ello, se originaron y caracterizaron cuatro líneas a partir de cuatro individuos 2008-F₂ que representaban las cuatro posibles combinaciones alélicas en homocigosis para ambas introgresiones: (1) alelos de PS en ambas, (2) alelos de SC en GL III y de PS en GL VI, (3) alelos de SC en GL VI y alelos de PS en GL III y (4) alelos de SC en las dos introgresiones. Estos individuos fueron autofecundados originando familias de 10 individuos, cuyos genotipos fueron verificados mediante el uso de los marcadores A_16-C12 y PS_18-D10 para el GL III, y PSI_41-H06, AI_03-B03, FR14-P22, CMCTN41, CMN61_14, TJ14 y CI_23-F08 para el GL VI; y se fenotipó un fruto de cada individuo durante dos años consecutivos.

En la figura 3.1 se muestran las distintas poblaciones generadas a lo largo del proyecto de tesis y para qué fueron utilizadas cada una de ellas, junto con el nombre del QTL (*ETHQV6.3*) que se ha caracterizado durante este proyecto de tesis.

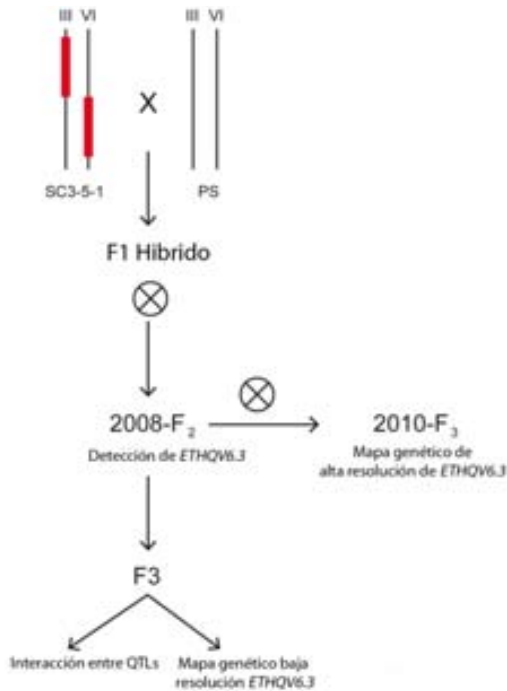


Figura 3.1. Poblaciones utilizadas durante este proyecto de tesis para el estudio del climaterio en la línea SC3-5-1. Con dos barras rojas se muestran las introgresiones de “Songwan Charmi” SC en el fondo genético de “Piel de Sapo” en los GL III y VI. Mediante un aspa se indican los cruzamientos y cuando ésta se encuentra dentro de un círculo, auto fecundación.

3.8. Análisis estadístico

El estudio de caracteres cuantitativos (QTLs) fue llevado a cabo mediante el método de “*Composite Interval Mapping*” (CIM) (Zeng 1994) usando el programa qGENE (Nelson 1997). Todos los análisis estadísticos llevados a cabo como los test de contingencia, ANOVAs, los contraste de medias, el test de Dunnet’s y el test Kruskal-Wallis, se llevaron a cabo utilizando el programa JMP v5.12 para Windows (SAS Institute Inc., NC, USA).

3.9 Estudio transcriptómico mediante hibridación de Micromatriz de DNA.

3.9.1. Diseño experimental

Anteriormente a que se iniciara este trabajo de tesis y dentro del proyecto “*Understanding the climacteric vs non-climacteric fruit ripening mechanisms in melon using*

transcriptomic, metabolomic and reverse genetic approaches (MELRIP), incluido en el programa ERA-PG, se desarrolló una nueva micromatriz con la tecnología NimbleGen, a partir del desarrollado previamente por Mascarell-Creus et al. (2009). A ésta se le añadieron 242 unigenes: 33 obtenidos a partir de la base de datos del NCBI (*"The National Center for Biotechnology Information database"*) y 209 ESTs de ICuGI (<http://www.icugi.org/>). Finalmente, el nuevo chip contenía un total de 17,443 unigenes con una longitud de 60 nucleótidos (60 mers), representados cuatro veces (70K). Se hibridaron muestras de cDNA de pulpa de tres réplicas biológicas provenientes de genotipos con maduración climatérica y no climatérica para proceder al análisis transcriptómico, en cuatro estadios diferentes del desarrollo del fruto, previamente seleccionados tras estudios metabolómicos realizados en el *"Max Planck Institut of Molecular Plant Physiology"* (MPIMP, Gölml). Uno de los genotipos climatéricos utilizados, además de las variedades climatéricas Dulce y Vèdrantais, fue la línea climatérica SC3-5-1. Como genotipos no climatéricos se utilizaron los parentales de nuestra línea *"Piel de Sapo"* (PS) y *"Songwan Charmi"* (PI) (Fig. 3.2).



Figura 3.2. Genotipos climatéricos (Dulce, Vèdrantais y SC3-5-1) y no climatéricos (PS y PI) a distintos tiempos de desarrollo del fruto utilizados en el estudio transcriptómico mediante el uso de la micromatriz de melón. (Saladie et al. manuscrito en preparación).

3.9.2. Normalización y análisis de los datos

Para el análisis y normalización de los datos crudos procedentes de las hibridaciones se colaboró con el Dr. Lohse del "Max Plant Institute for Molecular Plant Physiology" (MPIMP); donde se han desarrollado herramientas para el análisis y la normalización de datos provenientes de micromatrices. Una de esas herramientas ROBIN (Lohse et al. 2010) permite además de normalizar esos datos, conocer la calidad técnica y estructura de los mismos mediante varios métodos estadísticos. ROBIN es un software libre basado en el lenguaje de programación R-Bioconductor (Gentleman et al. 2004), que incluye una serie de paquetes y librerías como LIMMA (Smyth G. 2004) que permiten la normalización de datos de micromatrices.

Después del escaneo de los "spots" para cada muestra o chip (Tabla 3.1) se procedió a un primer análisis visual de las hibridaciones con el fin de identificar la presencia de posibles burbujas, arañazos o diferencias de señal localizadas en determinados puntos del array; en este paso se excluyó la muestra PS-18a (15 DAP) del estudio al no cumplir los estándares de calidad. Posteriormente se seleccionaron los triplicados restantes para ser normalizados mediante el uso de ROBIN; previamente en el MPIMP se adaptó el *script* a las características físicas del array desarrollado por NimbleGene. La normalización de los datos se llevó a cabo con el paquete LIMMA ("*Linear Models in Microarrays*") del software Bioconductor (Gentleman et al. 2004). Los datos fueron normalizados para compensar las posibles diferencias en el marcaje de las muestras y otras fuentes de variabilidad no biológicas.

Tabla 3.1. Listado de muestras de cada uno de los genotipos (Dulce, Vèdrantais, SC3-5-1, PS y SC) a distintos tiempos de desarrollo del fruto (15, 25, 35 DAP y punto de cosecha o harvest) hibridadas en la micromatriz de melón.

Genotipo	15 DAP	25 DAP	35 DAP	Harvest
Dulce	Dulce-4a_15d	Dulce13a_25d	Dulce-5a_35d	Dulce-18a_50d
	Dulce-16a_15d	Dulce-21a_25d	Dulce-9a_35d	Dulce-18b_50d
	Dulce-26a_15d	Dulce-32a_25d	Dulce-29a_35d	Dulce-34a_50d
Vèdrantais	VED-12a_15d	VED-23b_25d	VED-3a_35d	VED-8a_45d
	VED-19a_15d	VED-26a_25d	VED-11a_35d	VED-12a_45d
	VED-27a_15d	VED-26b_25d	VED-20a_35d	VED-19a_45d
SC3-5-1	SC3-5-1-16a_15d	SC3-5-1-19a_25d	SC3-5-1-1a_35d	SC3-5-1-J4a_45d
	SC3-5-1-16b_15d	SC3-5-1-12a_25d	SC3-5-1-6a_35d	SC3-5-1-28a_45d
	SC3-5-1-4a_15d	SC3-5-1-22a_25d	SC3-5-1-18a_35d	SC3-5-1-37a_45d
PS	PS-1a_15d	PS-S1_25d	PS-29a_35d	PS-37a_55d
	PS-18a_15d	PS-S2_25d	PS-23a_35d	PS-E1a_55d
	PS-16a_15d	PS-3a_25d	PS-9a_35d	PS-36a_55d
SC	SC-1b_15d	SC-JP2a_25d	SC-33a_25d	SC-9a_50d
	SC-23a_15d	SC-JP2b_25d	SC-6a_35d	SC-10a_50d
	SC-1a_15d	SC-4a_25d	SC-21a_35d	SC-18a_50d

La intensidad de los spots provenientes de los escaneados fueron calculadas y normalizadas usando el método de “*Robust Multichip Average*” (RMA) (Irizarry et al. 2003).

La calidad de los datos fue estudiada para cada chip comparando la distribución de la señal de cada uno de ellos con una distribución teórica calculada a partir de la mediana de expresión de todos los chips. Estos gráficos MA representan el \log_2 del “*fold change*” de la expresión (M) frente a la media del \log_2 de la intensidad de la señal (A). Además ROBIN ofrece dos medidas más de la calidad: (1) el porcentaje de genes que presentan un “*fold change*” superior a 2 ($\%>LCFI$) y (2) la integral de los valores absolutos obtenidos de la línea ajustada mediante regresiones pesadas localmente lineales (LOWESS, “*locally weighted scatter plot smooth*”) a los valores de intensidad (I). Cuando en uno de los chips el número de genes que presentan un “*fold change*” es mayor al 5 % o los valores de $I > 1.5$, el programa nos advierte de que podemos estar ante un problema relacionado con efectos de artefactos sobre la intensidad de la señal. Aquellos chips en los que se excedían ambas medidas fueron excluidos del análisis (Apéndice A.11).

Los datos generados en un experimento de micromatriz de DNA pueden ser entendidos como una matriz de p columnas, donde p es el número de chips del experimento, y n filas, donde n es el número de genes del “*array*”. Por lo que el conjunto de los datos puede ser visualizado como un conjunto de n puntos en un espacio p -dimensional. El análisis de componentes principales (PCA) reduce la dimensionalidad de un conjunto de datos encontrando un número pequeño de combinaciones llamados componentes principales que explican la mayor parte de la varianza observada y nos permiten comparar las replicas utilizadas en el experimento y por lo tanto es una medida indirecta de la calidad de nuestros datos.

La principal aplicación de Mapman, es la detección de tendencias metabólicas mediante el estudio de bloques de genes anotados previamente (Thimm et al. 2004) y asignarlos a una serie de categorías funcionales jerarquizadas (BINs, subBINs, enzimas individuales, etc.). Esta herramienta permite al usuario determinar a través del test estadístico *Wilcoxon Rank Sum* aquellas categorías funcionales que muestran un

comportamiento diferente o están muy representadas en términos de perfiles de expresión en relación al resto de BINs, lo que sugeriría una tendencia.

3.10. Estudio transcriptómico mediante secuenciación masiva de alto rendimiento

3.10.1. Diseño experimental

Para el estudio de los cambios que se producen a nivel transcripcional entre los estadios fruto maduro de inmaduro y las diferencias entre la maduración de tipo climatérica y no climatérica en melón se llevó a cabo la secuenciación masiva del transcriptoma de frutos de la línea climatérica SC3-5-1 y el parental no climatérico PS a dos estadios de desarrollo de fruto distintos. Durante el verano de 2011 se cultivaron 20 individuos, siguiendo las indicaciones descritas en material y métodos, tanto de estas dos líneas como de las líneas 8M35 (*ETHQB3.5*) y 8M40 (*ETHQV6.3*) originadas anteriormente durante el experimento de genotipos fijos. Se recogieron muestras de pulpa de fruto cada cinco días desde los 15 días DAP hasta el estadio maduro para cada uno de los genotipos, se extrajo RNA de cada uno de los triplicados y se sintetizó el correspondiente cDNA. Durante la evaluación fenotípica de las líneas se confirmó lo observado durante el experimento de genotipos fijos, la línea climatérica SC3-5-1 producía frutos maduros dehiscentes a 35 DAP ("*harvest*") mientras que las otras dos líneas (8M35 y 8M40) lo hacían entre 45-50 DAP. Los frutos de la línea SC3-5-1 probablemente comenzaban a producir etileno antes de 35 días hasta formar frutos completamente maduros y dehiscentes, por lo que era necesario identificar el momento en el que se producía el pico de etileno en estas muestras.

3.10.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

El RNA de las muestras de melón pertenecientes a los frutos de las familias de genotipos fijos (PS, SC3-5-1, 8M35 y 8M40), a distintos tiempos de desarrollo y por triplicado, se extrajo a partir de 100 mg de pulpa utilizando el kit RNeasy® Plant (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cada muestra se purificó usando tres columnas en un volumen de elución de 30 µL por columna. Los 90 µL de muestra fueron tratados con 2 µL de DNAsa usando el kit

TURBO-DNA Free™ (Ambion, Foster City, CA, USA). Algunas muestras necesitaron un mayor número de columnas para obtener la cantidad mínima exigida para la síntesis de cDNA por lo que se ajustaron las condiciones del protocolo a los nuevos volúmenes. Finalmente, para homogenizar los volúmenes y eliminar restos de azúcares se precipitaron todas las muestras de RNA con etanol 100 % y NH₄OAc 7.5 M y se resuspendieron en un volumen de 30 µL de agua HPLC.

La síntesis de cDNA para las muestras del experimento de genotipos fijos se realizó con el kit SuperScriptIII® Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a partir de 1 µg de RNA de cada una de las muestras. La integridad del cDNA fue estudiada mediante electroforesis en gel de agarosa y mediante Nanodrop ND-1000 (NanoDrop®Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

3.10.3. Expresión del gen control para la maduración en fruto de melón

Para la determinación de los dos estadios de fruto, en las líneas SC3-5-1 y PS, para la secuenciación de alto rendimiento, se estudió la expresión del gen control para la maduración *CmACO1* y el gen de la ciclofilina como control (*CmCYP7*) mediante una PCR en un volumen final de 25 µl que contiene tampón Lab 1x [20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01% (v/v) Tween 20], 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM de cada cebador y 3 U de Taq DNA polimerasa. El programa de amplificación fue el mismo que el utilizado para los SSR y se visualizó el producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las secuencias de los cebadores y las condiciones de la amplificación se encuentran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Secuencias de los cebadores y condiciones para la amplificación de los genes *CmACO1* y *CYP7*.

Nombre	Secuencia cebador R	Secuencia cebador F	T _{an} (°C)	[MgCl ₂] (mmol)
<i>CmACO1</i>	CACCCACTTTTTTCATTAATAG	GAGAACAAGACTCCTTAATTCC	45	2
<i>CYP7</i>	GTGTAAGATTGGGAGAATCAAAC	CAAAGGATTAGACATAGTATGC	50	2

3.10.4. Extracción RNA para secuenciación de alto rendimiento

Para el estudio transcriptómico mediante secuenciación de alto rendimiento era necesaria la obtención de RNA de alta calidad y en cantidad suficiente por lo que se extrajo RNA de pulpa de fruto de las muestras en las que se había detectado previamente la expresión de *CmACO1* en las líneas PS y SC3-5-1, a partir de 1.5 g de

material utilizando el kit TRI Reagent® (Sigma, St. Louis, MO, USA) modificado para tubos falcon de 30 ml resuspendiendo las muestras en un volumen final de 200 µL. La purificación y concentración de las muestras se llevó a cabo mediante precipitación diferencial con acetato de amonio (NH₄OAc) 7.5 M y 2.5V de etanol, resuspendiéndose el RNA total en 50 µL de agua HPLC.

La concentración y la calidad del RNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, como se encuentra detallado en la extracción de DNA genómico, y mediante espectrofotometría con un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop®Technologies, Wilmington, Delaware). En el caso de las muestras de RNA para el experimento de secuenciación masiva se analizó la calidad y la distribución de tamaño de los fragmentos con un BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.10.5. Purificación del RNA (poliA⁺)

El RNA (poliA⁺) se extrajo con el sistema Dynabeads mRNA DIRECT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a partir de una cantidad de 75 µg de RNA total, extraído siguiendo el método explicado en el apartado anterior. Se trata de un método rápido de aislamiento y purificación de mRNA de extractos de células eucarióticas. Se basa en la unión entre las colas poliadeniladas (poliA⁺) de los mRNA a secuencias poliT que se encuentran unidas covalentemente a esferas magnéticas de pequeño tamaño suspendidas en un medio acuoso.

El RNA total se mezcla con un volumen de 100 µL de tampón de anillamiento [100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 1% LiDS y 5 mM dithiothreitol (DTT)] durante dos minutos a 65°C; se añaden las bolas magnéticas y se hibridan durante 5 min a temperatura ambiente para posibilitar la unión del mRNA a las secuencias poliT.

Tras la hibridación se procede con dos rondas de lavado para eliminar todos aquellos restos que no se han unido correctamente; estos lavados consecutivos se llevan a cabo con los tampones de lavado I (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA y 0.1 % LiDS) y II (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl y 1 mM EDTA). Finalmente, el RNA (poli A⁺) fue eluido mediante un tampón de elución a 80°C durante dos minutos.

El mRNA es diluido 1/3 y 1 μ L es cuantificado mediante Nanodrop ND-1000 (NanoDrop®Technologies, Wilmington, Delaware) y otros 2 μ L usando BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

3.10.6. Secuenciación masiva de alto rendimiento mediante 454

En el servicio de secuenciación del CRAG se llevo a cabo la secuenciación del transcriptoma de la línea SC3-5-1 y el parental “Piel de Sapo” a dos tiempos de maduración distintos y en triplicados biológicos a partir de las muestras de mRNA. Se incluye aquí una breve descripción del proceso con el objetivo de facilitar la comprensión del objetivo perseguido durante este experimento.

Preparación de las genotecas de cDNA

La preparación de las genotecas (cDNA Rapid Library Preparation Method Manual, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) consistió en la construcción de una colección de fragmentos de DNA de doble cadena complementario (cDNA) a partir del mRNA extraído y purificado en el apartado 3.10.5. A los fragmentos se le unen unos adaptadores necesarios para la preparación de las muestras, en la reacción de secuenciación y en el análisis de los resultados.

El primer paso consistió en la fragmentación térmica del mRNA para la obtención de fragmentos del tamaño adecuado para asegurar lecturas más largas de los transcritos. Una vez conseguidas unas cadenas de mRNA del tamaño adecuado (50-2000 pb), se sintetizó cDNA utilizando el kit comercial DNA Synthesis System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para la síntesis de la primera cadena se utilizaron cebadores aleatorios de seis bases (Primer Random, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) que se unen en puntos aleatorios de la secuencia y que actúan como iniciadores de la transcripción inversa. Después de completar la segunda cadena se purificó el cDNA, se repararon los extremos, se añadió una adenina en 3' y se fosforilo el último nucleótido en 5'. Los adaptadores tienen una timina en 3' que se une a la adenina del fragmento y ambos son ligados por una enzima ligasa. Los dos marcadores que se añaden se denominan A y B y tienen como objetivo formar una unión estable entre dichas secuencias y varios soportes. Además, ambos adaptadores contienen en su secuencia un motivo de cuatro pares de bases, marcador MID (“*Molecular Identifier*”)

que se utiliza a modo de etiqueta identificativa para cada muestra, permitiendo mezclar diversas muestras en una sola carrera de secuenciación.

Finalmente se eliminaron aquellos fragmentos que no estaban unidos al adaptador A, los fragmentos pequeños (que disminuyen la sensibilidad del sensor utilizado en la secuenciación) y se cuantificó la genoteca de cDNA utilizando la fluorescencia emitida por el adaptador A.

PCR en emulsión (emPCR)

Como paso previo a la secuenciación, se amplificó clonalmente la genoteca de cDNA mediante un protocolo de PCR en emulsión (emPCR). Éste consiste en una serie de reacciones de PCR individuales llevadas a cabo dentro de gotas de agua en el seno de una emulsión oleosa. La PCR está diseñada de modo que cada gota contenga en su interior solamente una micro esfera unida a un único fragmento de la genoteca de cDNA, que será utilizado como molde. La unión se consigue mediante el revestimiento del soporte esférico con una sonda complementaria al adaptador A. Como la PCR tiene lugar en un ambiente cerrado se disminuyen las interacciones competitivas obteniendo una amplificación más homogénea y consiguiendo que las nuevas copias de la secuencia molde, que también contienen el adaptador, recubran la micro esfera.

Tras la reacción de amplificación se suceden una serie de lavados que tienen como objetivo separar las micro esferas de la emulsión, recuperar solo aquellas que estén unidas a DNA y seleccionar solamente aquellos fragmentos flanqueados por un adaptador de cada tipo (A y B). Por último es necesario desnaturalizar el DNA y añadir el cebador de secuenciación, cuya secuencia es complementaria al adaptador B.

Dado que el número de muestras era pequeño, se siguió el protocolo de trabajo con pequeños volúmenes (emPCR Method Manual – Lib-L SV, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

3.10.7. Normalización de los datos

Tras obtener las secuencias se llevo a cabo un preprocesamiento de las mismas eliminando en un primer momento las secuencias identificadoras MID usando el programa Newbler 2.6 (Roche).

3.11. Aislamiento y análisis de secuencias de los miembros de la familia NAC

A partir del conjunto de genes candidatos obtenidos tras el mapeo fino de *ETHQV6.3* se seleccionó, MELO3C016536, un miembro de la familia de factores de transcripción NAC para su caracterización. Se diseñaron los cebadores, CL1154-4R (GTTTTACCTTGGAGCTTCCTG) y CL1154-2R (CTCAAATTTTCGTCTCTCCTT), para la amplificación y secuenciación del gen usando Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen S 2000) a partir de cDNA de PS y de la línea SC3-5-1. En un primer momento mediante una PCR de gradiente se determinó la temperatura de hibridación más adecuada (59°C) que permitía la amplificación del gen a partir de cDNA de PS y la línea SC3-5-1.

Para la identificación del resto de miembros de la familia de los NAC se hizo uso del genoma del melón (García-Mas et al. 2012) y la herramienta bioinformática Phylome (Huerta-Cepas et al. 2011). Todas las secuencias fueron alineadas utilizando CLUSTALW versión 2.0 (Larkin et al. 2008) y los árboles filogenéticos construidos usando *Maximum Likelihood Method* para la reconstrucción filogenética de los distintos miembros de la familia de los NAC, y mediante *Neighbour-Joining Method* con un “bootstrap” de 100 interacciones para el análisis filogenético con otros genes NAC de función conocida pertenecientes a distintas especies, cuyas secuencias fueron obtenidas a partir de NCBI y otras bases de datos (Apéndice A.16). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron en el programa MEGA5 (Tamura et al. 2011).

4. ESTUDIO DEL CONTROL GENÉTICO DE LA MADURACIÓN CLIMATÉRICA EN SC3-5-1

4.1. INTRODUCCIÓN

La maduración del fruto es un proceso complejo y altamente regulado en el que el mismo sufre una serie de cambios fisiológicos y metabólicos que afectan a un gran número de cualidades organolépticas como el color, la textura, el sabor y el aroma. Es por esto que este proceso biológico ha sido y es objeto de numerosos estudios tanto a nivel fisiológico como molecular.

Para el estudio de la maduración genética en melón se selecciono la NIL climatérica SC3-5 (descrita en material y métodos 3.1), para su caracterización genética y fisiológica. Así, tras el rastreo con más marcadores moleculares, se detectó una segunda introgresión del parental SC en el GL VI; pasando a ser denominada la línea con dos introgresiones de SC en ambos grupos de ligamiento como SC3-5-1 (Vegas et al. 2010). Mediante el uso de marcadores moleculares se originó una línea con una única introgresión en GL III que fue denominada SC3-5.

En un trabajo previo se confirmó la naturaleza no climatérica de las líneas parentales SC y PS al medirse la síntesis de etileno, a lo largo del desarrollo de los frutos, confirmándose la ausencia de picos en la síntesis de la hormona. Adicionalmente se aplicó etileno de forma externa a frutos de las mismas líneas observándose que mientras que el parental PS no respondía a este tratamiento, SC lo hacía de manera moderada, indicando diferencias en la naturaleza no climatérica de ambos genotipos (Saladié, comunicación personal). Sorprendentemente tanto la línea con una única introgresión (SC3-5) como la línea con dos (SC3-5-1) producen frutos climatéricos en claro contraste con la naturaleza no climatérica de los parentales, por lo que en este primer apartado se analizará la asociación entre cada una de las introgresiones y el tipo de maduración de los frutos, y la interacción entre ambas.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Caracterización genética del climaterio en la línea SC3-5-1

Los parentales PS y SC no mostraron en ningún caso el característico pico de etileno de frutos climatéricos produciendo niveles muy bajos de la hormona aunque siendo un poco superiores en el parental SC, en el que se observaba un pequeño pico a los 47 DAP (1.82 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$) que indicaría que pese a no ser capaz de llevar a cabo la síntesis autocatalítica del etileno, que daría lugar al característico pico climatérico, si que se produce una cierta acumulación de la hormona en el fruto (Figura 4.1). Por el contrario, SC3-5-1 y SC3-5 sí que producían etileno y mostraban el pico en la síntesis de la hormona propio de frutos climatéricos. La producción de etileno era mayor en la línea SC3-5-1, con valores de 3.63 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ a 40 DAP, que en la línea SC3-5, donde se alcanzaban valores máximos de 2.17 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ tres días más tarde (43 DAP). El híbrido mostró una producción constante de etileno en torno a 1 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$, sin observarse ningún aumento significativo en la producción, comportándose como los genotipos no climatéricos, lo que en principio indicaría un control genético recesivo de la maduración de tipo climatérica en esta población.

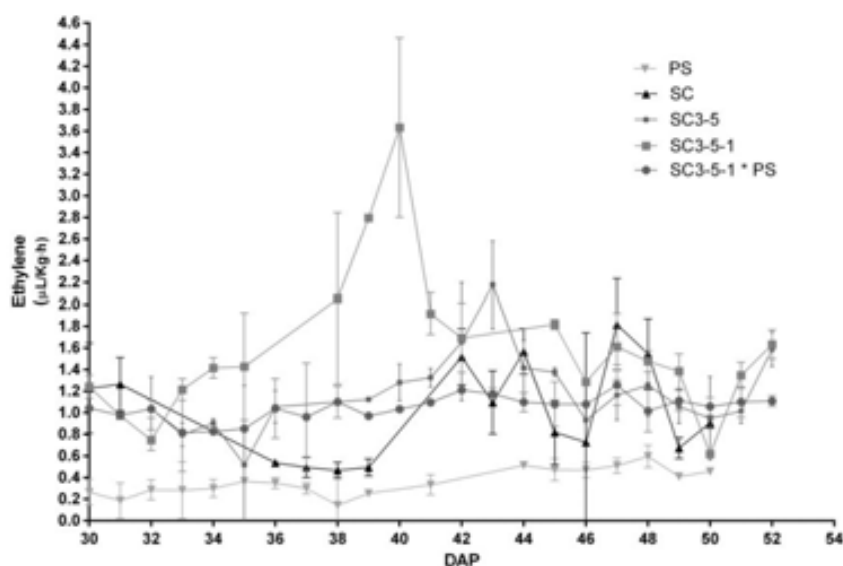


Figura 4.1. Producción de etileno en DAP (días después de la polinización) en las líneas SC3-5, SC3-5-1, PS, SC y el híbrido SC3-5-1xPS (media \pm DS, n= 3).

Además el fenotipo externo de los frutos también permitía distinguir fácilmente entre frutos climatéricos y no climatéricos. En los frutos con maduración climatérica se observó la formación de una zona de abscisión y el cambio de color en la piel externa del fruto de verde a amarillo, siendo más pronunciado este cambio en la línea SC3-5-1 que en la otra línea climatérica SC3-5 (Fig 4.2).

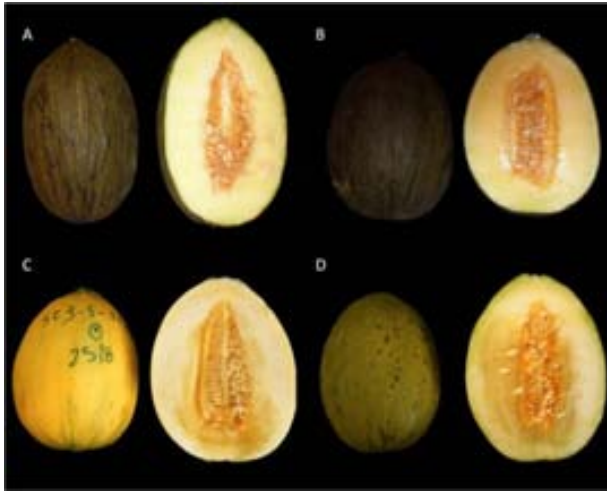


Figura 4.2. Frutos de “Piel de Sapo” (PS), SC3-5, SC3-5-1 y el híbrido SC3-5-1xPS. A) PS, B) híbrido SC3-5-1xPS, C) SC3-5-1 y D) SC3-5. Los frutos de las líneas SC3-5 y SC3-5-1 muestran características climatéricas como el cambio de color externo o la formación de una zona de dehiscencia en el pedúnculo del fruto; mientras que PS y el híbrido no muestran ninguna de estas características.

Los 152 frutos de la población 2008-F2 (SC3-5-1 x PS), ambos parentales y el híbrido fueron fenotipados como aparece descrito en el apartado 3.2 de material y métodos, clasificándolos como frutos climatéricos o no climatéricos siguiendo los criterios expuestos anteriormente. Para estudiar el efecto de las dos introgresiones sobre el fenotipo se investigó la asociación entre algunos marcadores moleculares y el tipo de maduración mediante un test de contingencia (Apéndice A.2). Se observó una asociación estadísticamente significativa entre los alelos de SC en los marcadores A_16-C12 (GL III) y CMN61_14 (GL VI) y la maduración de tipo climatérico ($\chi^2= 14.345$, $p=0.0002$ y $\chi^2= 44.076$, $p<0.0001$, respectivamente); demostrando que en ambas introgresiones se encuentran genes involucrados en la maduración climatérica de los frutos.

Además se llevó a cabo un análisis de QTLs para los dos grupos de ligamiento mediante mapeo por intervalos compuestos que nos permitió verificar la presencia de un nuevo QTL para maduración de fruto en el GL VI que se denominó *ETHQV6.3* (LOD=14.2), que explicaba el 34 % de la varianza fenotípica y en el que la presencia de los alelos de SC induce maduración climatérica de los frutos. También se detectó en la misma región un QTL para firmeza de la carne *FFQT6.3* (LOD=2.7) (Figura 4.3).

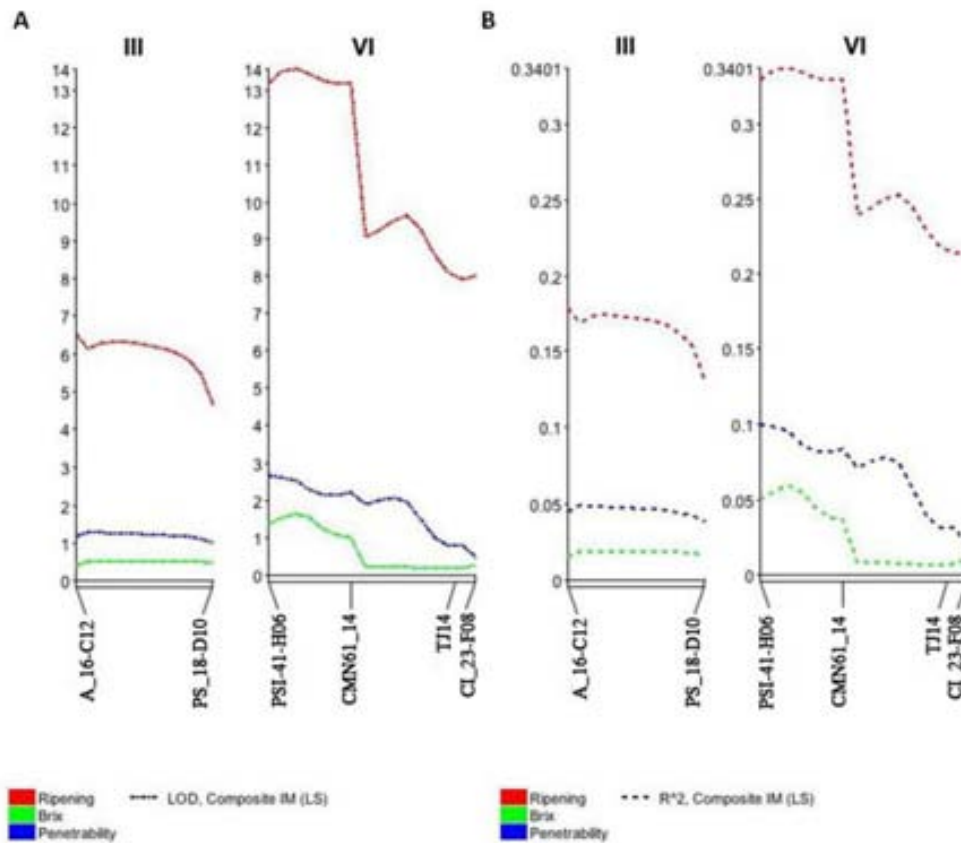


Figura 4.3. Perfil para valores en distintas posiciones de los A) LOD y B) R² para QTLs que afectan al modo de maduración, la firmeza de la carne y el contenido en azúcares de los frutos en los GL III y VI. En la parte inferior del eje de coordenadas se indican los marcadores.

Los frutos con maduración de tipo climatérica mostraban una menor firmeza de la carne que aquellos frutos no climatéricos ($p < 0.0001$) en nuestra población. Por el contrario ningún QTL fue detectado para el contenido de sólidos solubles (SSC) en estos intervalos (Figura 4.3) y no se observaron diferencias en el índice Brix entre los frutos climatéricos y los no climatéricos (Figura 4.4).

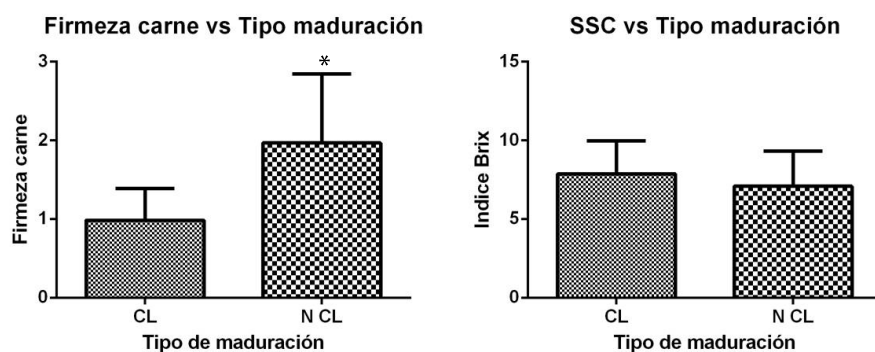


Figura 4.4. Comparación de medias para la firmeza de la carne y la acumulación de azúcares (SSC) entre frutos climatéricos y no climatéricos. Tanto los datos de firmeza como el contenido de azúcares en frutos corresponden a la media de los frutos divididos entre climatéricos (CL) y no climatéricos (NCL). El asterisco indica diferencias significativas entre los dos tipos de maduración (t-test, $p < 0.005$).

Ya que ambos QTLs tenían un efecto sobre el fenotipo climatérico de los frutos se investigó un modelo de dos QTLs con interacción. Se seleccionaron los marcadores PSI_41-H06 y CMN61_14 (GL VI) y PSI_18-D10 (GLIII) para analizar la interacción entre ambos QTLs. Este modelo fue probado mediante ANOVA de dos vías; siendo la interacción entre ambos significativa ($p < 0.048$) para los marcadores PSI_18-D10 y CMN61_14 (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para el efecto de los marcadores PSI_18-D10 (*ETHQB3.5*) y CMN61_14 (*ETHQV6.3*), y la interacción entre ambos, sobre el tipo de maduración de los frutos en la población 2008-F2.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Varianza	F Calc	R ²
Modelo	8	11.4	1.39	14.04	0.4471
Error	142	14.08	1.10	Prob > F	
C. Total	150	25.22		< .0001*	

Test					
Modelo	N	GL	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
PSI_18-D10	2	2	1.0644102	5.3677	0.0057*
CMN61_14	2	2	7.0985255	35.797	<.0001*
PSI_18-D10*CMN61_14	4	4	0.975369	2.4593	0.0482*

En la figura 4.5 se puede observar el efecto de los alelos de cada marcador sobre el fenotipo y la interacción entre los distintos alelos de ambos marcadores, codificándose como A homocigótico para los alelos SC, B homocigótico PS y H, heterocigoto. Cuando ambos loci son homocigóticos (AA) se observa la máxima

proporción de frutos clasificados como climatéricos. Los tres genotipos *ETHQV6.3* eran claramente distinguibles cuando *ETHQB3.5* era tanto homocigoto para SC como heterocigoto pero no en el caso del homocigoto para PS. El efecto de *ETHQB3.5* era evidente exclusivamente cuando *ETHQV6.3* era homocigoto para SC o heterocigoto. Todo parece indicar una interacción entre ambos QTLs, indicando además que la presencia de *ETHQB3.5* por sí sola no manifiesta siempre el fenotipo climatérico siendo necesaria la presencia de *ETHQV6.3* para observarse un fenotipo climatérico claro.

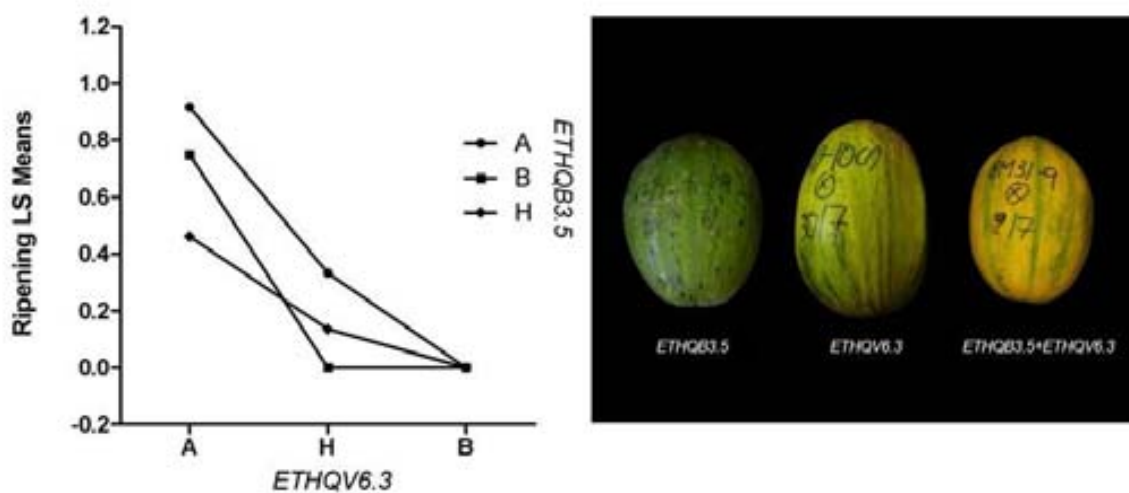


Figura 4.5. Interacción entre los alelos de dos marcadores significativamente ligados a ambos QTLs *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*. A= homocigótico SC, B= homocigótico PS y H = heterocigótica. En el eje Y se representa la media del tipo de maduración, siendo 1 climatérico y 0 no climatérico. A la derecha del gráfico se muestra una imagen de tres frutos característicos de tres tipos de líneas con distintas combinaciones de homocigosis SC: *ETHQB3.5*, únicamente en este locus, única (*ETHQB3.5*), únicamente en *ETHQV6.3* y en ambos (*ETHQB3.5 + ETHQV6.3*)

4.2.2. Construcción de un mapa genético de mediana resolución del locus *ETHQV6.3*

El análisis de los datos obtenidos en el estudio de la interacción entre ambos QTLs parece indicar que la presencia únicamente de *ETHQB3.5* no parece ser suficiente para producir frutos climatéricos, mientras que el efecto de *ETHQV6.3* es mayor siendo capaz de producir por sí solo frutos climatéricos, y por ello se decidió mapear *ETHQV6.3* para ser estudiado con más detenimiento. Además, en aquellos individuos que no poseían *ETHQB3.5*, no podíamos diferenciar entre individuos heterocigotos y homocigotos para PS en *ETHQV6.3* por lo que decidimos fijar *ETHQB3.5* y así poder distinguir las tres clases genotípicas en *ETHQV6.3* para facilitar su mapeo. Debido a

los problemas que comportaba el fenotipado mediante la medición de etileno, al existir frutos con distintos patrones de maduración, se decidió llevar a cabo un análisis de progenie con dos objetivos: (1) la confirmación de los fenotipos de los individuos recombinantes escogidos para el estudio y (2) generar un mayor número de individuos recombinantes para la construcción de un mapa genético del locus *ETHQV6.3*. Se seleccionaron 9 individuos 2008-F₂ recombinantes en el GL VI, entre los marcadores PSI_41-H06 y CI_23-F08, y con el LG III fijado para los alelos SC con el objetivo de maximizar el fenotipo climatérico. Los recombinantes se autofecundaron dando lugar a familias de 15 individuos que fueron genotipadas con más marcadores moleculares en el intervalo (PSI_41-H06, MU10920, AI_19-F11, CMBR002, AI_03-B03, FR14-P22, CMTCN41, CMN61_14, TJ14 y CI_23-F08) y fenotipadas (Apéndice A.3), siguiendo los criterios anteriormente expuestos, para la construcción de un mapa genético de media resolución (Fig 4.6). La maduración climatérica de los frutos segregaba en seis familias, lo que indicaba que el QTL era heterocigótico en la planta F₂, mientras que no lo hacía en las tres restantes siendo una de ellas no climatérica indicando que la planta F₂ era homocigótica para los alelos de PS. Para el mapeo se infirió el genotipo de *ETHQV6.3* basándose en el test de progenia, deduciéndose que se encontraba situado entre los marcadores CMBR002 y CMN61_14. (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Segregación del tipo de maduración en las familias F₃ originadas a partir de los recombinantes 2008-F₂ y mapeo por sustitución de *ETHQV6.3*. Las plantas recombinantes 2008-F₂ y el fenotipo de sus frutos (CL, climatérico, NCL no climatérico) están indicadas en las dos primeras columnas; seguido de los genotipos para los marcadores ensayados que se encuentran ordenados por su posición en el mapa genético. A=homocigótico para SC, B=homocigótico para PS y H=heterocigótico. La última columna indica el número de plantas con frutos CL y NCL de cada progenie. El intervalo donde se encuentra localizado *ETHQV6.3* se indica con asteriscos debajo de los marcadores correspondientes.

Recombinante 2008-F ₂	Fenotipo 2008-F ₂	PSI_41-H06	MU10920	AI_19-F11	CMBR 002	AI_03-B03	FR14-P22	CMTCN 41	CMN 61_14	TJ 14	CI_23-F08	Fenotipo Estudio Progenie	
												CL	NCL
8M38-3	NCL	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	5	11
8M40-2	NCL	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	6	8
8M38-4	NCL	A	A	A	A	B	B	B	B	H	H	0	16
8M71-11	NCL	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	6	8
8M71-6	NCL	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	9	4
8M39-3	CL	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	16	0
8M39-2	CL	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	12	0
8M71-19	NCL	H	H	H	H	H	H	H	A	A	H	4	10
8M71-13	NCL	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	4	8
					*	*	*	*	*				

Algunos individuos recombinantes de algunas familias F₃ también fueron genotipados con los mismos marcadores y fenotipados siguiendo los mismos criterios. Estos recombinantes F₃ nos permitieron reducir aún más el intervalo localizando *ETHQV6.3* entre los marcadores FR14-P22 y CMTCN41 (Tabla 4.3.)

Tabla 4.3. Mapeo de *ETHQV6.3* en algunos recombinantes 2008-F₂ del estudio de progenie. Los marcadores están representados en la parte superior, siendo A= homocigótico SC, B= homocigótico PS y H= heterocigoto. La posición del QTL se indica con asteriscos debajo de los marcadores correspondientes.

Familia	Planta	PSI_41-H06	MU10920	AI_19-F11	CMBR 002	AI_03-B03	FR14-P22	CMTCN 41	CMN 61_14	TJ 14	CI_23-F08	Fenotipo	
												CL	NCL
8M39-3	4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	CL	
8M39-3	10	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	CL	
8M39-2	8	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	CL	
8M38-3	12	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	CL	
8M38-3	2	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	N CL	
8M38-3	1	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	N CL	
8M71-13	8	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	N CL	
8M71-11	12	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	CL	
8M71-6	8	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	CL	
8M71-11	5	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	CL	
8M71-6	12	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	CL	
8M71-6	7	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	CL	
							*	*					

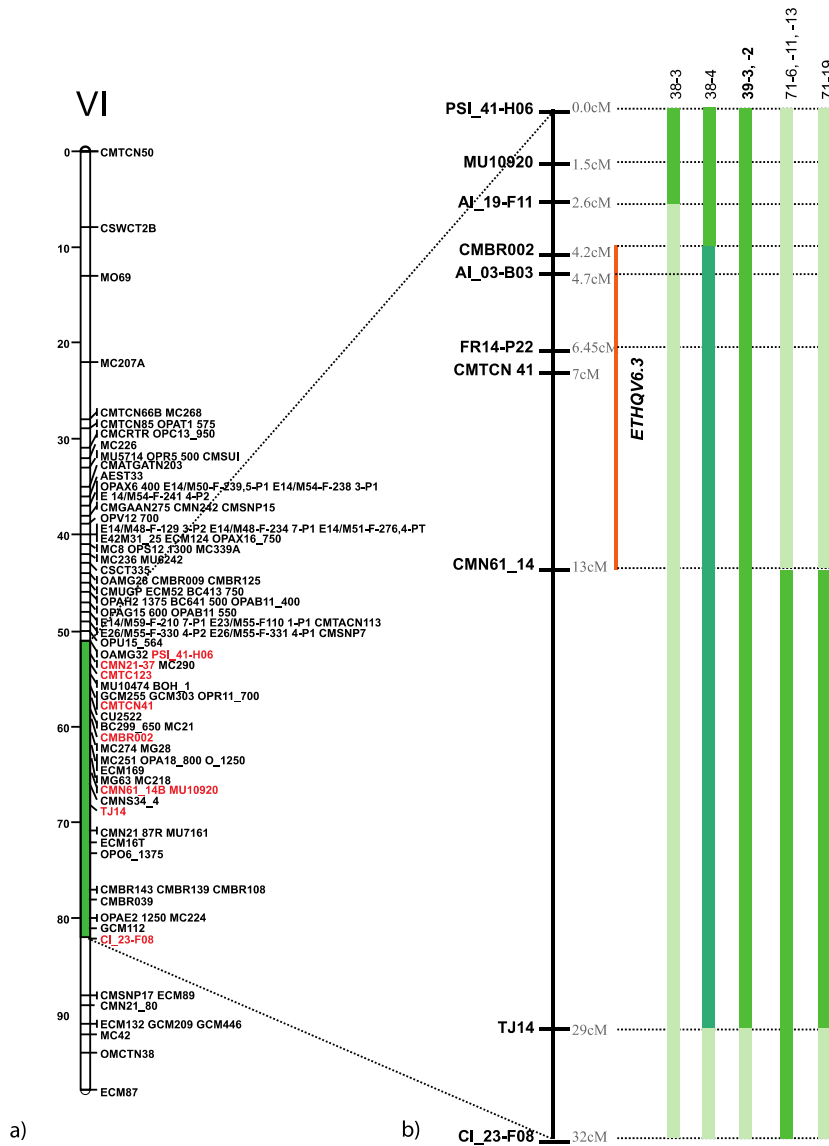


Figura 4.6. Mapa genético de media resolución del locus *ETHQV6.3*. (a) El grupo de ligamiento se muestra en números romanos en la parte superior (VI) del último mapa genético de melón publicado (Díaz et al. 2011), la introgresión del parental SC sobre el fondo genético de PS en la línea SC3-5-1 está representada mediante una barra verde sobre el mapa. (b) Mapa genético de la región *ETHQV6* usando la población 2008-F₂, las barras representan los individuos 2008-F₂ recombinantes informativos (excluyéndose 8M40-2) que dieron lugar al estudio de progenie, indicándose su nombre en la parte superior y el genotipo mediante un código de colores (homocigótico PS= verde oscuro, homocigótico SC= verde claro y H= gris). Los individuos climatéricos aparecen resaltados en negrita (39-3 y 39-2). Distancias expresadas en centimorgans (cM). La barra de color naranja indica la posición estimada del QTL *ETHQV6.3*.

4.2.3. Estudio de la interacción entre *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*

Para estudiar con más detalle la interacción entre los dos QTLs implicados en la maduración climatérica de los frutos en la línea SC3-5-1 se seleccionaron cuatro plantas de la población 2008-F₂ que representaban las cuatro posibles combinaciones genéticas de los dos QTLs: homocigótica PS para ambos loci (8M29), homocigótica SC para *ETHQB3.5* (8M35), homocigótica SC para *ETHQV6.3* (8M40) y 8M31 homocigótica SC para ambos loci (Figura 4.7). Estas plantas se autofecundaron manualmente generándose las cuatro líneas con genotipos fijados a ambos loci.

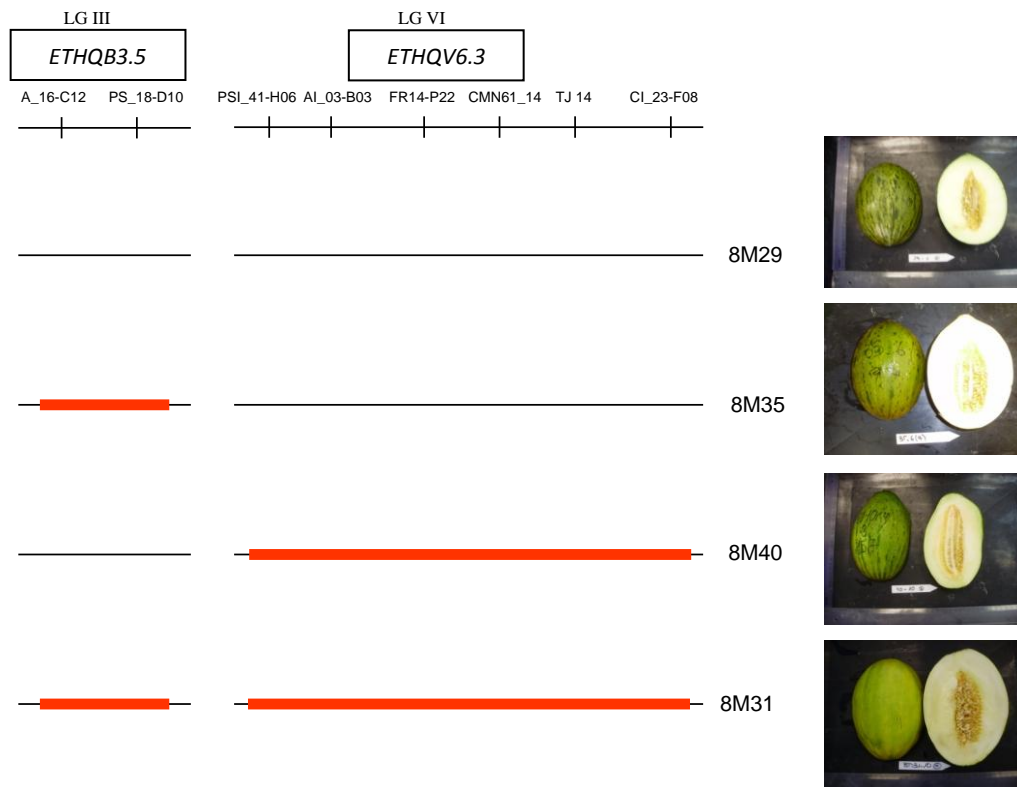


Figura 4.7. Líneas genotipos fijos. En la parte superior se muestran en números romanos los GL sobre los marcadores moleculares para las regiones donde se localizan *ETHQB3.5* y *ETHQB6.3*, las barras de color rojo representan las introgresiones de SC sobre el fondo genético de PS (líneas negras). Junto a cada línea de “genotipos fijos” aparece el nombre de la familia y una foto de un fruto en estadio maduro.

Se estudió la producción de etileno en las cuatro líneas siguiendo el mismo procedimiento explicado en el primer apartado de resultados. Los frutos fueron recolectados a distintos tiempos según el genotipo, antes de la producción del pico de etileno en los genotipos climatéricos, para poder observar la evolución en la síntesis de

etileno y la caracterización del pico en la producción en las distintas líneas. La recogida de los frutos, por triplicado, se realizó 35 días después de la polinización (DAP) para las líneas 8M29, 8M35 y 8M40, mientras que los frutos de la línea 8M31 fueron recogidos a 30 DAP por presentar esta línea un patrón de maduración distinto según había sido previamente observado. La producción de etileno en 8M29 (homocigótica PS en las dos introgresiones) fue muy baja, con un valor máximo de 0.2 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$, sin llegarse a detectar ningún pico. Las líneas 8M35 (*ETHQB3.5*) y 8M40 (*ETHQV6.3*) se comportaron como líneas climatéricas, alcanzando el pico máximo de producción a los 40 (2.45 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$) y a los 43 (2.007 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$) DAP respectivamente, mostrando que ambos loci son capaces de inducir la maduración climatérica de los frutos de forma independiente. En la línea 8M31 (*ETHQB3.5 + ETHQV6.3*) la producción de etileno alcanzó un valor máximo de 4.36 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ a los 35 DAP, similar al observado durante la caracterización de la línea SC3-5-1 (página 64). La cantidad de etileno producida en la línea 8M31 es aditiva comparada a la producida por las líneas que sólo portan un único QTL. Sin embargo, la aparición del pico de etileno se produce antes en el desarrollo del fruto, reduciéndose el tiempo necesario para la formación de frutos maduros indicando una interacción epistática entre QTLs que induce precocidad (Figura 4.8.).

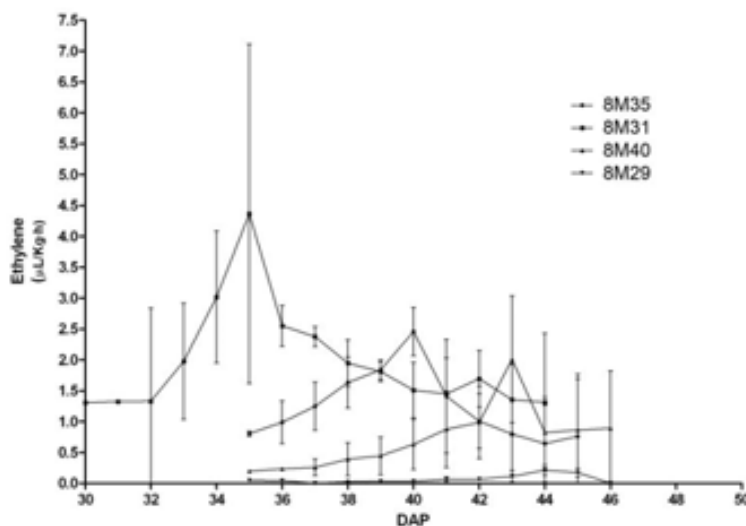


Figura 4.8. Producción de etileno ($\mu\text{L}/\text{Kg}\cdot\text{h}$) en DAP (días después de la polinización) en las líneas 8M29, 8M35, 8M40 y 8M31 (media \pm DS, n = 3).

Adicionalmente, durante las campañas de 2009 y 2010 estas líneas se caracterizaron en función de la dehiscencia de los frutos, el cambio de color en la piel externa del fruto y la producción de un aroma característico (Tabla 4.4.). La línea 8M29, genéticamente igual a PS, no presentó ninguna de las características climatéricas, sus frutos no fueron dehiscentes, no se observó cambio en el color de la piel y no produjo el aroma característico de las variedades de melón climatéricas. Por el contrario, los frutos de 8M31 (*ETHQB3.5* + *ETHQV6.3*) fueron dehiscentes tempranamente (35 DAP en 2009 y 36 DAP en 2010), cambiaban de forma brusca el color verde de la piel a amarillo y producían el característico aroma de los melones climatéricos de tipo cantalupo. La línea 8M40 (*ETHQV6.3*) también mostraba las características de los frutos climatéricos pero de una manera menos acusada, con la aparición de dehiscencia a los 44 DAP en 2009 y 47 DAP en 2010. Por último, los frutos de la línea 8M35 (*ETHQB3.5*) mostraban las similares características que la línea 8M40, pero más atenuadas: menor producción de aromas, cambio menos acusado del color y los frutos fueron dehiscentes sólo en uno de los años (2010) y a 45 DAP durante 2010. Sorprendentemente durante el año 2009 los frutos, a pesar de que formaban zona de abscisión, no llegaban a caer de la planta posiblemente debido al fuerte componente ambiental, algo que ya habíamos observado en la caracterización del climaterio a partir de la abscisión de los frutos en la población F₂. Estos resultados vuelven a confirmar el efecto de ambos QTLs de forma independiente sobre características asociadas a la maduración climatérica del fruto y demuestran que la interacción entre ambos acelera el proceso de maduración.

Tabla 4.4. Fenotipos asociados a la maduración para las líneas de genotipos fijos durante 2009 y 2010. Valores medios y desviaciones estándar para la dehiscencia de los frutos (DAP), cambios de color en la piel externa del fruto y producción de aromas durante 2009 y 2010. Se indican los genotipos para cada una de las líneas, siendo *ETHQB3.5*=alelos de SC en homocigosis en el GL III y *ETHQV6.3*=alelos de SC en homocigosis para GL VI.

Ensayo	Líneas	Genotipo	Dehiscencia		Cambio de color	Aromas
			Media	Desviación estándar		
2009	8M29	-	-	-	-	-
	8M35	<i>ETHQB3.5</i>	-	-	Si	Si
	8M40	<i>ETHQV6.3</i>	44.88	1.16	Si	Si
	8M31	<i>ETHQB3.5+ETHQV6.3</i>	35	1.619	Si	Si
2010	8M29	-	-	-	-	-
	8M35	<i>ETHQB3.5</i>	45.37	3.92	Si	Si
	8M40	<i>ETHQV6.3</i>	47.44	3.32	Si	Si
	8M31	<i>ETHQB3.5+ETHQV6.3</i>	36.3	2.31	Si	Si

4.3 DISCUSIÓN

En este estudio genético de la maduración del fruto en la línea SC3-5-1 se observó que el control genético de la misma es más complejo a lo observado previamente en la línea SC3-5 original (Moreno et al 2008), originada a partir del cruzamiento entre los genotipos no climatéricos PS y SC (Eduardo et al. 2005). En el presente trabajo hemos demostrado que hay dos loci que son los responsables de la maduración climática en la línea de introgresión SC3-5-1, *ETHQB3.5* previamente descrito en el GL III y un nuevo locus en el GL VI, *ETHQV6.3*. A pesar de que la línea 8M35, que posee únicamente *ETHQB3.5*, producía el pico de etileno y por lo tanto inducía la respuesta climática, en ocasiones dicho QTL no mostraba sus efectos sobre la dehiscencia de los frutos como observamos durante el fenotipado de la población 2008-F₂ o durante la propia caracterización de la línea 8M35 durante el verano de 2009. Posiblemente esta discordancia entre la producción de etileno y la no dehiscencia de los frutos se deba a los bajos niveles de la hormona que no serían suficientes para desencadenar completamente la respuesta climática, y por tanto la dehiscencia completa de los frutos, como si que ocurre en el caso de *ETHQV6.3*. Podemos concluir que la presencia de alelos de SC en ambos QTLs induce de forma independiente la maduración climática; pero la combinación de ambos produce una aceleración del proceso de maduración de los frutos con fuertes efectos pleiotrópicos asociados a la maduración climática observada con anterioridad en variedades *cantalupensis* (Pech et al. 2008): en la firmeza de la carne, cambios en el color de la piel y en la producción de aromas (Obando et al. 2008); mientras que no se observó ningún tipo de efecto en la acumulación de azúcares.

Perin et al. (2002c) estudiaron el control genético de la maduración climática del fruto en una colección de líneas recombinantes puras (RILs), derivada del mismo parental no climático "PI 161375" (SC) y la variedad climática "Vèdrantais". En dicho estudio observaron que dos genes mayores en los GL VIII y IX, *Al-3* y *Al-4* respectivamente, controlaban la producción de etileno y la senescencia de los frutos. Además cuatro QTLs fueron detectados con efectos menores en la producción de etileno. Sin embargo, ninguno de los alelos *Al-3* y *Al-4* o de los QTLs mapean en las mismas regiones que *ETHQB3.5* o *ETHQV6.3*. Posiblemente esto sea debido a las

diferencias en la composición alélica de las poblaciones segregantes utilizadas en ambos trabajos. “Vèdrantais” es una típica variedad climatérica con los genes necesarios para la maduración climatérica por lo que sus efectos pueden ser detectados en una población segregante con una variedad no climatérica como SC. Por otra parte, PS es una típica variedad no climatérica; por lo que el hecho de que los dos loci hayan sido detectados en una población segregante con SC parece indicar que el parental SC también posee alelos involucrados en la maduración climatérica. Los efectos de estos genes sólo pueden ser detectados en el fondo genético de una línea no climatérica como PS. Probablemente el modelo de maduración de SC no se corresponde con el de una típica línea no climatérica. *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3* deberían interactuar de forma distinta con los fondos genéticos de SC o PS; de manera que inducen la maduración climatérica únicamente en el fondo genético PS. Adicionalmente nuevos loci involucrados en la maduración de tipo climatérico hubieran sido detectados si el estudio hubiese sido realizado en el cruzamiento PS x “Vèdrantais”.

Aunque hasta la fecha no se habían detectado otros loci relacionados con la producción de etileno en el GL VI; si que han sido descritos anteriormente diferentes QTLs afectando características fenotípicas relacionadas con la maduración de tipo climatérica. Monforte et al. (2004) en un trabajo previo utilizando una colección de líneas doble haploides (Gonzalo et al. 2011) y una población F₂ originada del mismo cruzamiento PS x SC, encontraron un QTL en el GL VI involucrado en la precocidad en la maduración del fruto. Frutos con alelos de SC en ese QTL maduraban antes que el resto, siendo posiblemente un efecto pleiotrópico de *ETHQV6.3*. De la misma forma, Cuevas et al. 2009 también identificaron un QTL relacionado con la precocidad (*fm6.1*) en el GL VI, co-segregando con el marcador CMTCN41, en el cruzamiento entre una variedad china con maduración temprana “Q 3-2-2-2” y el cultivar tardío americano “Top Mark”.

Un mapa de genético de mediana resolución de la región ha sido construido localizando el locus *ETHQV6.3* entre los marcadores CMBR002 y CMN61_14; posteriormente la información de recombinantes originados en el estudio de progenie sitúa el QTL en una región de 0.5 cM entre los marcadores FR14-P22 y CMCTN41

(Tabla 4.3). Esta nueva posición deber ser confirmada mediante estudios de progenie, ya que se basa en datos de un solo fruto por individuo que pueden inducir a errores. Datos provenientes de otra población originada a partir de la NIL climatérica SC6-4, que comparte introgresión en la misma región del GL VI, confirman que probablemente *ETHQV6.3* se encuentra aguas arriba de CMCTN41, entre este marcador y PSI_41-H06 en el mapa genético representado en la figura 4.6.

La interacción epistática entre *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3* resulta en un adelantamiento de la síntesis de etileno, ocasionando que la maduración del fruto se complete más tempranamente. Así, esta interacción reduce en nueve días el tiempo necesario para formar un fruto maduro desde la polinización, en comparación con la línea que sólo contiene *ETHQV6.3*.

La formación de frutos climatéricos con una maduración más tardía, en los que se alargase la vida media de los mismos es objeto de interés para los mejoradores y tiene un elevado impacto económico al reducir las pérdidas causadas por enfermedades durante el proceso de post-cosecha. Por ello se pretende obtener variedades que conserven las características organolépticas deseadas de frutos climatéricos como la producción de aromas, el color de la carne o el contenido en azúcares. También podría tener interés, en el caso de otras especies, la obtención de frutos con una maduración temprana, pues permitiría obtener frutos maduros y listos para ser comercializados en menos tiempo, pudiéndose escalar la producción de los mismos obteniéndose un mayor número de cosechas. La formación de frutos maduros en menos tiempo puede deberse principalmente a dos causas: (1) una disminución del tiempo requerido para la transición entre el tejido vegetativo al reproductivo y (2) una aceleración del proceso de maduración del fruto (Doganlar et al. 2000; Tanksley 2004). En una colección de líneas de introgresión de *Solanum pennelli* se describió un QTL *hi2-1* con efectos en el índice de cosecha y en la producción de frutos maduros en un tiempo menor medido desde la plantación de la semilla hasta la aparición del primer fruto maduro. En este estudio se analizó el modelo de floración de la línea de introgresión que porta el QTL, sugiriéndose que *hi2-1* podría afectar al modo de floración afectando a la arquitectura de la planta y la tasa de floración. Por el contrario

en nuestro trabajo la formación de frutos maduros en un tiempo menor se debe a una aceleración de la maduración de los frutos debido a algún mecanismo de control regulado por el etileno.

Cómo perciben los frutos el etileno en la línea SC3-5-1, la forma en la que se dispara el proceso de maduración y cómo está regulado ese complejo proceso dista mucho de conocerse. La identificación de los genes responsables de ambos QTLs (*ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*) ayudará a entender la interacción entre ambos y el mecanismo de maduración del fruto en las líneas no climatéricas en melón. Para el clonaje posicional y la posterior identificación de los loci es necesaria la obtención de una nueva población segregante con un mayor número de individuos recombinantes y el uso de un mayor número de marcadores moleculares.

5. CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO DE ALTA RESOLUCIÓN DEL LOCUS *ETHQV6.3* EN UNA POBLACIÓN F2

5.1. INTRODUCCIÓN

A pesar del elevado número de QTL descritos en la literatura, muy pocos de ellos han sido clonados con éxito debido a la complejidad del proceso. El clonaje de la mayoría de los QTLs clonados con éxito en plantas se ha realizado mediante la estrategia del clonaje posicional (Rommens et al. 1989; Tanksley et al. 1995), que consiste en aislar un gen a partir de sus posición en el genoma. En una primera fase, también conocida como mapeo primario, el QTL se posiciona en un intervalo cromosómico con una longitud media de 10-30 cM, que suele incluir centenares de genes. La resolución de la posición se consigue generando recombinantes en la región del QTL, generalmente en varias etapas, y determinando el genotipo del QTL en cada uno de los recombinantes. Dado que se trata de caracteres cuantitativos, es necesario un fenotipado muy cuidadoso, con muchas réplicas por planta o verificación por test de progenie, para asegurarse la correcta posición del QTL en los recombinantes. El clonaje posicional incluye una serie de etapas que nos permiten, a partir del uso combinado de poblaciones de gran tamaño (1,000-3,000 individuos) y un elevado número de marcadores moleculares, localizar el gen o QTL en un intervalo genético pequeño ("aterriaje cromosómico", o mapeo fino del QTL) (Tanksley et al. 1995) que permite anclar el QTL a posiciones físicas del genoma, tradicionalmente mediante "contigs" de clones de BACs ("*chromosome walking*") o más recientemente usando secuencias genómicas de referencia. El objetivo de esta aproximación es identificar un número pequeño (idealmente sólo uno) de genes candidatos. Normalmente, el proceso termina con la validación de los genes candidatos para identificar cuál es el causante del fenotipo observado mediante transformación genética o mediante el uso de recombinantes que flanqueen inequívocamente un único gen

El éxito de una estrategia de clonación posicional radica en la disponibilidad de un número suficiente de individuos recombinantes que permitan el mapeo de alta resolución. Para generar dichos recombinantes, el número de individuos que es necesario muestrear depende de la frecuencia de recombinación en la región de interés,

que puede variar a lo largo de los cromosomas y es diferente para cada especie (Dinka et al. 2007). Así, por ejemplo, los tamaños poblacionales analizados puede variar desde 1,160 gametos que fueron necesarios para localizar el gen *Bph15* en una región de 17 kb en arroz (Liu et al. 2005) a los 7,000 individuos analizados para posicionar el locus *Brix-9-2-5* involucrado en la acumulación de azúcares en el fruto de tomate en una región de 484 pb (Fridman et al. 2000). Por otra parte, en cualquier proyecto de clonaje posicional es particularmente importante la elección del tipo de población. Hasta la fecha la mayoría de QTLs han sido clonados utilizando poblaciones originadas a partir de NILs (Salvi and Tuberosa 2005), ya que al “mendelizar” el QTL (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000), se reduce la complejidad genética y es posible inferir el genotipo del QTL a partir de fenotipos obtenidos de diseños experimentales precisos de manera que, mediante el desarrollo de subNILs con introgresiones solapantes sobre la región que contiene el QTL, éste puede diseccionarse a través del mapeo por sustitución (Paterson et al. 1990). Una estrategia utilizada en un gran número de estudios de clonaje posicional ha sido la generación de poblaciones F₂ originadas a partir de una NIL retrocruzada con uno de los parentales

El desarrollo de marcadores moleculares para el mapeo fino de QTLs es relativamente sencillo cuando se dispone de la secuencia genómica pudiéndose desarrollar un gran número de marcadores moleculares y conocer su posición, o permitiendo la identificación de los genes que se encuentran en la región donde se encuentra el QTL. Por el contrario cuando no se dispone de esta herramienta este proceso puede ser laborioso debido al elevado número de marcadores que han de ser generados y posteriormente mapeados en la región donde se encuentra el QTL que se quiere clonar. Especialmente exitoso ha sido el uso de marcadores AFLP combinado con la estrategia de análisis de segregantes agrupados (“*Bulk Segregant Analysis, BSA*”, Michelmore et al. 1991) para saturar regiones genómicas de interés como paso previo en el clonaje posicional de QTLs (Kikuchi et al. 2003; Matsumura et al. 2008; Milligan et al. 1998; Simons et al. 1997). La disponibilidad creciente de las secuencias de genomas y el desarrollo de plataformas de genotipado de alto rendimiento, permiten (1) contar con un elevado número de marcadores moleculares y (2) genotipar un gran número de

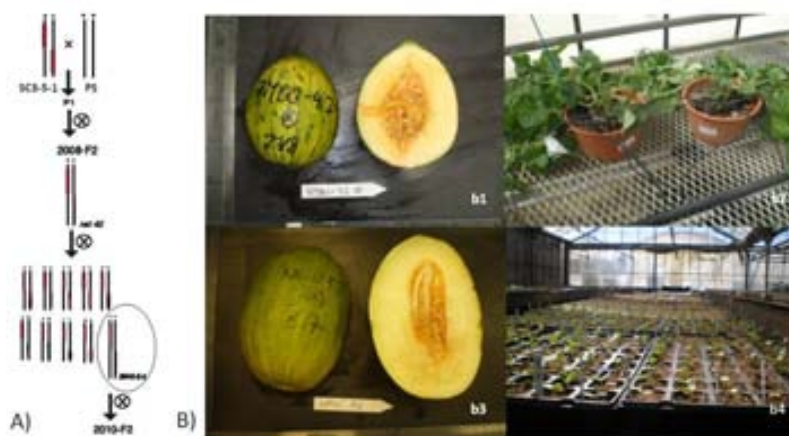
individuos reduciendo el tiempo y costes necesarios para el clonaje del QTL (Borevitz 2003).

A pesar de los grandes avances realizados y el desarrollo de nuevas herramientas genéticas y genómicas el clonaje posicional de QTLs continúa siendo una ardua tarea y es por ello que hasta la fecha muy pocos QTLs han sido clonados en plantas. En el caso concreto del melón se han clonado un grupo reducido de genes con herencia mendeliana simple (Boualem et al. 2008; Brotman et al. 2013; Joobeur et al. 2004; Martin et al. 2009; Nieto et al. 2006; Pauquet et al. 2004), pero nunca un QTL. En el presente capítulo presentamos la construcción de un mapa genético de alta resolución del locus *ETHQV6.3*, a partir del mapa de mediana resolución obtenido utilizando la población 2008-F₂ presentado en el capítulo anterior, como paso previo a su clonaje.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Desarrollo de una nueva población para el mapeo fino del locus *ETHQV6.3*

Para el mapeo fino del locus *ETHQV6.3* era necesaria una población que permitiera detectar un mayor número de individuos recombinantes en la región del QTL (GL VI) pero que poseyera el otro QTL (*ETHQB3.5*) en homocigosis para los alelos de SC con objeto de maximizar el fenotipo climatérico en la nueva población facilitando el fenotipado posterior. Como se había observado tanto durante la caracterización de la línea 8M31(*ETHQB3.5* + *ETHQV6.3*) como en el fenotipado de la población 2008-F₂ aquellos frutos que poseían ambos QTLs mostraban siempre un fenotipo climatérico claro, produciendo frutos dehiscentes alrededor de 35 DAP, aromáticos y cuya piel externa viraba de verde a amarillo; mientras que aquellos individuos que sólo poseían *ETHQV6.3* producían frutos climatéricos más tardíos que eran dehiscentes a 45 DAP y cuya piel externa cambiaba de color de una forma menos acusada. Es por eso que se generó una nueva población a partir de un planta (8M40-6-5) que portaban los alelos de SC en homocigosis en el GL III (*ETHQB3.5*) y en heterocigosis para el GL VI (*ETHQV6.3*) que se reprodujo vegetativamente mediante esquejes para asegurar un elevado número de semillas recombinantes tras autofecundación. La nueva población de 967 plantas fue denominada 2010-F₂ (Figura 5.1).



5.2.2. Saturación de la región en la que se encuentra el locus *ETHQV6.3* mediante marcadores moleculares

5.2.2.1. Desarrollo de marcadores de tipo AFLP

Para el desarrollo de marcadores AFLP ligados a *ETHQV6.3*, en lugar de utilizar la línea SC3-5-1 se utilizó la NIL SC6-4, que contenía una única introgresión en el GL VI que incluía la región en la que había sido mapeado el QTL (Apéndice figura A.6). Al ser PS y SC6-4 líneas isogénicas los únicos polimorfismos detectados deben mapear en las introgresiones de SC en el fondo genético de PS. En el caso de haber utilizado la línea SC3-5-1 algunos de los polimorfismos con PS detectados pertenecerían al GL III. De 1024 combinaciones de cebadores AFLPs se identificaron 25 combinaciones que generaban bandas polimórficas entre la línea SC6-4 y el parental PS. Las combinaciones polimórficas fueron mapeadas con las 16 plantas del “bin set” de melón (Fernandez-Silva, et al. 2008), para posteriormente seleccionar exclusivamente aquellos polimorfismos que se encontraban en el mismo “bin” en el que se encontraba el locus *ETHQV6.3* (Figura 5.2).

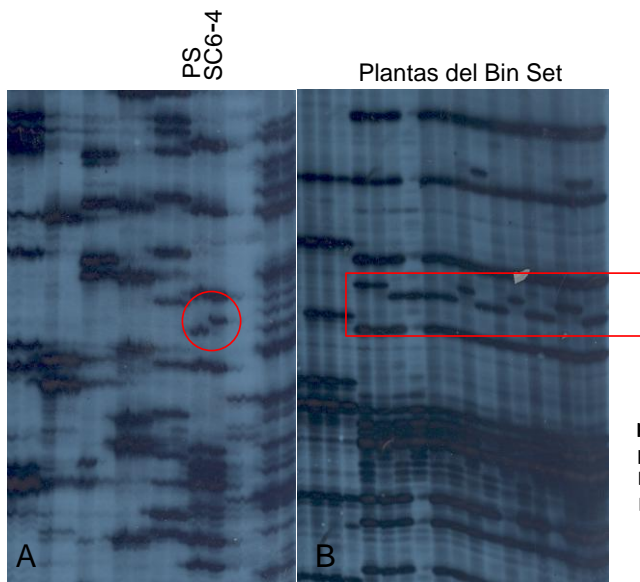


Figura 5.2. Gel de acrilamida con marcaje radioactivo para la combinación AFLP Pst13-AAG. A) En la línea parental PS y la NIL SC6-4, diversas combinaciones AFLP y B) en las 16 plantas del “Bin Set” de melón con Pst13-AAG. El polimorfismo AFLP se marca con círculo y rectángulo rojos, respectivamente.

Ocho AFLPs polimórficos de los 25 detectados mapeaban en el mismo bin en el que se encontraba *ETHQV6.3* en el mapa de Fernandez-Silva et al. (2008) y fueron seleccionados para ser clonados y secuenciados. Las combinaciones de cebadores Pst12-ACT y Pst13-AAG presentaban fragmentos de ADN polimórficos entre PS y la

línea SC6-4 cada una de ellas de 100 y 143 pb respectivamente. En las combinaciones Pst12-AGC y Pst13-ACG se detectó una banda en el parental PS que no se detectó en la línea SC6-4, con tamaños de 395 y 131 pb, respectivamente (Fig. 5.3).

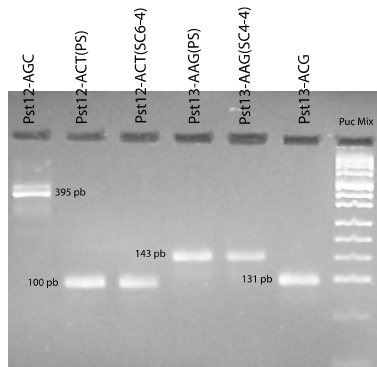


Figura 5.3. Fragmentos de DNA extraídos de las bandas AFLP obtenidas con las combinaciones de oligos Pst12-AGC, Pst12-ACT, Pst13-AAG y Pst13-ACG que fueron polimórficas entre las muestras PS y SC6-4, separadas en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio.

Para asegurarnos de que las bandas aisladas a partir del gel de acrilamida se correspondían con los polimorfismos detectados, éstas se aislaron a partir de geles de agarosa al 2%. Finalmente, seis fragmentos que correspondían a los cuatro AFLPs polimórficos de la figura 5.3 fueron clonados y secuenciados, para posteriormente comprobar que la secuencia contenía las combinaciones de cebadores AFLP que nos permitieron detectar el polimorfismo. Por el contrario, los otros cuatro AFLPs polimórficos detectados no pudieron ser clonados. Una vez secuenciados (Apéndice A.7) y comprobados los polimorfismos, éstos se mapearon *in silico* haciendo uso del primer borrador de la secuencia del genoma del melón. Los AFLPs Pst12-ACT y Pst13-AAG correspondían a dos deleciones de dos pares de bases en la línea SC6-4 respecto a PS. En la tabla 5.1 aparecen recogidas las combinaciones de cebadores AFLP polimórficas, los tamaños de las bandas y los “scaffolds” en los que fueron mapeadas. El AFLP Pst13-ACG mapeaba en el scaffold 15 (GL III), probablemente la banda clonada no correspondía al polimorfismo detectado. El resto de AFLPs fueron mapeados *in silico* dentro de la introgresión de SC en la línea SC3-5-1 en el GL VI, en los “scaffolds” 6, 23 y 62 que se corresponden con el “bin” donde habían sido previamente mapeados mediante el uso de los 16 individuos del “bin set” de melón.

Tabla 5.1. Bandas AFLPs secuenciadas y mapeadas in silico en la secuencia del genoma. Se indican las combinaciones AFLP, el tamaño del polimorfismo, el "scaffold"(Sca) de la versión 3.5 del genoma de melón y grupo de ligamiento (GL) donde fueron mapeados. * La posición en el genoma de este scaffold se determinó posteriormente a la publicación del genoma de melón.

Combinación AFLP	Tamaño(pb)	Posición	GL
Pst12-AGC	395	Sca0006	VI
Pst13-ACG	131	Sca0015	III
Pst12-ACT	98-100	Sca0062*	VI
Pst13-AAG	141-143	Sca0023	VI

5.2.2.2. Diseño de marcadores directamente a partir de la secuencia del genoma del melón.

Al disponer de la secuencia del genoma de melón durante la tesis doctoral decidimos desarrollar marcadores de tipo SSR en la región del locus *ETHQV6.3*; para ellos buscamos microsatélites mediante el programa "Tandem Repeat Finder" (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) (G. Benson 1999) y diseñamos cebadores flanqueando las repeticiones utilizando el programa "Primer3" (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen S 2000). De esta forma se desarrollaron los siguientes marcadores a partir del scaffold 28: 28.37, 28.1723, 28.3215 y 28.3377.

5.2.3. Construcción de un mapa genético de alta resolución del locus *ETHQV6.3*

Para el mapeo fino del locus *ETHQV6.3* se llevó a cabo un cribado en 967 plántulas de la población 2010-F₂ utilizando los marcadores PSI_41-H06 y CMTCN41, flanqueando la región en la que se encontraba el QTL. Pese a que *ETHQV6.3*, tras el primer estudio de progenie realizado a partir de los recombinantes 2008-F₂, había sido previamente mapeado entre los marcadores FR14-P22 y CMTCN41 se decidió utilizar PSI_41-H06 en el cribado de la población 2010-F₂, puesto que era un marcador de tipo SSRs con el que podíamos automatizar el proceso al poder genotipar ambos marcadores en un mismo gel del secuenciador Li-COR, mientras que FR14-P22, al ser un marcador tipo CAPS, precisaba de una etapa de digestión con enzima de restricción y separación en geles de agarosa. Además, se prefirió ampliar el intervalo para confirmar la posición del QTL al aplicar el fenotipado basado en los DAP ("Days after pollination" o días después de la polinización) necesarios para la aparición de la dehiscencia en los frutos, como complemento al resto de identificadores del climaterio

(cambio de color de la piel externa y aroma). Se seleccionaron 44 plantas con recombinaciones informativas, es decir aquellas en las que estaban presentes los alelos de SC, pues eran las únicas que presentaban el fenotipo climatérico y nos permitían mapear el locus. Dado que la maduración climatérica se observaba con claridad en las plantas homocigóticas SC para *ETHQV6.3*, se seleccionaron los recombinantes que presentaban una parte de la introgresión en homocigosis para SC ya que eran directamente informativos y nos permitían observar el fenotipo climaterio en esa generación, mientras que el uso de los recombinantes que poseían una parte de la introgresión en homocigosis para PS nos obligaría a llevar a cabo un estudio de progenie para el mapeo del carácter al no mostrar éstos el fenotipo climatérico tan claramente. Las 44 plantas recombinantes fueron genotipadas con un mayor número de marcadores del intervalo, entre los que se encontraban alguno de los nuevos marcadores generados en el apartado anterior (PSI_41-H06, CMCT123, CMN21-37, MU10920, CI_56-B01, AI_19-F11, AI_03-B03, 28.37, FR14-P22 y CMCTN41). Para el fenotipado de los frutos además del cambio de color de la piel externa y la producción de aromas se tomaron medidas de la dehiscencia en DAP en lugar de la clasificación entre dehiscentes o no utilizadas en la población 2008-F₂. De esta forma se esperaba discernir entre individuos que poseían el QTL *ETHB3.5* (dehiscentes a 45.37 DAP según lo observado en el experimento de genotipos fijos) y frutos con los dos QTLs *ETHQB3.5* + *ETHQV6.3* (dehiscentes a 35.6 DAP). Se observó una segregación de la dehiscencia de los frutos entre los 44 individuos recombinantes, algunos con una dehiscencia similar a la observada en la línea SC3-5-1 y otros individuos no dehiscentes (como el parental PS). La media de los valores fue de 44.2 DAP en un rango de valores de 31 a 67 días con una distribución que se ajustaba a una normal (Shapiro-Wilk, $p=0,27$) (Fig 5.4).

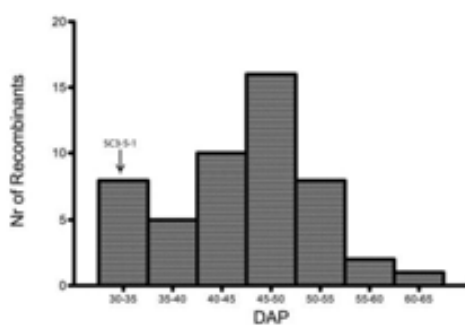
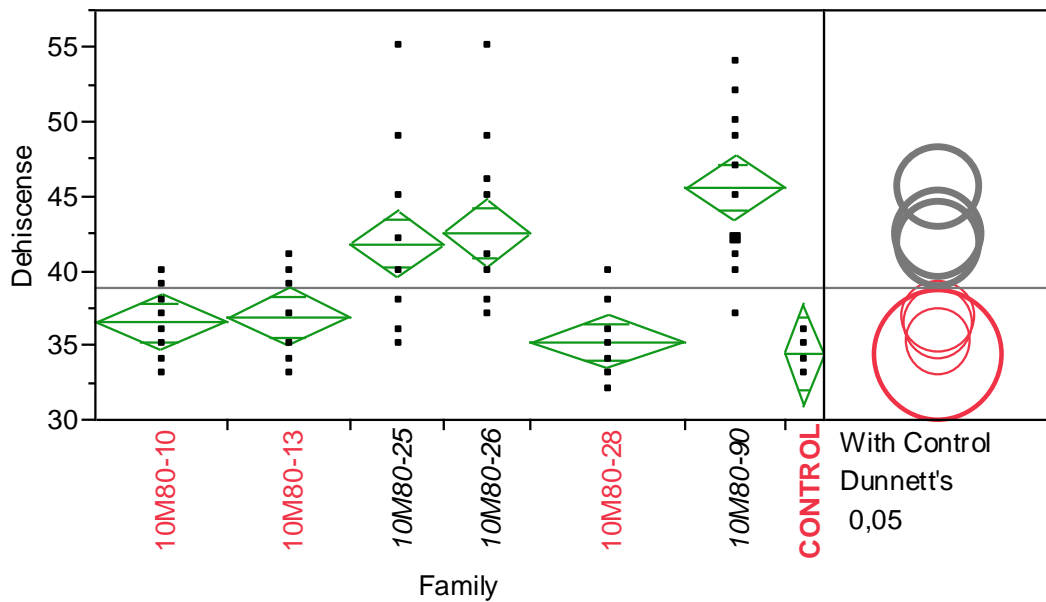


Figura 5.4. Histograma de distribución de frecuencias para la dehiscencia de los frutos (DAP) en los recombinantes de la población 2010-F₂. La línea parental SC3-5-1 está representada con una flecha (media=34.4, DE=1.7), el otro parental PS no está representado porque no es dehiscente.

Se llevó a cabo un análisis de QTLs para el GL VI en la población 2010-F₂ mediante mapeo por intervalos compuestos lo que nos permitió confirmar la presencia de *ETHQV6.3* en esta población. Dentro del intervalo el máximo LOD score correspondía al marcador 28.37 (15.2), que explicaba el 48 % de la variación de la dehiscencia del fruto observada. Tras el mapeo del locus *ETHQV6.3* en 43 recombinantes 2010-F₂ (se excluyó un doble recombinante para la construcción del mapa genético), se localizó el QTL entre los marcadores AI_03-B03 y CMCTN41 (Fig.5.6.B). Adicionalmente, mediante una ANOVA se analizó la asociación de los marcadores con el fenotipo climatérico; siendo el marcador 28.1723 el que mostraba una mayor asociación significativa con el climaterio ($p < 0.0001$; $R^2 = 65.26$).

Para confirmar la posición del locus *ETHQV6.3* se realizó un estudio de progenie (Apéndice A.8), generando 6 familias F₃ de 20 individuos a partir de sus respectivas plantas recombinantes 2010-F₂. El genotipado y fenotipado de estas seis familias nos confirmaría el fenotipo inferido en la planta 2010-F₂ original y verificaría la posición detectada en dicha población. Estas plantas de progenie fueron genotipadas (PSI_41-H06, AI_03-B03, 28.37, AP2/ERF, 28.1723, FR14-P22, 28.3215, 28.3377 y CMCTN41) y fenotipadas, analizándose las diferencias en la dehiscencia de los frutos entre las familias y la línea control SC3-5-1. Las familias 10M80-25, 10M80-26 y 10M80-90 mostraron diferencias estadísticamente significativas con la línea climatérica control SC3-5-1 (Figura 5.5); indicando que contenían *ETHQV6.3* en heterocigosis. Se confirmó el fenotipo inferido en las plantas progenitoras de la población 2010-F₂ a excepción de la planta progenitora de la familia 10M80-26 que había sido catalogada como climatérica, mientras que en el test de progenie se catalogó como no climatérica.



Missing Rows

2

Figura 5.5. Test de Dunnett's para analizar las diferencias entre las medias de la dehiscencia (DAP) de las familias del estudio de progenie de plantas de la población 2010-F₂ y la línea climatérica SC3-5-1 como control. Las familias que tras el test se comportaban como el control climático se representan en letras rojas mientras que las familias no climatéricas se muestran en cursiva y negrita.

A partir de los resultados del estudio de progenie se infirió el genotipo de los recombinantes originales 2010-F₂ (*rec73*, *rec59*, *rec103*, *rec71*, *rec99* y *rec100*) lo que nos permitió mapear el locus *ETHQV6.3*, entre los marcadores AI_03-B03 y FR14-P22 (Tabla 5.2). Finalmente, a partir de los datos del estudio de progenie reflejado en la tabla 5.2 se construyó un mapa genético de alta resolución del locus *ETHQV6.3* (Figura 5.6.C). Adicionalmente, el análisis de los nuevos individuos recombinantes F₃ originados durante el estudio de progenie nos permitieron reducir aún más el intervalo (Tabla 5.3); mapeando *ETHQV6.3* entre los marcadores AP2/ERF y FR14-P22; ambos en el scaffold00028 del genoma de melón, delimitando una región de 2.75 Mbp con un total de 73 genes anotados (Apéndice A.10).

Tabla 5.2. Mapeo fino de ETHQV6.3 en las plantas recombinantes 2010-F₂ a partir del estudio de su progenie considerando el locus como un marcador más, cuyo genotipo es inferido a partir del estudio de progenie después del test de Dunnet (Figura 5.5). En la primera columna se muestran las familias y el individuo recombinante 2010-F₂ (rec) a partir del que se originaron. La dehiscencia (DAP) del recombinante 2010-F₂ y el fenotipado de la progenie que resulta del test de Dunnet's, siendo CL= climatérico y N CL= no climatérico, se presentan en las siguientes columnas. Los marcadores están representados en la parte superior, , siendo A=homocigótico SC, y H=heterocigoto. La posición del QTL se encuentra señalada en la parte inferior de la tabla mediante asteriscos

Recombinantes F ₂	PSI_41-H06	AI_03-B03	28.37	AP2/ERF	28.1723	FR14-P22	28.3215	28.3377	CMCTN41	Dehiscencia (DAP)	Fenotipado Progenie	ETHQV6.3
10M80-13 (rec 73)	A	A	A	A	A	A	A	A	H	33	CL	A
10M80-10 (rec 59)	A	A	A	A	A	A	A	H	H	32	CL	A
10M80-28 (rec 103)	A	A	A	A	A	A	H	H	H	33	CL	A
10M80-90 (rec 71)	A	A	H	H	H	H	H	H	H	51	N CL	H
10M80-25 (rec 99)	H	H	H	H	H	H	H	H	A	40	N CL	H
10M80-26 (rec 100)	H	H	H	H	H	A	A	A	A	37	N CL	H
		*	*	*	*	*						

Tabla 5.3. Mapeo de ETHQV6.3 en recombinantes de las progenies 2010-F₂. Los marcadores están representados en la parte superior, siendo A=homocigótico SC, B=homocigótico PS y H= heterocigoto. La posición del QTL se indica con asteriscos debajo de los marcadores correspondientes.

FAMILIAS	RECOMBINANTES	PSI_41-H06	AI_03-B03	28,371	AP2/ERF	28,1723	FR14-P22	28,3215	28,3377	CMCTN41	Dehiscencia (DAP)	Fenotipo
10M80-28	18	A	A	A	A	A	A	A	B	B	36	CL
10M80-28	1	A	A	A	A	A	A	H	H	H	36	CL
10M80-90	5	A	A	A	A	A	A	H	H	H	37	CL
10M80-90	4	A	A	A	A	H	H	H	H	H	49	N CL
10M80-90	7	A	A	A	H	H	H	H	H	H	50	NCL
10M80-90	18	A	A	H	H	H	H	H	H	H	52	NCL
10M80-25	16	A	H	H	H	H	H	H	H	A	42	NCL
10M80-25	6	H	H	H	H	H	H	H	H	A	42	N CL
10M80-25	9	B	B	B	B	B	B	B	A	A	42	N CL
10M80-26	7	H	H	H	H	H	A	A	A	A	49	N CL
10M80-25	17	H	A	A	A	A	A	A	A	A	40	CL
				*	*	*						

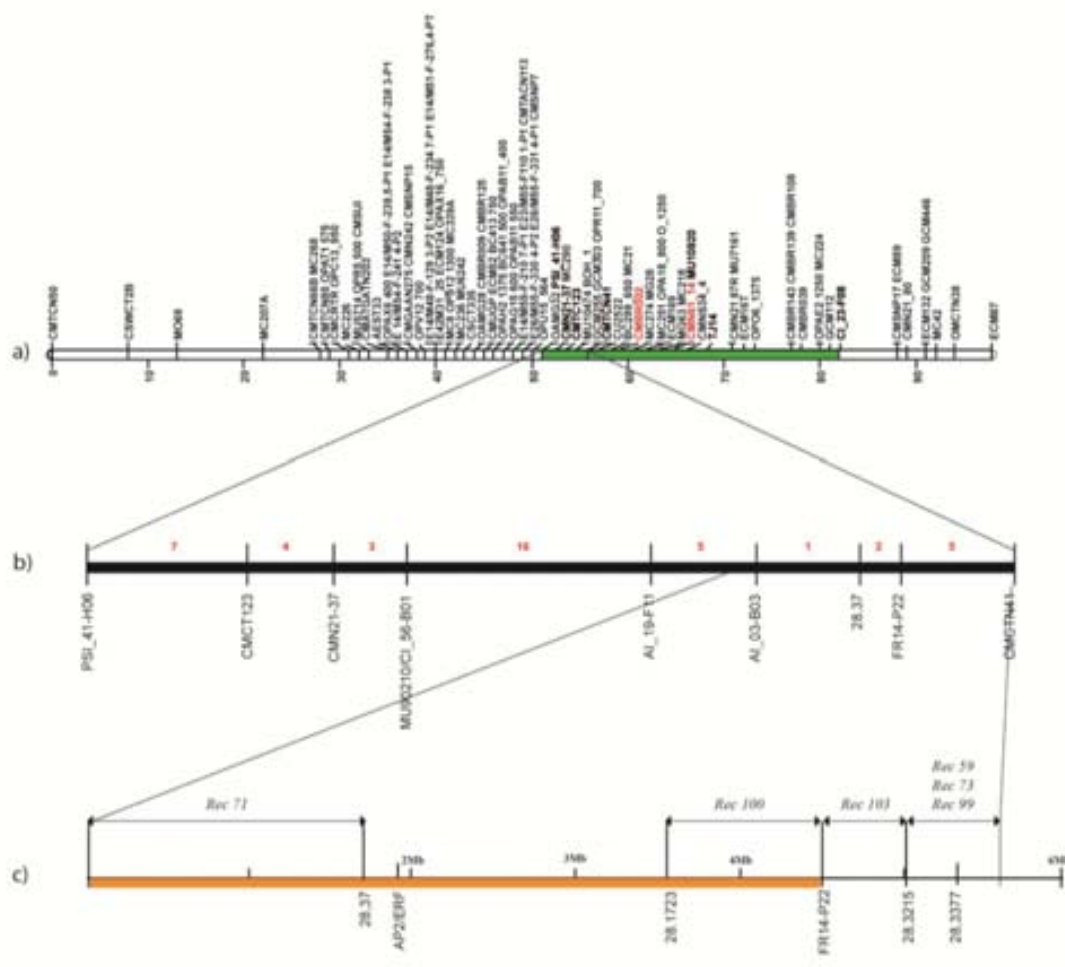


Figura 5.6. Mapa genético de alta resolución del locus *ETHQV6.3*. (a) Grupo de ligamiento VI del último mapa genético de melón publicado (Díaz et al., 2011). La introgresión de SC en el fondo genético PS en la línea climática SC3-5-1 está representada mediante una barra verde en el mapa. (b) Mapa genético de alta resolución del locus *ETHQV6.3* en la población 2010-F₂. El número de recombinantes entre marcadores está representado en números rojos. (c) Mapa físico de la región en Mb. Los recombinantes 2010-F₂ seleccionados para el estudio de progenie están indicados en cursiva (*Rec*) y las líneas verticales representan puntos de recombinación. El intervalo de la posición en la que se encuentra el QTL tras el estudio de progenie está indicado mediante una barra amarilla.

5.3. DISCUSIÓN

Es importante destacar que uno de los primeros objetivos de este capítulo era la generación de marcadores moleculares asociados al locus *ETHQV6.3* y el desarrollo de una nueva población con un mayor número de individuos recombinantes para el mapeo fino de *ETHQV6.3*. En un primer momento se generaron y mapearon marcadores de tipo AFLP en la región pero la disponibilidad de un primer borrador de la secuencia del genoma nos permitió generar un elevado número de marcadores directamente a partir de la secuencia genómica, siendo el número de recombinantes el paso limitante en la construcción de un mapa genético de alta resolución.

Durante el fenotipado del climaterio en la nueva población (2010-F₂) además de la producción de aromas o el cambio de color en la piel externa de los frutos se refinó el concepto de dehiscencia de los frutos. Éstos se mantuvieron en planta hasta que se desprendían de la misma midiendo su dehiscencia en DAP, siendo esta una medida cuantitativa y por tanto más precisa que el hecho de que formaran o no una zona de abscisión.

El uso de una nueva población 2010-F₂ de 967 individuos y la aplicación de criterios fenotípicos más precisos para caracterizar el climaterio (dehiscencia del fruto medida en DAP frente a la formación de una zona de abscisión, la producción de aromas y el cambio de color de la piel externa) ha permitido confirmar la presencia de *ETHQV6.3* y el mapeo fino del locus. Finalmente, se construyó un mapa de alta resolución de la región localizando *ETHQV6.3* entre los marcadores AI_03-B03 y FR14-P22, confirmándose la posición del QTL observada en la población 2008-F₂ (Figura 4.6). Sin embargo, vemos una discordancia entre lo observado en la primera población F₂ (2008-F₂) y la segunda (2010-F₂). Así, mientras que en la primera *ETHQV6.3* se localizó entre los marcadores FR14-P22 y CMTCN41, en la segunda se situó fuera de este intervalo entre los marcadores AI_03-B03 y FR14-P22 (Figura 5.6). Posiblemente el criterio de clasificación entre climatérico y no climatérico, que no permitía diferenciar claramente entre los efectos de *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*, produjo algún error en la inferencia de la composición alélica para *ETHQV6.3* en algunas plantas de la población 2008-F₂. El uso de una población mayor (2010-F₂), con un mayor número de recombinantes, el desarrollo de nuevos marcadores moleculares en la región del locus

ETHQV6.3 y la clasificación del climaterio basándonos, además de en los criterios anteriores de producción de aromas y cambio de color, en los DAPs nos permitió refinar la posición del QTL y localizarlo aguas arriba de FR14-P22. La relación distancia física/genética calculada en la población 2010-F₂ (0.35 Mpb/1 cM) es aproximadamente el doble a la media obtenida para la totalidad del genoma (0.18 Mpb/1 cM). Además, el bajo número de recombinantes observados entre los marcadores AI_03-B03 y FR14-P22 sugiere igualmente una supresión de la recombinación en esta región. El incremento en la relación distancia genética/física y por tanto el bajo número de recombinaciones observadas podría deberse a la localización centromérica del intervalo, tal como se observa en la región en la que se encuentra dentro del GL VI (Garcia-Mas et al. 2012). A pesar de ello, el uso de nuevos recombinantes obtenidos a partir del estudio de progenie nos permitió reducir aún más el intervalo localizando el locus *ETHQV6.3* entre los marcadores AP2/ERF28.1723 y FR14-P22; ambos en el "scaffold0028", en una región de 2.75 Mbp que contiene un total de 73 genes anotados.

Debido al elevado número de genes contenidos en el intervalo y a la ausencia de más individuos recombinantes, una estrategia posible a seguir sería la reducción del número de genes candidatos al carácter mediante el uso de otras herramientas genómicas, como pueden ser datos de expresión génica. En el siguiente capítulo de la tesis hacemos uso de datos de expresión génica a partir de la línea SC3-5-1 para la búsqueda de posibles genes candidatos a *ETHQV6.3*.

6. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE LA LINEA SC3-5-1

6.1. INTRODUCCION

El estudio transcriptómico del desarrollo y la maduración de los frutos en tomate mediante uso de micromatrices de DNA ha ayudado a la comprensión de las interacciones entre los distintos factores que regulan la maduración climatérica (Alba et al. 2004). Un ejemplo sería el estudio transcriptómico del mutante insensible a etileno NR (“*never ripe*”) en el que se confirmó como el etileno regulaba, a través de este receptor, la expresión de genes que afectan a distintos procesos relacionados con la maduración de los frutos como la acumulación de carotenoides, la degradación de la pared celular, la producción de aroma o la propia síntesis del etileno (Alba et al. 2005). Otros estudios transcriptómicos han permitido caracterizar nuevos componentes reguladores de la maduración climatérica en tomate, como el regulador negativo de la síntesis y percepción del etileno APETALA2 (AP2) (Karlova et al. 2011). Recientemente un exhaustivo estudio combinando la inmunoprecipitación de cromatina y el análisis transcriptómico (ChIP-chip) ha permitido caracterizar 241 genes regulados por acción del gen RIN, miembro de la familia de factores de transcripción MADS box y uno de los principales reguladores de la maduración de los frutos, sugiriendo el papel de éste en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos como la degradación de clorofilas, la acumulación de licopeno, la síntesis de etileno o la degradación de la pared celular (Fujisawa et al. 2012). Además en el mismo estudio se analizó el efecto del etileno mediante el uso del inhibidor 1-metilciclopropeno (1MCP) observándose tanto la regulación de factores de transcripción sensibles o no al etileno por parte del gen RIN como la acción del etileno promoviendo la síntesis de RIN durante la maduración del fruto. Estos resultados indicarían que la maduración del fruto en tomate estaría regulada por la interacción entre el gen RIN y la síntesis de la hormona (Fujisawa et al. 2012).

Vista la utilidad de las micromatrices de DNA como herramientas para el estudio transcriptómico de procesos complejos y altamente regulados como puede ser la maduración de los frutos, y aprovechando la coexistencia de variedades climatéricas y no climatéricas en melón, se decidió utilizar una micromatriz de NimbleGen basada

en la desarrollada por Mascarell-Creus et al. (2009) a la que se añadió algunos genes más, para el estudio del transcriptoma del fruto de melón. Esta micromatriz contiene 17,443 unigenes obtenidos mayoritariamente a partir de 12 genotecas de ESTs (*“Expressed Sequence Tags”*) de melón. Un reciente estudio sobre la resistencia en melón frente al virus del mosaico de la sandía (WMV *“Watermelon Mosaic Virus”*) ha sido el primero de los trabajos en utilizar esta micromatriz, validando su uso (Gonzalez-Ibeas et al. 2012). Existen estudios a nivel transcriptómico de diferentes procesos relacionados con la maduración del fruto en melón como los genes involucrados en la acumulación de azúcares (Dai et al. 2011) o la abscisión de los frutos (Corbacho et al. 2013), aunque éstos se han llevado a cabo exclusivamente en variedades climatéricas. Por el contrario el departamento Genética Vegetal del CRAI (*“Centre de Recerca en Agrigenòmica”*) ha participado en varios proyectos que estudian por primera vez las diferencias del transcriptoma entre la maduración de frutos de variedades climatéricas (Dulce, Vèdrantais) y no climatéricas (PS y SC) (proyecto MELRIP) y acumulación de azúcares en la pulpa del fruto (proyecto SAFQIM).

En este capítulo de tesis el objetivo principal es el estudio del perfil transcriptómico de la línea SC3-5-1 en distintos tiempos de desarrollo del fruto, previamente seleccionados tras estudios metabolómicos realizados en el *“Max Planck Institut of Molecular Plant Physiology”* (MPIMP, Gölm), y la comparación del mismo con los datos obtenidos de variedades climatéricas (Dulce, Vèdrantais) y no climatéricas (PS y SC) haciendo uso de la micromatriz de melón fabricada por NimbleGen (proyecto MELRIP). Uno de los genotipos climatéricos utilizados, además de las variedades climatéricas Dulce y Vèdrantais, fue la línea climatérica SC3-5-1. Durante este proyecto de tesis se normalizaron y analizaron exclusivamente los datos de la línea SC3-5-1, aunque se ha hecho uso del resto de datos transcriptómicos provenientes de las otras líneas para una mejor comprensión de los resultados. Tras el análisis de los datos obtenidos mediante la micromatriz de DNA, y debido a la poca fiabilidad de los mismos por la ausencia de réplicas biológicas, como se comentará más adelante, se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma de la línea SC3-5-1 a dos tiempos de desarrollo distintos (antes y después de iniciarse el proceso de maduración) mediante uso de 454 (Roche).

En los últimos años han ido surgiendo un gran número de estudios transcriptómicos mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-seq); que representan una serie de ventajas a los realizados mediante tecnología de micromatrices de DNA: (1) a priori no es necesario conocer las secuencias del genoma, lo que permite identificar nuevos genes, (2) una mayor resolución debido a la mayor cobertura de secuencias, lo que permite discernir entre variedades alélicas o splicing diferenciales, (3) un menor ruido de fondo y (4) menores requerimientos en la cantidad de RNA. Con el desarrollo de nuevas plataformas de secuenciación, la disponibilidad de un creciente número de genomas completos secuenciados y la disminución en los costes hacen que la secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) esté llamada a revolucionar la transcriptómica (Wang et al. 2009), aunque el análisis bioinformático de los datos en este tipo de experimentos es complejo.

Finalmente, los datos transcriptómicos obtenidos en ambos experimentos (micromatrices y RNA-seq) fueron comparados y se buscaron genes candidatos para *ETHQV6.3*; genes con expresión diferencial entre muestras climatéricas y no climatéricas, y que se encontraran en el intervalo genómico donde reside *ETHQV6.3*.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Normalización y análisis de la calidad de los datos transcriptómicos

Se analizaron los datos de la línea SC3-5-1 provenientes de las hibridaciones de la micromatriz de melón más los datos de hibridación de Vèdrantais, Dulce, PS y SC. Tras haber sido descartada, tras un análisis visual, la muestra PS-18a (15 DAP) se llevó a cabo la normalización de los datos mediante ROBIN (ver métodos). Durante el proceso de normalización tres muestras (SC3-5-1_22a-25d, SC3-5-1_1a-35d y Dulce_4a-15d) no pasaron los controles de calidad por lo que fueron excluidas del estudio al desviarse significativamente de la mediana de expresión del conjunto de los chips. En la figura 6.1 pueden observarse los datos de expresión para cada uno de los chips antes (59 muestras al haber sido descartada una muestra) y después de ser normalizados (56 muestras). En los datos normalizados no se incluyen aquellas muestras que no cumplían los requisitos mínimos de calidad.

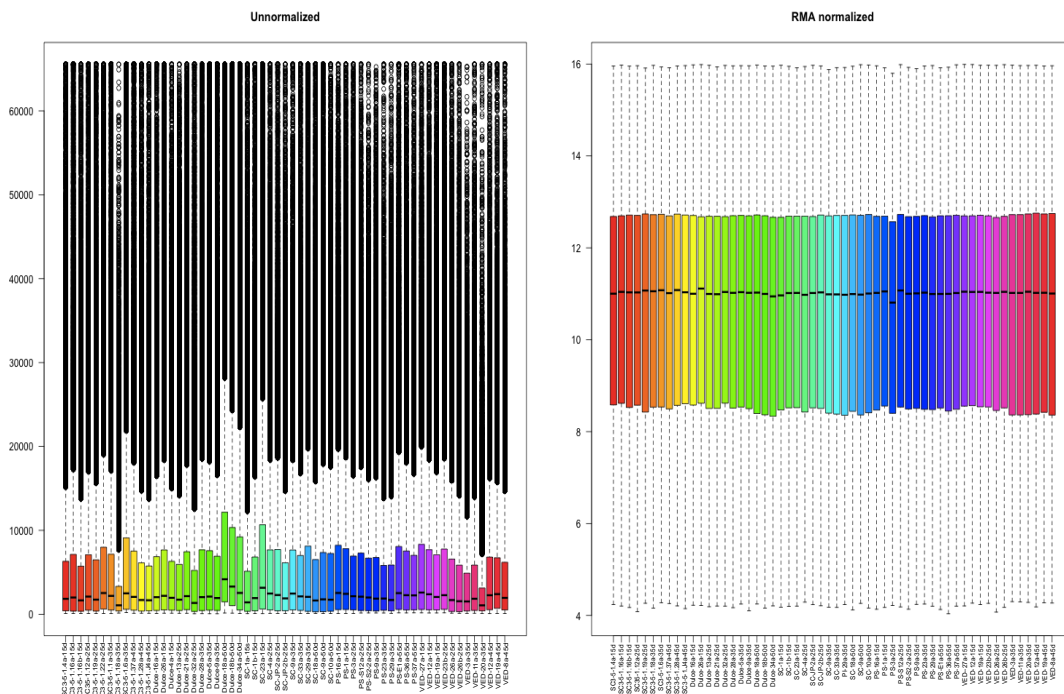


Figura 6.1. Normalización de los datos de la micromatriz de DNA mediante RMA ("Robust Multichip Average").

La calidad de los datos fue estudiada para cada chip comparando la distribución de la señal de cada uno de ellos con una distribución teórica calculada a partir de la mediana de expresión de todos los chips. Los chips Dulce-4a, SC3-5-1_22a (25 DAP) y SC3-5-1_1a (35 DAP) fueron descartados del análisis al presentar un porcentaje de genes con un “*fold change*” superior a 2 (%>LCFI) y en los que la integral de los valores absolutos obtenidos de la línea ajustada mediante regresiones pesadas localmente lineales (LOWESS, “*locally weighted scatter plot smooth*”) a los valores de intensidad (I) es mayor a 1.5. En la figura 6.2 mostramos el chip correspondiente a SC3-5-1_12a, que ha pasado todos los controles de calidad y a su derecha el chip de SC3-5-1_22a, que fue descartado para el análisis pues tanto el %LCFI como los valores de I superan los límites permitidos.

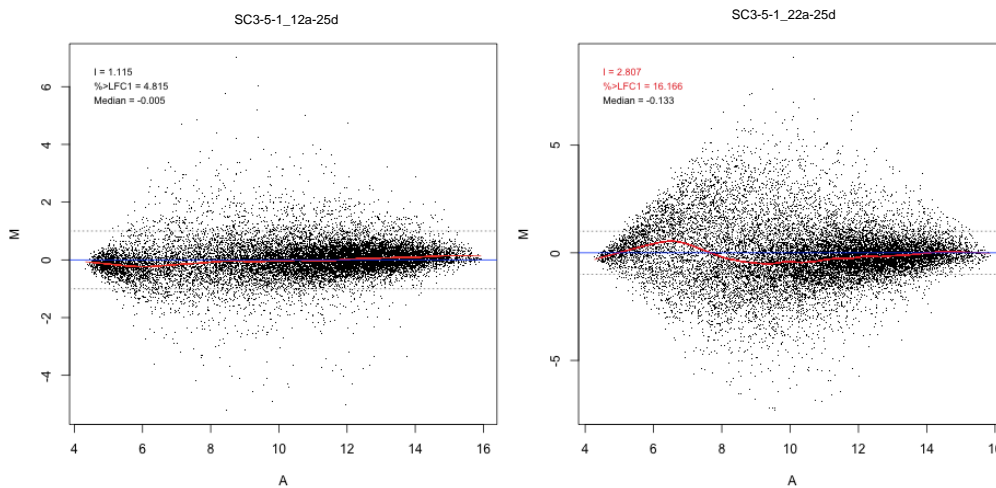


Figura 6.2. El efecto de la normalización de LOWESS sobre la señal de hibridación obtenida para los chips SC3-5-1_12a y SC3-5-1_22a se muestra en un gráfico M-A. En el que A es la señal promedio de la intensidad calculada como $[0.5 * (\log PM + \log PMx)]$ siendo PM la intensidad de la señal para el chip, PMx la mediana de la intensidad para todos los chips y M la relación $\log (PM/PMx)$.

Se llevo a cabo un análisis de componentes principales (PCA) que se expone en la Figura 6.3, donde se representan los dos primeros componentes principales, el primer componente (PCA1) explicaba el 35.24 % de la varianza y el segundo (PCA2) el 11.91 %, siendo el total de varianza explicada entre ambos el 46.5 %. El PCA1 parece estar relacionado con el proceso de desarrollo del fruto, en la gráfica podemos observar como los frutos inmaduros se agrupan en la parte más cercana al eje y siendo los frutos más alejados los más maduros. Las muestras tomadas en el punto de cosecha (45-55

DAP dependiendo de cada genotipo) se separan en este componente según su modo de maduración, los genotipos climatéricos (Ved, Dulce) se agrupan en el extremo derecho del PCA1, mientras que PS está en la zona central de este PCA. Encontramos también mucha variabilidad entre las muestras de la línea SC3-5-1, especialmente en las réplicas de 35 y 25 DAP. De hecho ya habíamos observado que algunos frutos de SC3-5-1 no presentaban en el punto de cosecha el característico color amarillo de la piel propio del fenotipo climatérico previamente observado en la misma línea (Figura 3.2), lo que nos llevaba a sospechar que existía alguna segregación genética en esta línea que no esperábamos al diseñar el experimento. El PCA2 diferencia mayoritariamente entre genotipos de la subespecie *melo* (Dulce, Vèdrantais, PS y la línea SC3-5-1) y la variedad coreana PI, que pertenece a la subespecie *agrestis*.

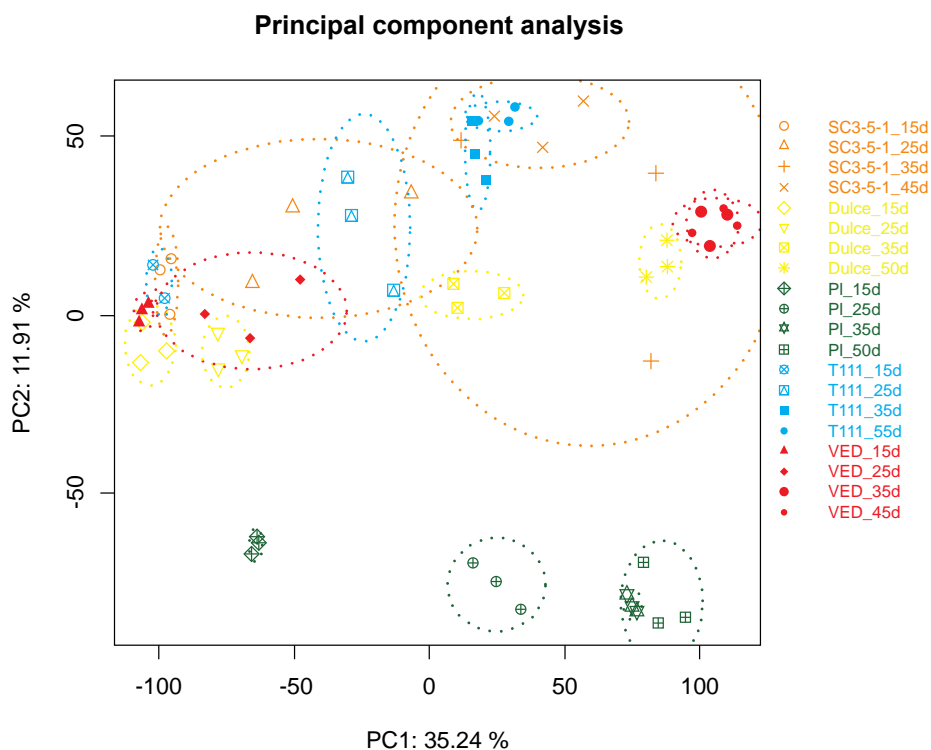


Figura 6.3. Análisis de componentes principales (PCA) mostrando el agrupamiento de las muestras por estadio de desarrollo (15, 25, 35 DAP y punto de cosecha) en PC1 y por genotipo (Dulce, Vèdrantais, SC3-5-1, PS y SC) en PC2. El código de muestras se indica a la derecha.

Un análisis por clúster jerárquico Pearson-Centered de los datos de expresión normalizados para cada chip nos permitió agrupar las muestras en función de los estadios de desarrollo y los genotipos (Figura 6.4); de este modo los genotipos climatéricos Dulce y Vèdrantais están frecuentemente agrupados en función del estadio del fruto y juntos, al igual que SC3-5-1 y su parental PS; mientras que SC muestra un comportamiento diferente. Esta división entre las líneas claramente climatéricas (Dulce y Vèdrantais), el parental PS y SC3-5-1, y la variedad coreana SC se hace más patente a medida que avanza el desarrollo del fruto (a partir de 25 DAP). Así, a estadios del fruto tempranos (15 DAP) los genotipos pertenecientes a la subespecie *melo* se encuentran agrupados mientras que los frutos inmaduros de la variedad SC se parecen más a las variedades climatéricas de 25 DAP. Sin embargo algunas muestras de la línea SC3-5-1 del mismo estadio de desarrollo no agrupaban juntas. Se observa como la muestra SC3-5-1-18a de 35 DAP se comporta como una línea climatérica, pues agrupa con los genotipos Vèdrantais y Dulce a 35 y 50 DAP, respectivamente, mientras que SC3-5-1-6a de 35 DAP agrupa con el parental no climatérico PS a 25 y 35 DAP y con SC3-5-1-12a y SC3-5-1-19a a 25 DAP, sugiriendo una maduración no climatérica de esta muestra. También se observa como las muestras de SC3-5-1 a 45 DAP aparecen en cluster con muestras de PS maduras. Para estudiar todos estos datos no esperados y ver qué había ocurrido en el caso de los triplicados de la línea SC3-5-1 en los distintos estadios de desarrollo, decidimos recurrir a las muestras originales y verificar su genotipo.

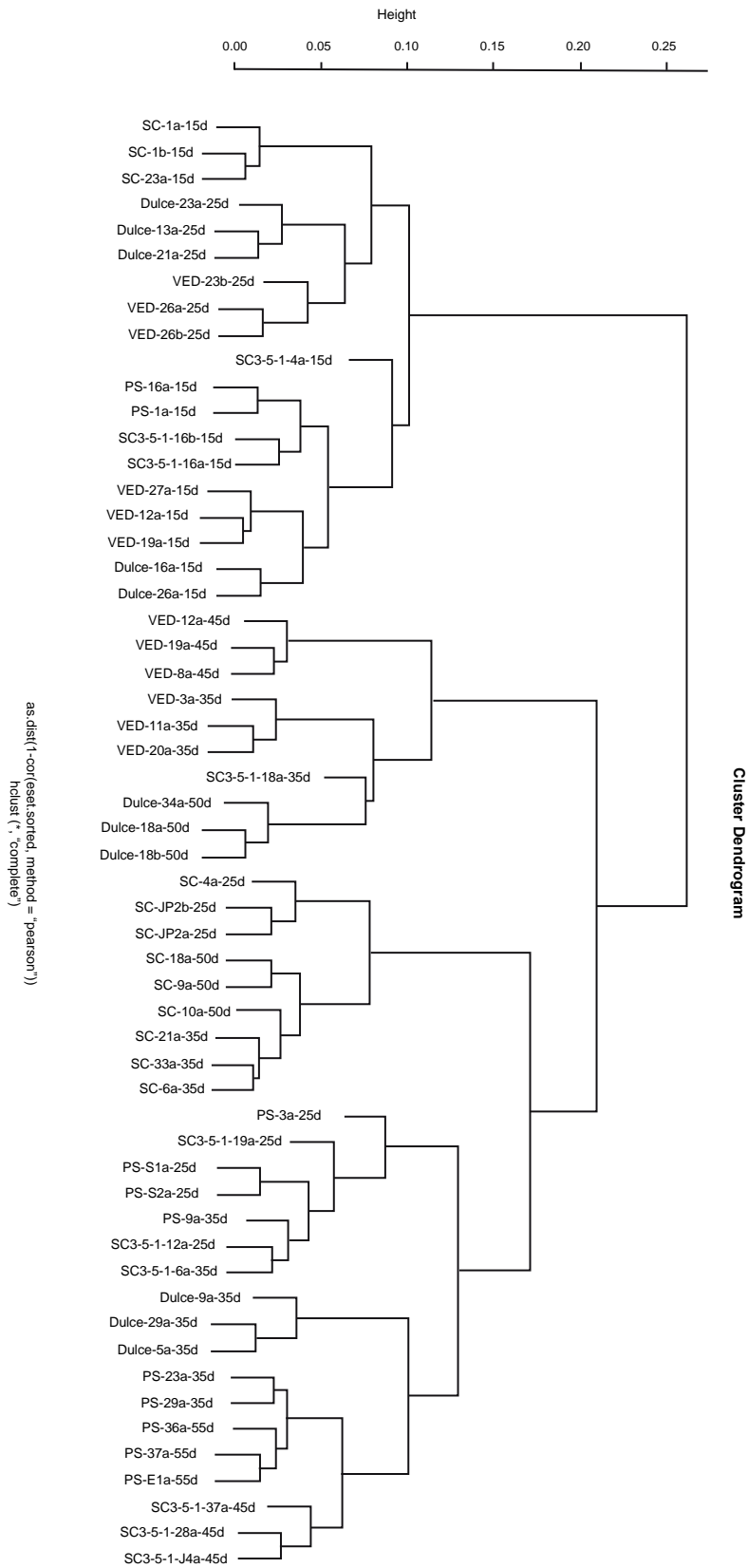


Figura 6.4. Clúster jerárquico de todas las muestras con los valores normalizados.

Recurrimos a las muestras de pulpa de fruto a partir de las cuales se había extraído RNA para el experimento de la micromatriz y extrajimos DNA. Se genotiparon cada uno de los triplicados biológicos, junto con los parentales PS y SC mediante marcadores moleculares para ambos grupos de ligamiento: A_16-C12 y PS_18-D10 (GL III) y PSI_41-H06, CI_56-B01, FR14-P22, CMCTN41, CMN61_14, TJ14 y CI_23-F08 (GL VI). Se comprobó la segregación de la introgresión del GL VI en SC3-5-1 a partir del marcador PSI_41-H06, lo que nos impedía analizar el experimento tal como había sido en un primer momento planteado (Tabla 6.1). Estos genotipos explicarían el comportamiento observado en el análisis por cluster jerárquico de las muestras de SC3-5-1 a 35 DAP, así la muestra con ambas introgresiones de SC en los GL III y VI (SC3-5-1-18a_35d) se comportaría como los genotipos climatéricos y la muestra con la introgresión exclusivamente en el GL III (SC3-5-6a_35d) no sería capaz de disparar completamente la respuesta climática y por tanto se agruparía con las muestras de SC3-5-1 y PS a 25 DAP. Sorprendentemente en el caso de las muestras SC3-5-1 a 45 DAP, el genotipo no parece explicar el comportamiento de las mismas. Todas éstas agrupan en el mismo cluster que las muestras del genotipo no climatérico PS (35 y 55 DAP); este comportamiento podría entenderse en las muestras que sólo tienen la introgresión de SC en el GL III (SC3-5-1-37a y SC3-5-1-J4a) pero no en la otra muestra con las dos introgresiones (SC3-5-1-28a), cuyo comportamiento debería ser climático. Sin embargo, la ausencia de triplicados biológicos impide llevar a cabo un estudio en profundidad de desarrollo del fruto a lo largo del tiempo que nos permitiera confirmar o comprender estos resultados. Aún siendo conscientes de la poca fiabilidad del experimento se planteó un análisis alternativo para la búsqueda de genes candidatos para los QTLs *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*. De esta forma se establecieron tres comparaciones a 35 DAP que es cuando se dispara el proceso de maduración en esta línea según los datos de metabolómica obtenidos en el grupo del MPIMP: la muestra SC3-5-1.6a vs PS, la muestra climática SC3-5-1.18a vs PS y por último SC3-5-1.18a vs SC3-5-1.6a; siendo esta última comparación la más relevante en la búsqueda de genes candidatos para *ETHQV6.3* al estar trabajando con muestras que derivan de dos líneas isogénicas cuyas diferencias se deben a los genes que se encuentran en la introgresión de SC en el GL VI, donde se encuentra el QTL.

Tabla 6.1. Genotipo de las muestras de la línea SC3-5-1, a distintos tiempos de desarrollo del fruto (DAP), hibridadas en la micromatriz. En la parte superior se muestran los marcadores utilizados para ambos grupos de ligamiento, siendo A=SC, B=PS y H el heterocigoto. Subrayadas en color gris se muestran las muestras seleccionadas para el estudio transcriptómico

GRUPO DE LIGAMIENTO (LG)	III		VI						
PLANTA	A_16-C12	PS_18-D10	PSI_41-H06	CI_56-B01	FR14-P22	CMCTN 41	CMN 61.14	MC224	CI_23-F08
PS	B	B	B	B	B	B	B	B	B
PI	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC3-5-1.4a(15DAP)	A	A	A	B	B	B	B	B	B
SC3-5-1.16a(15DAP)	A	A	A	H	H	H	H	H	H
SC3-5-1.16b(15DAP)	A	A	A	H	H	H	H	H	H
SC3-5-1.12a(25DAP)	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC3-5-1.19a(25DAP)	A	A	A	A	A	A	A	H	H
SC3-5-1.18a(35DAP)	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SC3-5-1.6a(35DAP)	A	A	A	B	B	B	B	B	B
SC3-5-1.37a(45DAP)	A	A	A	B	B	B	B	B	B
SC3-5-1.28(45DAP)	A	A	A	A	A	A	B	B	B
SC3-5-1.J4a(45DAP)	A	A	A	B	B	B	B	B	B

6.2.2. Mapman: expresión génica en forma de rutas metabólicas

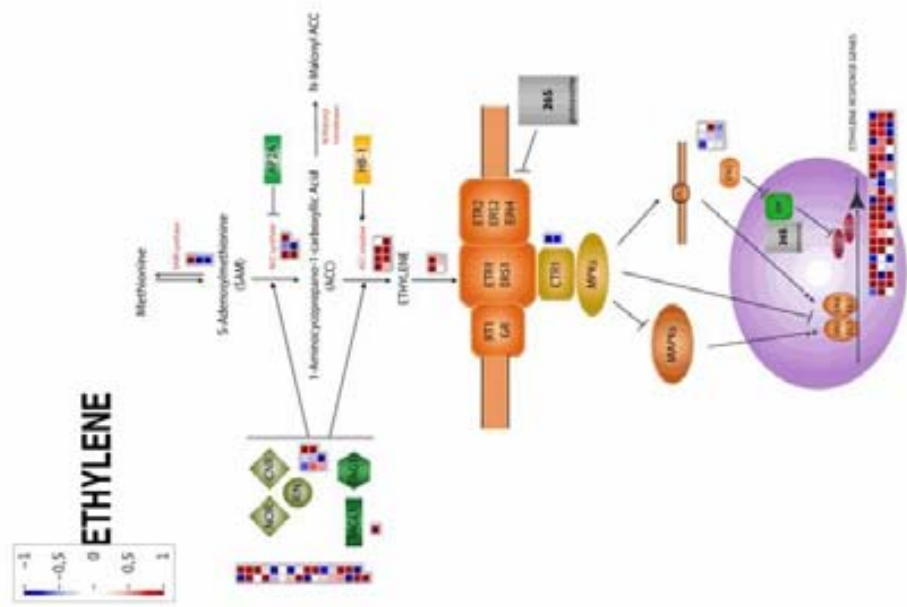
El programa Mapman nos permite visualizar diferencias de expresión entre distintas muestras, a lo largo de diferentes rutas metabólicas facilitando la comprensión biológica de dichas diferencias. Por defecto Mapman tiene implementadas una serie de rutas metabólicas predefinidas, pero permite su modificación o la introducción de nuevas rutas metabólicas de interés para el usuario.

Así, a partir de la bibliografía disponible y el “*mapping file*” de melón, que es el archivo que contiene las anotaciones de los genes presentes en la micromatriz, durante mi estancia en el MPIMP diseñé las rutas que englobaban las síntesis, percepción y transcripción de la señal de las auxinas, el ácido abscísico, ácido jasmónico, giberelinas y el etileno.

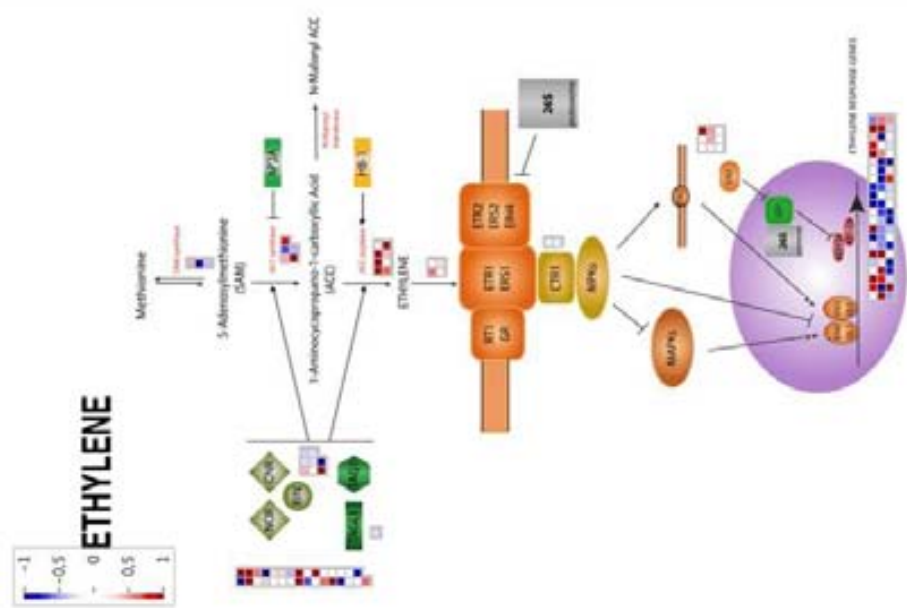
Durante la caracterización fisiológica de la maduración en la línea SC3-5-1 se había observado la producción del pico de etileno (Figuras 4.1 y 4.8) característico de los frutos climatéricos, además de una serie de rasgos como el cambio en el color de la piel externa del fruto, la dehiscencia o la producción de aromas asociados a la acción de la hormona. Lo que nos hace pensar que, aún pudiendo haber otros factores, la

maduración del fruto en la línea SC3-5-1 está principalmente regulada por la acción del etileno. Por el contrario en el parental PS no se ha detectado producción de la hormona durante el desarrollo del fruto (Figuras 4.1 y 4.8), ni percepción de la misma, ya que en experimentos paralelos realizados en nuestro laboratorio, se ha observado que los frutos de PS no responden a la aplicación de etileno externo, mientras que los de SC sí que lo hacen (Saladié, comunicación personal). Por tanto, pensamos que los genes más importantes involucrados en las diferencias de maduración entre SC3-5-1 y PS deben estar involucrados en la síntesis y percepción del etileno, junto a elementos reguladores de dichos procesos y genes regulados por la acción de la hormona ("*Ethylene Responsive Binding Proteins*", ERBP).

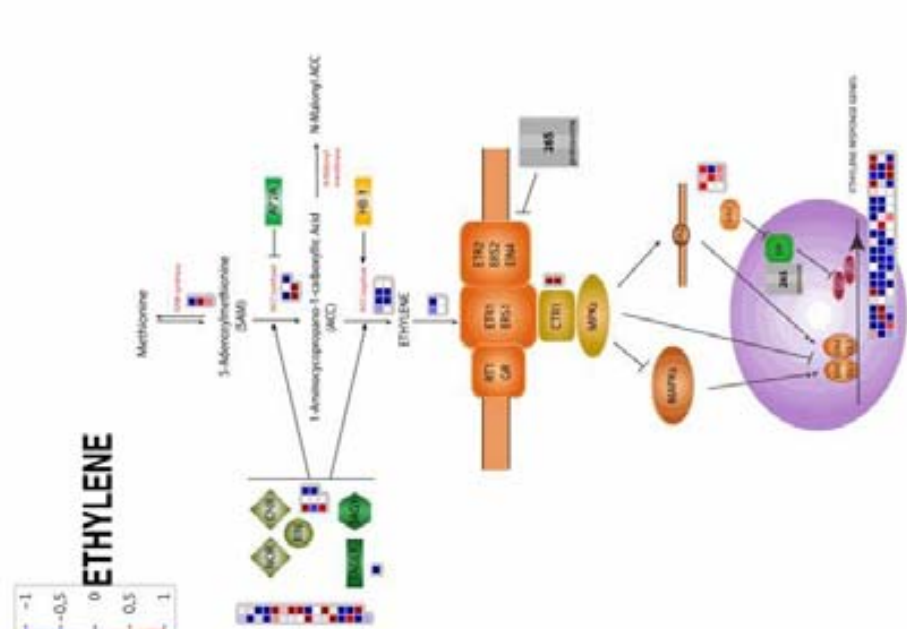
En la figura 6.5 se muestra la ruta del etileno construida en MAPMAN, con los genes anotados en el "*mapping file*" agrupados en BINs, para las tres comparaciones a estudiar. Aquellos genes que presentan una expresión diferencial igual o mayor al doble se encuentran indicados en la figura, en color azul aquellos cuya expresión es menor y en rojo cuando ésta es mayor tomando como referencia el primer genotipo de la comparación. Además en la tabla A.11 del apéndice se pueden encontrar una lista de todos estos genes junto con las diferencias de expresión para las tres comparaciones estudiadas.



A. SC3-5-1_6a vs PS



B. SC3-5-1_18a vs PS



C. SC3-5-1_18a vs SC3-5-1_6a

Figura 6.5. Esquema de la síntesis percepción y transcripción del etileno realizado en MAPMAN. (A) Comparación de la línea SC3-5-1_6a y PS, (B) comparación de la línea SC3-5-1_18a y PS y comparación entre las líneas SC3-5-1_18a y SC3-65-1_6a. En color rojo se muestran aquellos genes que están sobre expresados en la primera de las líneas de la comparación y en azul aquellos que presentan mayores valores de expresión en la segunda de las líneas de la comparación.

La comparación de las muestras SC3-5-1_18a y SC3-5-1_6a (frutos climatéricos) con muestras del genotipo no climatérico PS mostró que los genes que codifican para las enzimas que controlan la síntesis de etileno 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO) aparecieron sobre expresados en ambas muestras. Hasta el momento han sido anotados en el genoma del melón ocho genes asociados a la familia de las ACS (Ezura and Owino 2008); en nuestro experimento sólo dos de ellos aparecieron diferencialmente expresados en la muestra SC3-5-1_6a, *CmACS2* (cPSI_39-H08-M13r_c) y *CmACS3* (cA_02-A09-M13R_c), mientras que un nuevo gen presente en la micromatriz *CmACS5* (cSSH1N10_c) es expresado de 16 (SC3-5-1_6a) a 128 (SC3-5-1_18a) veces más en las líneas climatéricas que en el genotipo no climatérico PS. De la misma manera se detectó la expresión diferencial de tres genes asociados a la familia de las ACOs. Dos de ellos ya habían sido previamente descritos *CmACO1* (cFR15J17_c, cA_02-A09-M13R_c y cCL451Contig1) y *CmACO2* (cA_01-G05-M13R_c y cCL4919Contig1), ambos relacionados con la maduración mediada por etileno en frutos de melón (Lasserre et al. 1996). *CmACO1* apareció sobre expresada del orden de 35 veces más en las dos muestras climatéricas en comparación con PS. En el caso de *CmACO2* sólo se han detectado diferencias significativas en la expresión de frutos entre la muestra SC3-5-1_6a y PS, pero no en la otra muestra. Durante el análisis de los datos de la micromatriz se observó que el unigen cCL3430Contig1 se correspondía con *CmACO5*, detectándose una expresión similar en las dos muestras climatéricas y un aumento en la expresión dos veces superior a lo observado en PS.

Sorprendentemente sólo se han observado diferencias de expresión entre la muestra SC3-5-1_6a y PS para los receptores *CmETR1* (cA_22-B04-M13R_c), *CmETR2* (cCL1270Contig1), *CTR1* (cCL1444contig1) y *EIN3* (cCL4283contig1), mientras que la otra muestra presentaba los mismos valores de expresión que PS.

Finalmente una vez transmitida la señal, los factores de transcripción EIN3/EILs inducen la expresión de los genes de respuesta a etileno (ERPBs “*ethylene responsive genes*”). Existe una gran variedad de ERPBs con patrones de expresión y funciones muy distintos. De esta forma hemos encontrado genes regulados por etileno, cuya expresión

es mayor en el parental PS que en las muestras SC3-5-1_6a y SC3-5-1_18a por lo que la expresión de estos genes podría ser inhibida por la presencia de etileno. Uno de esos genes es un miembro de la familia AP2/ERF (cCL3475Contig1) cuyo estudio podría ser interesante; ya que en tomate se ha demostrado que un miembro de esta familia (*SiAP2a*) es un regulador negativo de la maduración del fruto (Chung et al. 2011). Un gran número de genes aparecen expresados de forma diferencial en la muestra SC3-5-1_6a pero no en la otra muestra ni tampoco en PS; algunos son también miembros de la familia AP2/ERF (c46d_23-B11-M13R_c, cCL4666Contig1 y cPSI_17-E09-M13R_c) y otros están relacionados con respuestas a patógenos (cHS_31-H10-M13R_c, cPSI_33-G04-M13R_c y c46d_36-H11-M13R_c).

Existe un grupo heterogéneo de factores de transcripción que regula a distintos niveles la maduración del fruto. Debido a la importancia de estos genes en la regulación de la maduración en frutos carnosos buscamos genes que se expresaban de forma diferencial entre las líneas climatéricas y el parental PS. De esta forma se encontraron distintos miembros de la familia NAM/NAC algunos sobre expresados en la muestras climatéricas (cCL5122Contig1 y cCL1154Contig1) o por el contrario en el genotipo no climatérico PS (cCL3226Contig1). Otra de esas familias con gran importancia en la regulación de la maduración de los frutos son las proteínas MADS box, donde encontramos genes que se expresan en ambas muestras (cCL3917Contig1) o genes que sólo se expresan en la muestra SC3-5-1_18a (cCL3452Contig1 y cPSI_24-C03-M13R_c).

Además, se analizó la expresión de los ortólogos en melón de los principales genes reguladores de la síntesis y percepción del etileno durante la maduración de frutos en tomate (Tabla 6.2). Únicamente se observaron diferencias en dos genes ortólogos a dos factores de transcripción: *DET1* (Mustilli 1999) relacionado con la acumulación de carotenos y flavonoides (Davuluri et al. 2005) y *NYE1* (Barry et al. 2008) relacionado con la degradación de clorofilas durante la maduración del fruto. Ambos genes presentan diferencias de expresión en la muestra SC3-5-1_6a mientras que no se observan diferencias entre las otras dos líneas.

Tabla 6.2. Listado de mutantes de tomate con maduración de fruto alterada. La tabla incluye el nombre del mutante, el gen responsable de la mutación, el ortólogo de melón con su ID en Melogen y el grupo de ligamiento (GL) donde se encuentra.

Mutante	Gen	Ortologo en melón	Melogen ID	Position (LG)
rin	SEP3 or SEP4	MELO3C022316	cCL3953Contig1	VIII
nor	NAC-NOR	MELO3C016540	cCL212Contig1	VI
Cnr	SPL1	MELO3C012909	cFR11I9_c	IV
u	GOLDEN 2-like	-	-	-
Gr/Nr-2	RTE1 or RTH	MELO3C016866	cPSI_37-A02-M13R_c	VII
Nr	ETR1	MELO3C003906	cCI_54-H09-M13R_c	V
hp-1	DDB1A	MELO3C002793	cCL2542Contig1	I
hp-2	DET1	MELO3C006225	c46d_03-F10-M13R_c	VI
nei	EIN2 co-segregation, in progress	MELO3C014230	cCL4361Contig1	V
gf	NYE1 or Staygreen2	MELO3C005616	cA_23-H05-M13R_c	IX

Como ya se ha mencionado anteriormente, debido a la ausencia de triplicados biológicos y a la imposibilidad de contar con datos de expresión completos de estos genes a lo largo de la maduración del fruto, las diferencias de expresión observadas en algunos genes deben ser tomadas con cierta cautela. A pesar de que algunos de los cambios de expresión observados para genes involucrados en la maduración climatérica de los frutos en las muestras SC3-5-1_6a y SC3-5-1_18a han sido también observados a partir de datos obtenidos con los genotipos climatéricos Vèdrantais y Dulce (Saladié, comunicación personal), estudios transcriptómicos adicionales deberían ser llevados a cabo con nuestras líneas para su confirmación.

6.2.3. Selección de genes candidatos para *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*

Una vez estudiado el perfil transcriptómico de las líneas y analizadas las principales diferencias en la ruta del etileno a 35 DAP entre las muestras climatéricas (SC3-5-1_6a y SC3-5-1_18a), y el genotipo no climatérico PS decidimos buscar genes candidatos para los dos QTLs. Para ello buscamos aquellos genes que mapearan en el intervalo de *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3* y que estuvieran relacionados con la ruta del etileno (Apéndice tabla A.11) y en dos grupos de genes que podían estar regulando la percepción de la hormona: el proteosoma y proteínas de tipo quinasas (Apéndice tablas A.12 y A.13). De esta forma se encontraron en el intervalo de *ETHQB3.5* el gen para la ACS5 (cSSH1N10_c), un miembro de la familia de los factores de transcripción NAM/NAC (cCL5609Contig1), un miembro de la familia MADS (cCL3452Contig1), tres

miembros de la ruta de degradación mediada por el proteosoma (cfr13j21, ca_18_a10-m13r_c y c46d_30-aa01-m13r_c) y un receptor de tipo quinasa (cCL5118Contig1). En el intervalo de *ETHQV6.3* se encontraron dos miembros de la familia NAM/NAC (cCL212Contig1 y cCL1154Contig1) y un receptor de tipo quinasa (cCI_55-a10-m13r_c).

De nuevo, debido a la ausencia de triplicados biológicos estos resultados deben ser tomados con mucha precaución, impidiéndonos sacar conclusiones definitivas.

Tabla 6.3. Genes candidatos para *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3* obtenidos a partir de los datos de expresión de la micromatriz. En la tabla se indican los identificadores de los genes para las bases de datos de Melogen y Melonomics, la anotación, el scaffold en el que se encuentran y los datos de expresión para cada una de las muestras; en el caso de PS la media de los triplicados biológicos.

Melogen ID	BinName	Melonomics ID	Scaffold	5M1-6a-35d	5M1-18a-35d	T111-23a-35d
cSSH1N10_c	ACS5	MELO3C010779	scaffold00014	11.83	14.72	5.99
cCL5609Contig1	NAC/NAM	MELO3C011164	scaffold00014	12.74	8.33	8.28
cCL3452Contig1	MADS	MELO3C011093	scaffold00014	8.96	6.30	6.82
cfr13j21_c	Ubiquitin protease	MELO3C011203	scaffold00014	9.72	11.30	11.10
ca_18-a10-m13r_c	Ubiquitin protease	MELO3C011097	scaffold00014	10.62	11.82	12.00
ccl2302contig1	Ubiquitin protease	MELO3C010809	scaffold00014	10.09	11.81	12.56
c46d_30-a01-m13r_c	Protein kinase receptor	MELO3C011283	scaffold00014	8.22	6.77	12.05
ccl5118contig1	Receptor kinase	MELO3C003486	scaffold00014	7.60	10.37	13.06
cCL212Contig1	NAC/NAM	MELO3C016540	scaffold00028	14.75	15.24	15.30
cCL1154Contig1	NAC/NAM	MELO3C016536	scaffold00028	12.45	13.77	9.17
cci_55-a10-m13r_c	Receptor kinase DUFF	MELO3C016579	scaffold00028	7.85	8.79	10.87

6.2.4. Secuenciación masiva del transcriptoma mediante 454

El primer problema al que nos enfrentamos en este experimento fue la determinación de los dos estadios de desarrollo del fruto a comparar para poder observar cambios en la expresión de aquellos genes involucrados en las diferencias entre el tipo de maduración entre PS y la línea SC3-5-1. Para ello, durante el verano de 2011 se cultivaron triplicados biológicos, siguiendo las indicaciones descritas en material y métodos, tanto de estas dos líneas como de las líneas 8M35 (*ETHQB3.5*) y 8M40 (*ETHQV6.3*) originadas anteriormente durante el experimento de genotipos fijos (Figura 6.6).

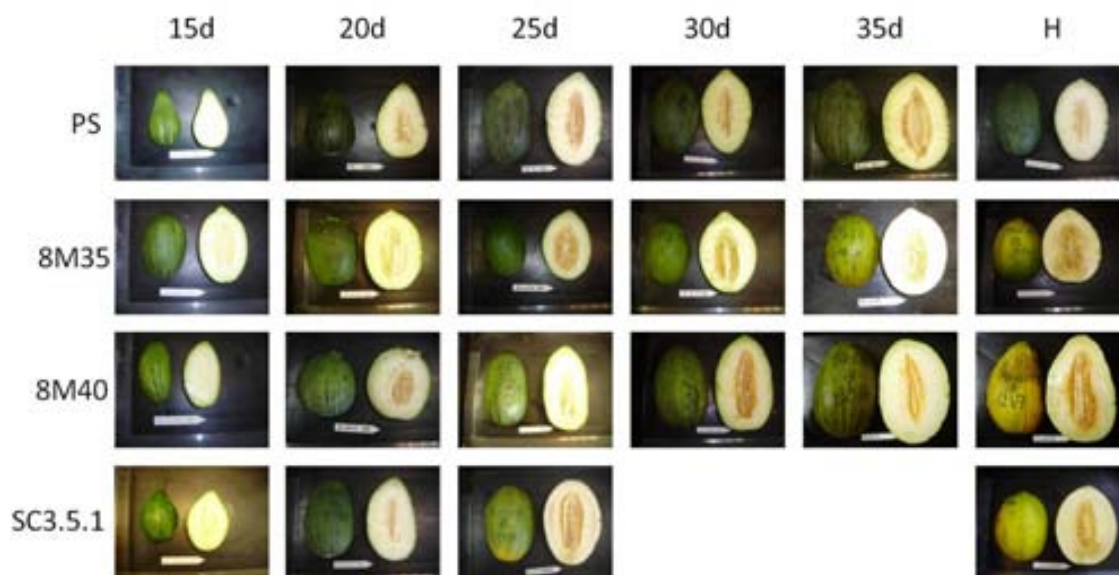


Figura 6.6. Frutos de las líneas fijas PS, 8M35 (*ETHQB3.5*), 8M40 (*ETHQV6.3*) y la línea SC3-5-1 (*ETHQB3.5 + ETHQV6.3*) en distintos estadios de desarrollo desde 15 DAP hasta el punto de cosecha (H).

Así, para la detección de los dos puntos de la comparación se estudió la expresión de un gen clave en la síntesis de etileno como es *CmACO1*, en la línea SC3-5-1 y PS, utilizando como control el gen de la ciclofilina (*CmCYP7*). *ACO1* controla el último paso de síntesis del etileno, y una acumulación del mismo coincidiría con el máximo pico de producción de la hormona. Para el estudio de la expresión de *CmACO1* se amplificó a partir de cDNA para cada uno de las réplicas de las dos líneas desde 15 DAP a cosecha y se visualizó en gel de agarosa. En PS apenas se observa una débil expresión de *CmACO1* mientras que en SC3-5-1 se observa una clara expresión de este gen (Figura 6.7). En ambos casos la expresión del gen se produce al final del desarrollo del fruto (cosecha) por lo que finalmente los puntos de desarrollo elegidos para estudiar más profundamente por secuenciación masiva fueron 25 DAP y cosecha. La elección de 25 DAP coincidiría con el inicio de la síntesis de etileno en la línea SC3-5-1 por lo que un análisis transcriptómico comparando este punto y el punto de cosecha nos permitiría conocer qué genes están directamente implicados en la regulación del inicio de la maduración dependiente de etileno.

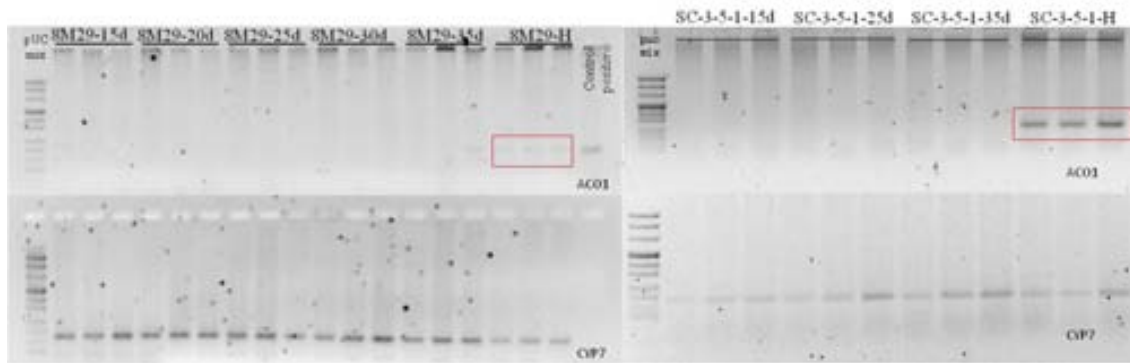


Figura 6.7. Cuantificación de la expresión en fruto de *CmACO1* en la línea 8M29 (PS) (ala izquierda) y la línea climática SC3-5-1 (a la derecha) a distintos estadios de desarrollo en gel de agarosa al 2 %. Como control se utilizo el gen de la ciclofilina (*CmCYP7*). Los recuadros rojos enmarcan los productos de amplificación de *CmACO1* en ambas líneas.

A partir de la primera carrera de secuenciación y tras eliminar las secuencias cortas o de baja calidad, se obtuvieron 653,279 lecturas con una longitud media de 253 pb. En la segunda carrera de secuenciación se obtuvieron un total de lecturas de 851,854 con una longitud media de 349 pb (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Rendimiento de las dos carreras de secuenciación GS-FLX (454).

Carrera de secuenciacion 1. 454 GS-FLX (454)	25 DAP	Punto de cosecha	Total
Rendimiento inicial	1,078,190	1,022,546	2,100,746
Lecturas después del primer filtro	1,046,696	992.375	2,039,071
Lecturas después del segundo filtro	281.701	371.579	653.279
Tamaño promedio de lecturas	225.85	243.58	235.93
Desviación estándar	97.09	100.14	
Lectura más larga	693	719	719
Lectura más corta	40	40	40
Media del tamaño de las lecturas	232.0	253.0	244.0
Carrera de secuenciacion 2. 454 GS-FLX (454)	25 DAP	Punto de cosecha	Total
Rendimiento inicial	1,077,502	1,003,261	2,080,763
Lecturas después del primer filtro	1,046,101	970.570	2,016,671
Lecturas después del segundo filtro	368.297	483.297	851.594
Tamaño promedio de lecturas	343.87	354.02	349.63
Desviación estándar	158.07	156.58	
Lectura más larga	1.574	1.589	1.589
Lectura más corta	40	40	40
Media del tamaño de las lecturas	363.0	378.0	371.0

Durante el proceso de construcción de las genotecas de cDNA las muestras habían sido marcadas mediante MIDs, que permiten medir el número de lecturas por separado para cada una de las muestras. De esta forma analizamos el número de lecturas por muestra observándose una cierta correlación entre el número de lecturas y la carrera; es decir que obteníamos valores similares en las dos (Figura 6.8). En el caso de la muestra SC3-5-1(9)_25d se obtuvo un número significativamente inferior de

lecturas al del resto en las dos carreras debido probablemente a algún problema durante el proceso de preparación de la genoteca de cDNA.

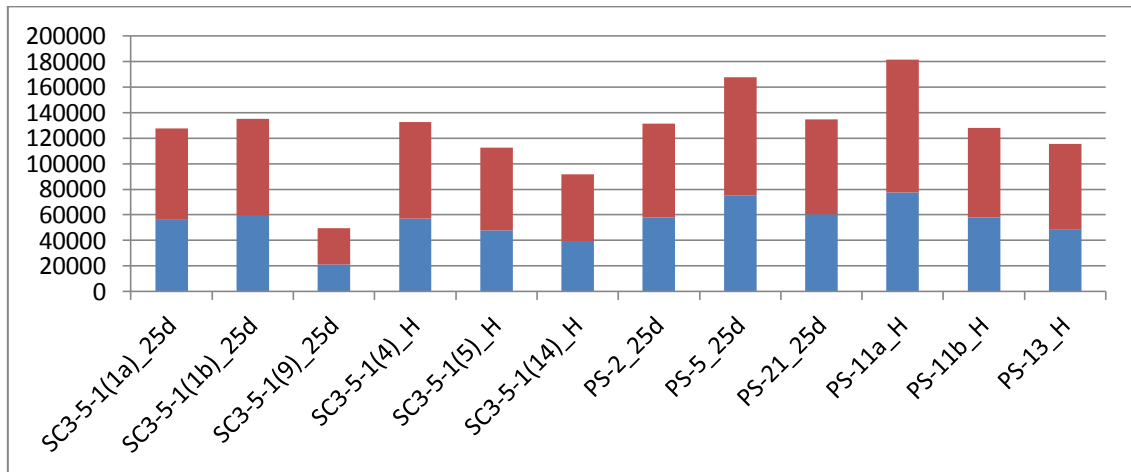


Figura 6.8. Número de lecturas por muestra obtenidas mediante secuenciación masiva usando 454 en las dos carreras. Los valores de cada carrera se indican mediante los colores rojo y azul.

Una vez finalizado este trabajo de tesis, Pablo Ríos, miembro del Departamento de Genética Vegetal del CRAG, analizó estos datos para obtener las diferencias a nivel transcriptómico de la maduración entre el genotipo no climatérico (PS) y la línea climática (SC3-5-1). Durante la redacción de esta tesis los datos del experimento de RNAseq han sido utilizados para la validación de las diferencias significativas de expresión detectadas entre SC3-5-1 y PS en algunos genes implicados de una forma directa en la maduración climática, como los involucrados en la síntesis y percepción del etileno, y en los genes candidatos seleccionados a partir del experimento de la micromatriz (Apéndice A.14). Adicionalmente, los datos del RNAseq nos proporcionan información sobre las diferencias de expresión de estos genes entre estadio inmaduro y maduro para ambas líneas.

6.3 DISCUSION

En este capítulo mediante el uso de una micromatriz de melón con tecnología NimbleGene se han podido estudiar las diferencias a nivel transcriptómico entre dos muestras climatéricas, SC3-5-1_6a y SC3-5-1_18a, y el genotipo no climatérico PS en el estadio en el que se deben estar produciendo la mayoría de los cambios relacionados con la maduración del fruto (35 DAP). A pesar de no poseer triplicados biológicos, el análisis de los datos representados en rutas metabólicas mediante el uso de MAPMAN nos ha permitido comprobar diferencias en la síntesis y percepción del etileno. La biosíntesis de la hormona está principalmente controlada por dos enzimas, ACS y ACO, y hemos encontrado diferentes miembros de estas familias inducidos en las muestras climatéricas. Para la familia ACS: *CmACS2* y *CmACS3*, relacionadas con procesos de patogenicidad y estrés abiótico (Mizuno et al. 2006), y *CmACS5* asociado a la maduración de fruto en melón; habiéndose observado un aumento en la expresión a lo largo del desarrollo del fruto y alcanzando su valor máximo coincidiendo con el pico de etileno en los genotipos climatéricos Dulce y Vèdrantais (Saladie, comunicación personal). *CmACS2* y *CmACS3* han sido descritos como genes inducidos por auxinas en hipocotiledones etiolados y en el caso de *CmACS2* en las primeras fases de desarrollo del fruto (Ishiki et al. 2000); otros trabajos muestran la posible relación de *CmACS2* en las respuestas mediadas por etileno a stress salino y patogenicidad (Mizuno et al. 2006). En este estudio sorprendentemente hemos detectado la presencia de ambos genes sobre expresados en frutos de 35 DAP en la muestra SC3-5-1_6a pero no en la otra muestra climatérica, posiblemente asociados a respuestas de estrés y no a la maduración del fruto.

Para la familia ACO, se observó el mismo comportamiento en la expresión de otro de los genes responsables (*CmACO1*) de la última de las reacciones en la síntesis de la hormona (Balagué et al. 1993). *CmACO2* presentaba expresión únicamente en la muestra SC3-5-1_6a y aunque previamente había sido detectada su presencia a pequeñas concentraciones en hipocotiledones etiolados (Lasserre et al. 1996) todavía se desconoce su función en el fruto. Estos datos parecen sugerir una deficiencia en la síntesis de la hormona en el parental no climatérico PS, mientras que observamos

como en las dos líneas climatéricas la maquinaria necesaria para la producción de etileno se encuentra inducida y funcional.

Sorprendentemente no se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes que codifican para los receptores responsables de la percepción de la señal entre la muestra SC3-5-1_18a y PS. Por el contrario, sí observamos diferencias significativas en la expresión de algunos miembros de la familia de receptores de etileno entre la línea climatérica SC3-5-1_6a y las otras dos líneas. Así, se detectó en esta línea la sobreexpresión de dos receptores *CmETR1* y *CmETR2*; posiblemente relacionados con respuestas a procesos de estrés biótico (Penninckx 1998; Mewis et al. 2005). El hecho de que la maquinaria de percepción de la hormona sólo sea observada en esta línea (SC3-5-1_6a) podría deberse a la existencia de algún tipo de estrés durante el cultivo de la línea SC3-5-1_6a; puesto que ambos procesos comparten los mismos elementos para la percepción del etileno y en esa misma línea también se había detectado la expresión de *CmACS2*, asociada a procesos de stress. Podría ser que esta activación de la ruta del etileno como mecanismo de defensa podría ser la responsable de las pequeñas diferencias que vemos en los otros dos elementos que actúan aguas abajo de la cascada de señalización (*CmCTR1* y *CmEIN3*); aunque en un principio no podríamos descartar que tuvieran algún tipo de relación con el proceso de maduración de esta línea, pues se observaron diferencias de expresión significativas de *CmETR2* entre frutos de PS y SC3-5-1 maduros en el experimento de RNAseq.

Por otra parte numerosos estudios muestran como además de una regulación transcripcional es importante la regulación post transduccional mediada por el proteosoma; así en un trabajo realizado en *Arabidopsis* se ha detectado un aumento en el nivel de proteína de *EIN3* regulado por etileno mientras que no había variaciones en los niveles de mRNA (Guo and Ecker 2004). En otro estudio se observó un aumento en los niveles de proteína del receptor *ETR2*, debido a la acción del etileno, y un posterior descenso en los mismos debido a la degradación del receptor vía proteosoma. Así, utilizando inhibidores del proteosoma se comprobó que no se producía este descenso en el nivel de proteína del receptor demostrándose la regulación de *ETR2* mediante este sistema (Chen et al. 2007). Otro importante mecanismo de regulación en la

percepción de la hormona es la acción de proteínas quinasas sobre el receptor *EIN3*. Recientemente se ha propuesto un mecanismo antagonista de regulación del receptor basado en la acción de dos grupos de MAP quinasas: así tendríamos a los estabilizadores de la proteína *EIN3* (MKK9-MPK3/6) y al regulador negativo *CTR1* actuando de una forma coordinada para la correcta transmisión de la señal (Yoo et al, 2008). Un miembro de las N-acetil transferasas conocido como *ATH* ("*hookless1*"), relacionado con la percepción de etileno, se expresa del orden de tres (SC3-5-1_6a) y diez (SC3-5-1_18a) veces más en las muestras climatéricas que en PS. Al comprobar la expresión de este gen en el resto de genotipos, se observa como la expresión de éste aumenta justo antes de que se dispare la maduración coincidiendo con el pico en la síntesis de etileno en las líneas climatéricas (Dulce y Vèdrantais). En el caso de SC pese a no producir un pico claro de etileno si que se observa una mayor producción del mismo además de ser sensible a la hormona por lo que probablemente pequeñas cantidades de etileno son capaces de disparar la expresión de *ATH*.

El mecanismo de regulación de la maduración climatérica es altamente complejo, en el que se entremezclan procesos dependientes e independientes de etileno (Pech et al. 2008); además existen reguladores externos, como miembros de las familias MADS-box, AP2/ERB o NAM/NAC entre otros, que se encuentran regulando todo el proceso a diferentes niveles. Se analizó la expresión de los ortólogos en melón de los principales genes reguladores de la síntesis y percepción del etileno durante la maduración de frutos de tomate. Tan sólo se encontraron los ortólogos en melón de los genes de tomate *DET1* y *NYE1* sobre expresados en la muestra SC3-5-1_6a pero no en la otra muestra climatérica (SC3-4-1_18a). Tampoco se han observado diferencias significativas en la expresión de esos genes entre las líneas climatéricas (Dulce y Vèdrantais) y las no climatéricas (PS y SC) por lo que no parecen ser los principales responsables del tipo de maduración climatérica en la línea SC3-5-1. Durante el análisis de expresión de las proteínas MADS box, encontramos genes que se expresan en ambas muestras (cCL3917Contig1) o genes que sólo se expresan en muestra SC3-5-1_18a (cCL3452Contig1 y cPSI_24-C03-M13R_c). Estos dos últimos genes podrían estar controlados o relacionados de alguna forma con el gen del locus *ETHQV6.3* ya que son los dos primeros factores de transcripción cuya expresión sólo cambia en la muestra

SC3-5-1_18a mientras que entre la otra muestra y PS no se aprecian diferencias significativas. Aunque ambos genes están localizados en regiones cromosómicas diferentes a la región del locus *ETHQV6.3* no pudiendo ser considerados como genes candidatos sí que podrían estar de alguna forma relacionados con dicho locus, pues estos factores de transcripción actúan en cascada y de forma coordinada.

Tras el análisis global de los datos se observan diferencias entre las muestras climatéricas SC3-5-1_6 (*ETHQB3.5*) y SC3-5-1_18a (*ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*) aunque no podemos concluir si se deben a diferencias en el mecanismo de regulación de todo el proceso o a una interacción entre ambos locus. Sería interesante poder estudiar el perfil transcriptómico de una línea que poseyera una única introgresión en el GL VI (*ETHQV6.3*) y así comparar las tres líneas entre sí para confirmar si existe algún tipo de interacción. En nuestro estudio la muestra climatérica SC3-5-1_18a posee ambos loci, por lo que no podemos distinguir si el efecto se debe exclusivamente a *ETHQV6.3* o a la interacción entre ambos. Aún así gracias a estos datos y a la secuencia del genoma del melón (Garcia-Mas et al. 2012) para el mapeo de los mismos hemos podido seleccionar una serie de genes candidatos para *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*. Para *ETHQB3.5* se encontraron el gen (*CmACS5*) que codifica para la enzima que cataliza el último paso en la biosíntesis del etileno, miembros de la familia de las MAP quinasas y varias ubiquitin proteasas que podrían estar regulando la percepción de la hormona. Aunque *CmACS5* había sido previamente descartado en un trabajo previo, usando subNILs de melón en la región del locus *ETHQB3.5*, al mapear fuera del intervalo del QTL. Para *ETHQV6.3* también se han encontrado dos miembros de la familia NAM/NAC (cCL1154Contig1 y cCL212Contig1). Un miembro de esa familia ha sido clonado e identificado en tomate como el responsable de la insensibilidad a etileno en el mutante NOR (patente US 6,762,347 B).

Una de las principales limitaciones de este estudio es el limitado número de replicas biológicas y la imposibilidad de estudiar la expresión de estos genes a lo largo del desarrollo del fruto de manera continua. Al comparar un único punto del desarrollo es posible que genes involucrados en la maduración pero expresados en estadios anteriores no sean detectados. Para poder conocer y confirmar de una manera

fiable las diferencias observadas en el perfil transcriptómico de la línea climatérica SC3-5-1 y su parental PS a lo largo del tiempo, que era uno de los objetivos iniciales de la tesis, se han preparado las muestras y llevado a cabo la secuenciación masiva del transcriptoma mediante tecnología 454 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Actualmente se está llevando a cabo un análisis en profundidad de los datos obtenidos, lo que nos permitirá conocer en detalle las diferencias en el mecanismo de maduración de los frutos de las líneas SC3-5-1 y PS en dos puntos del desarrollo del fruto.

En un primer análisis a partir de los datos del RNA-seq se confirmó el aumento de expresión de los genes implicados en la síntesis de la hormona en la línea climatérica SC3-5-1, mientras que no se aprecian diferencias significativas entre los frutos inmaduros y maduros del parental PS (Ríos, comunicación personal). Así, al comparar frutos en estadio maduro entre SC3-5-1 y PS existen diferencias estadísticamente significativas en los genes *ACS5* (cSSH1N10_c), *ACO1* (cFR15J17_c, cCL451Contig1 y cA_04-F11-M13R_c), estando éstos sobre expresados en la línea climatérica confirmando la incapacidad de PS para sintetizar etileno. Sorprendentemente, se detectan diferencias entre frutos maduros de PS y de la línea SC3-5-1 en la expresión del receptor *ETR2* (cCL1270Contig1) que no había sido detectada en la micromatriz, así este gen se expresa aproximadamente ocho veces más en el parental PS. Por el contrario no se detectaron diferencias significativas en la expresión del gen de la *ATH* (cPSI_11-E04-M13R_c), por lo que probablemente este gen esté relacionado con la percepción de etileno pero asociado a un proceso independiente de la maduración de fruto. En el análisis de la expresión de genes candidatos tan sólo se detectaron cambios significativos en uno de los miembros de la familia de los NAC (MELO3C016536), que además se halla localizado en el intervalo de *ETHQV6.3*. Así se observa como este gen se encuentra sobre expresado en ambos estadios de los frutos de la línea climatérica, expresándose del orden de dieciséis veces más en frutos maduros coincidiendo con lo observado previamente en el experimento de la micromatriz. Es por todo esto que el uso de los datos preliminares de RNAseq nos permiten confirmar los datos observados en la micromatriz en relación a los genes involucrados en la maduración climatérica de la muestra SC3-5-1_18a, y apoyan la selección del gen

MELO3C016536 (correspondiente al unigen cCL1154Contig1) como un posible gen candidato para el locus *ETHQV6.3*.

7. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE UN GEN CANDIDATO PARA *ETHQV6.3*

7.1. INTRODUCCIÓN

La identificación de los genes responsables de las variantes fenotípicas observadas es de interés para la comprensión del funcionamiento de los organismos y para su aplicación en proyectos de mejora genética. Hasta la fecha aproximaciones distintas han llevado al clonaje de genes de interés en plantas como son el clonaje posicional, la mutagénesis insercional, el uso de datos transcriptómicos o la identificación de genes candidatos. Un primer grupo, los llamados métodos clásicos, que comprende el clonaje posicional (Rommens et al. 1989; Tanksley et al. 1995) y la mutagénesis insercional (Byrne et al. 1996; Ito et al. 1999) han permitido la identificación de genes mayores con éxito. Sin embargo, en algunas ocasiones no es posible llevar a cabo ninguna de estas estrategias ya sea debido al tamaño del genoma o a la imposibilidad de desarrollar marcadores moleculares en la región, en el primer caso, y a la ausencia de métodos para generar eficientemente mutagénesis insercional. Una estrategia alternativa para superar estas limitaciones puede ser la identificación de posibles genes candidatos para el carácter (Byrne et al. 1996). Existen distintas definiciones de gen candidato; pero desde el punto de vista de la genética sería todo aquel gen polimórfico relacionado a nivel biológico con el fenotipo estudiado y que co-segrega con el mismo en poblaciones segregantes o en análisis de asociación. Según esto tendríamos diferentes genes candidatos en función de los cruzamientos estudiados (Pflieger et al. 2001). La combinación de estrategias como el clonaje posicional o el mapeo fino y la identificación de genes candidatos mediante el uso de herramientas genómicas como las micromatrices de DNA pueden acelerar el proceso de clonaje de genes de interés.

En el último capítulo de esta tesis, a partir del mapa genético de alta resolución del locus *ETHQV6.3* hemos procedido a la identificación de todos los genes de la región mediante el uso de la secuencia del genoma del melón (Apéndice A.9) y haciendo uso de los datos transcriptómicos obtenidos a partir de la micromatriz y posteriormente confirmados mediante el experimento de RNA-seq se seleccionaron

dos genes de la familia de factores de transcripción NAM (*Non Apical Meristem*) para su estudio y caracterización

7.2. RESULTADOS

7.2.1. Análisis de los genes candidatos

ETHQV6.3 mapea en una región de 2.75 Mbp del “scaffold00028” entre los marcadores AP2/ERF y FR14-P22; donde se han anotado 73 genes; entre los que se encontraban genes relacionados con la degradación de la pared celular, una expansina (MELO3C016517) y un precursor de la poligalacturonasa (MELO3C016494), distintos transportadores de tipo ABC (MELO3C016530 y MELO3C016534) o de potasio (MELO3C016503 y MELO3C016505), un miembro de la familia de genes de resistencia NBS-LRR (MELO3C016529), un receptor tipo quinasa (MELO3C016502), un gen para la carotenoide isomerasa (MELO3C016495), un gen implicado en la señalización para la ubiquitinización (MELO3C016514) y dos miembros de la familia NAC (MELO3C016536 y MELO3C016540), entre otros. Un miembro de la última familia, presenta una alta homología con el gen *nor* que ha sido identificado en tomate como responsable del fenotipo no climatérico del mutante NOR (“*non ripening*”) (patente US 6,762,347 B). Este mutante de tomate presenta características fenotípicas no climatéricas como la ausencia del pico de etileno característico durante el proceso de maduración; presentando frutos verdes (no se produce acumulación de carotenos) y firmes. El fenotipo climatérico no es debido únicamente a la falta de síntesis de etileno, sino también a la incapacidad de percepción de la hormona, ya que tratamientos exógenos con etileno no son capaces de revertir el fenotipo climatérico característico de los frutos de tomate (Giovannoni 2007). La variedad no climatérica de melón PS presenta muchas de estas características fenotípicas; la integración del el mapeo fino del locus *ETHQV6.3* junto con los datos transcriptómicos, en el caso del gen MELO3C016536, convierten a estos dos miembros de la familia de factores de transcripción de tipo NAC en dos buenos candidatos para explicar las diferencias en el tipo de maduración del fruto observadas entre PS y la línea SC3-5-1.

El gen MELO3C016536 se corresponde con el unigen cCL1154Contig1 en la base de datos de Melogen, formado por 1496 pb con tres exones predichos. El cDNA está formado por 891 nucleótidos que codifican para una proteína de 296 aminoácidos (MW: 33.15 KDa e IP 6.60). El segundo de los genes MELO3C016540 se corresponde con el unigen cCL212Contig1 formado por 1549 pb y un exón predicho. El cDNA tiene

una longitud de 1333 pb que codifica para una proteína de 360 aminoácidos (MW=39.5 KDa e IP=8.3). En el análisis transcriptómico no se observan diferencias en la expresión de MELO3C016540 entre SC3-5-1 y PS mientras que en el gen MELO3C016536 si se observó un aumento de la expresión en las líneas climatéricas (expresándose 32 veces más en SC3-5-1 que en PS a 35 DAP según datos de la micromatriz) por lo que decidimos profundizar en la caracterización de MELO3C016536.

Se amplificó un fragmento de 1059 pb de MELO3C016536 que incluía su pauta abierta de lectura con una longitud de 891 nucleótidos en PS y SC3-5-1 (Figura. 7.1.A).

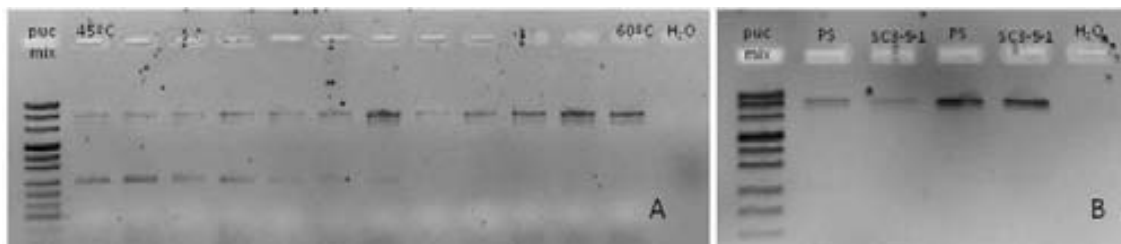


Figura 7.1. Amplificación del ORF de MELO3C016536 a partir de muestras de cDNA de PS y SC3-5-1, y visualización en gel de agarosa al 2 % mediante tinción con bromuro de etidio. A) PCR de gradiente en el cDNA del parental PS para la determinación de la temperatura de hibridación óptima. B) Amplificación de MELO3C016536 en el cDNA de PS y la línea SC3-5-1. En ambas amplificaciones se llevó a cabo un control negativo (H₂O).

La comparación de las secuencias del cDNA de MELO3C016536 entre PS y SC3-5-1 muestra dos diferencias nucleotídicas T/C en las posiciones 759 y 799 (Figura 7.2). Este último cambio nucleotídico en la posición 799 daba lugar a un cambio de aminoácido; en el genotipo PS hay una serina que se convierte en prolina en la línea SC3-5-1 (Figura 7.3).


```

PS          ATGGACCCACTGACGCAGCTTAGCTTACCGCCGGGATTCAGATTTTCCGACCGATGAA 60
SC3-5-1    ATGGACCCACTGACGCAGCTTAGCTTACCGCCGGGATTCAGATTTTCCGACCGATGAA 60
*****

PS          GAGCTTTTAGTTCAATATCTTTGCCGGAAGTGGCCGGCCACCATTTAGCTTGCAACTC 120
SC3-5-1    GAGCTTTTAGTTCAATATCTTTGCCGGAAGTGGCCGGCCACCATTTAGCTTGCAACTC 120
*****

PS          ATCGCTGAGATTGACTTGTTACAAATTCGATCCATGGGTTTACCTGGAAAGGCTTTATTC 180
SC3-5-1    ATCGCTGAGATTGACTTGTTACAAATTCGATCCATGGGTTTACCTGGAAAGGCTTTATTC 180
*****

PS          GGGGAAAAGGAATGGTACTTTTTCAGCCCAAGAGACCGGAAATATCCAAACGGGTCTAGA 240
SC3-5-1    GGGGAAAAGGAATGGTACTTTTTCAGCCCAAGAGACCGGAAATATCCAAACGGGTCTAGA 240
*****

PS          CCAAACCGGGTAGCCGGTTCGGGTTACTGGAAGGCGACCGGTACGGATAAAATAATCTCG 300
SC3-5-1    CCAAACCGGGTAGCCGGTTCGGGTTACTGGAAGGCGACCGGTACGGATAAAATAATCTCG 300
*****

PS          TCGGAAGGGAAGAAGCTCGGAATTAAGGCTCTGGTTTCTACGTCGGAAAAGCTCCT 360
SC3-5-1    TCGGAAGGGAAGAAGCTCGGAATTAAGGCTCTGGTTTCTACGTCGGAAAAGCTCCT 360
*****

PS          AAGGGAACAAAACGAATTGGATTATGCATGAGTATCGCCTTATTACTTCTCCAGAAAA 420
SC3-5-1    AAGGGAACAAAACGAATTGGATTATGCATGAGTATCGCCTTATTACTTCTCCAGAAAA 420
*****

PS          ACAGGAAGCTCCAAGCTGGACGATTGGGTTTATGTCGGATTATAAGAAGAATTCGAGT 480
SC3-5-1    ACAGGAAGCTCCAAGCTGGACGATTGGGTTTATGTCGGATTATAAGAAGAATTCGAGT 480
*****

PS          TGTCAAAGCCGACGGGGAGTATTCAAGTAAGGAATACAGTAACGCCTCACCCTCGTCTG 540
SC3-5-1    TGTCAAAGCCGACGGGGAGTATTCAAGTAAGGAATACAGTAACGCCTCACCCTCGTCTG 540
*****

PS          TCAATCGACGAAGTCATCGAATCCCTACCAGAAACGGGCGACGATTTCTTTGCATACCCA 600
SC3-5-1    TCAATCGACGAAGTCATCGAATCCCTACCAGAAACGGGCGACGATTTCTTTGCATACCCA 600
*****

PS          AAAACAACATTACAACATAACGACATTATGAATAAATCAACTTTGAAATTCGGCGGAC 660
SC3-5-1    AAAACAACATTACAACATAACGACATTATGAATAAATCAACTTTGAAATTCGGCGGAC 660
*****

PS          TCTGTACATTCGGATTGGGCGAGTTTGGCCGGGCTTACTCAGTGCCGGAACTCGCTCCC 720
SC3-5-1    TCTGTACATTCGGATTGGGCGAGTTTGGCCGGGCTTACTCAGTGCCGGAACTCGCTCCC 720
*****

PS          GTCGACCATTCGGGGACATTCGATTTCAACAACAACAATTAACACGATCGCTGATCTGTAT 780
SC3-5-1    GTCGACCATTCGGGGACATTCGATTTCAACAACAACAATTAACACGATCGCTGATCTGTAT 780
*****

PS          GTTCCTTCAGTTACATCGTCGTTTTGCCAGGTGGATTATCCGCCGGCTCGGCGTTCCGT 840
SC3-5-1    GTTCCTTCAGTTACATCGTCGTTTTGCCAGGTGGATTATCCGCCGGCTCGGCGTTCCGT 840
*****

PS          TACTCGACGCAACAAGGGACGGCGGGAGTGTTCGGATTCAGCCAATGA 891
SC3-5-1    TACTCGACGCAACAAGGGACGGCGGGAGTGTTCGGATTCAGCCAATGA 891
*****

```

Figura 7.2. Alineamiento de la secuencia del cDNA de MELO3C016536 en PS y la línea SC3-5-1. En color rojo (PS) y verde (SC3-5-1) se indican los polimorfismos detectados en las posiciones 759 y 799.

```

                A                               B
PS             MDPLTQLSLPPGFRFFPTDEELLVQYLCRKVAGHHFSLQLIAEIDLYKFDPWVLPGKALF 60
SC3-5-1       MDPLTQLSLPPGFRFFPTDEELLVQYLCRKVAGHHFSLQLIAEIDLYKFDPWVLPGKALF 60
                *****

                C                               D
PS             GEKEWYFFSPDRKYPNGSRPNRVAGSGYWKATGTDKIISSEGKNVGIKKALVFYVGKAP 120
SC3-5-1       GEKEWYFFSPDRKYPNGSRPNRVAGSGYWKATGTDKIISSEGKNVGIKKALVFYVGKAP 120
                *****

                E
PS             KGTKTNWIMHEYRLITSSRKTGSSKLDDWVLCRIYKKNSSCQKPTGSISSKEYSNASPSS 180
SC3-5-1       KGTKTNWIMHEYRLITSSRKTGSSKLDDWVLCRIYKKNSSCQKPTGSISSKEYSNASPSS 180
                *****

PS             SIDEVIESLPETGDDFFAYPKTTLQHNDIMNKFNFEPADSVHSDWASLAGLYSVPELAP 240
SC3-5-1       SIDEVIESLPETGDDFFAYPKTTLQHNDIMNKFNFEPADSVHSDWASLAGLYSVPELAP 240
                *****

PS             VDHSGTFDFNNNNNNTIADLYVPSVTSSFCQVDYPPASAFRYSTQQRDGGGVFGFSQ- 296
SC3-5-1       VDHSGTFDFNNNNNNTIADLYVPSVTSPFCQVDYPPASAFRYSTQQRDGGGVFGFSQ- 296
                *****

```

Figura 7.3. Alineamiento de las secuencias proteicas de MELO3C016536 en el parental no climatérico PS y en la línea climatérica SC3-5-1, deducidas a partir de la secuencia de DNA. El aminoácido polimórfico se indica en rojo para la serina de PS y en verde para la prolina de la línea SC3-5-1. Además, los cinco dominios conservados característicos de las proteínas de la familia NAC (A-E) están indicados en negrita.

Este polimorfismo nucleotídico, que daba lugar al cambio de aminoácido, se convirtió en un marcador de tipo CAPS (“*Cleaved Amplified Polimorphic sequence*”) al encontrar una enzima de restricción *BtgZI* que cortaba exclusivamente en la secuencia de SC3-5-1 originando tres fragmentos de 106, 188 y 765 pb. Utilizamos este nuevo marcador, al que denominamos de la misma forma que al unigen de Melogen del que provenía (cCL1154), para genotipar individuos recombinantes F3, pertenecientes a la familia 10M80-90 generados durante el estudio de progenie de la población 2010-F₂, observándose una perfecta correlación entre el genotipo del marcador y el fenotipo. Así, el individuo 90-6 que presentaban el alelo de PS en homocigosis (banda de 1059 pb), a pesar de poseer el otro QTL *ETHQB3.5* en el GL III, y formar zona de abscisión no llegó a caer de la planta y presentaba un fenotipo más similar al parental PS con una menor producción de aromas y sin cambio de color. Por el contrario el individuo 90-5 que presentaban los alelos de SC en homocigosis (banda de 765 pb) mostraba todas las características climatéricas de la línea SC3-5-1, siendo dehiscente a 37 DAP, produciendo el característico aroma dulzón y el brusco viraje de verde a amarillo en la piel del fruto. Los individuos heterocigóticos (90-4, 90-12, 90-18 y 90-7) también mostraban características climatéricas intermedias, siendo dehiscentes a 49 DAP. Cabe recordar que todos estos individuos portan el locus *ETHQB3.5* en homocigosis para SC

y que por ello todos presentan algún tipo de maduración climatérica del fruto; pero que sólo aquellos con los alelos de SC en homocigosis en ambos QTLs muestran el fenotipo climatérico extremo (Figura 7.4).

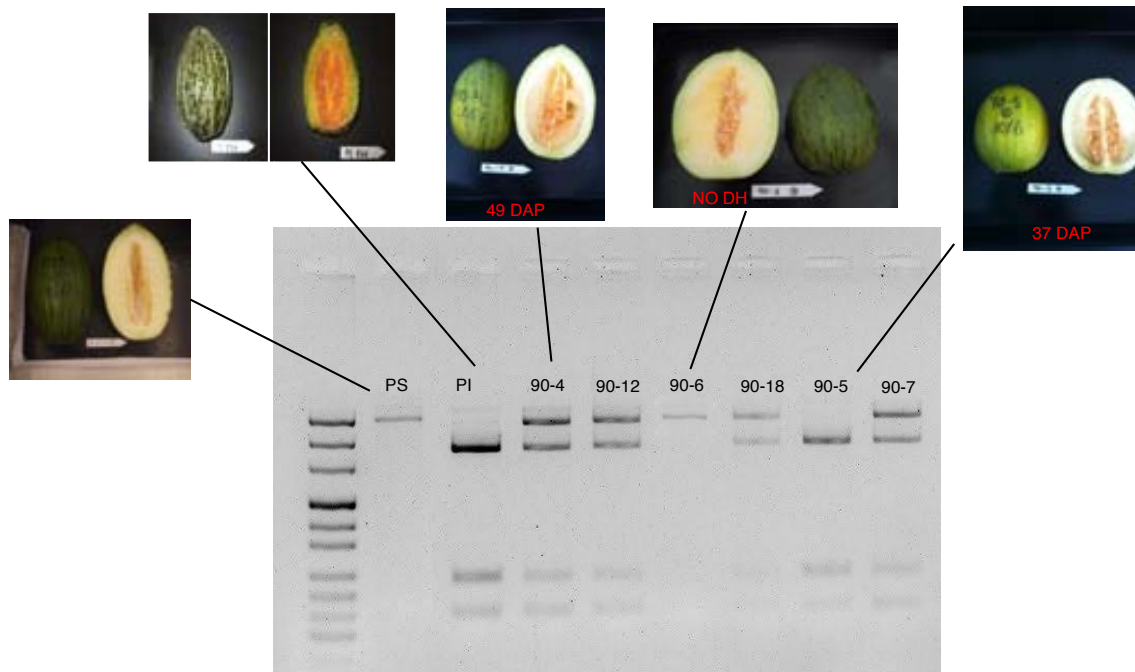


Figura 7.4. Marcador CAPS desarrollado a partir del polimorfismo detectado en el unigen cCL1154 tras la digestión del producto de PCR con la enzima *BtgZI* y genotipado en PS, SC, e individuos de la progenie de la familia 10M80-90. Además se muestran imágenes de cada uno de los parentales y de algunos individuos del estudio de progenie con los alelos en homocigosis para PS (90-6), SC (90-5) y en heterocigosis (90-4). En rojo el número de DAP para la dehiscencia del fruto. No DH: no dehiscente.

Para analizar la expresión del gen se recurrió a los datos de la micromatriz observándose que existían diferencias significativas entre las muestras climatéricas, SC3-5-1_18a y SC3-5-1_6a, y el parental PS a 35 DAP expresándose del orden de 32 veces más en el primer caso. La diferencia de expresión entre ambas líneas no llegaba a ser significativa, siendo la expresión en la primera muestra (SC3-5-1_18a) un poco menos del doble que en la segunda. Sorprendentemente detectamos expresión del gen en la muestra que sólo posee *ETHQB3.5* (SC3-5-1_6a), una posible explicación podría ser que la presencia de *ETHQB3.5* sea capaz de promover la expresión de MELO3C016536 independientemente del genotipo de *ETHQV6.3*. Como se ha comentado anteriormente, debido a la ausencia de triplicados biológicos y por tanto a la falta de un perfil temporal que estudiase la expresión a lo largo de la maduración del

fruto para la línea SC3-5-1 no podemos concluir si los resultados observados se deben efectivamente al resultado de la acción de *ETHB3.5* sobre *ETHQV6.3* o a la mala calidad de los datos, por lo que se decidió analizar la expresión en la micromatriz de MELO3C016536 en los genotipos climatéricos Dulce y Vèdrantais y los no climatéricos PS y SC a lo largo del tiempo (Figura 7.5) y estudiar la expresión del mismo en la línea SC3-5-1 mediante los datos transcriptómicos del experimento de RNA-seq. Así, se observó un aumento significativo de la expresión a lo largo del tiempo para los genotipos climatéricos que coincidía con el patrón de producción de etileno de los mismos; en el caso del PS a pesar de un ligero aumento de la expresión del mismo en torno a los 25 DAP posteriormente ésta disminuía no alcanzándose nunca los valores observados en las otras líneas. SC mostraba valores de expresión elevados similares a los de los genotipos climatéricos. Estos datos parecen sugerir un papel del gen MELO3C016536 en la maduración de tipo climatérica de los frutos. Por otra parte en el experimento de RNA-seq se detectaron diferencias de expresión significativas entre la línea climatérica SC3-5-1 y el parental no climatérico PS en frutos maduros y no maduros, observándose un aumento de la expresión del gen a lo largo del desarrollo del fruto en la línea climatérica (Apéndice A.14).

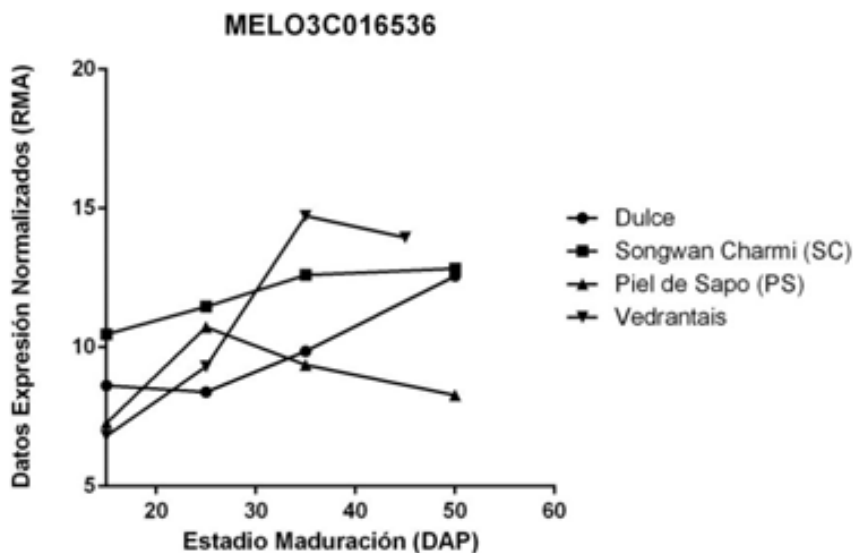


Figura 7.5. Datos medios de expresión normalizados (RMA) a distintos tiempos de maduración (15, 25, 35 DAP y punto de cosecha) para los genotipos climatéricos ("Dulce", "Vèdrantais") y no climatéricos ("Piel de Sapo", "Songwan Charmi") por triplicado obtenidos a partir de los datos transcriptómicos de la micromatriz de melón.

La familia de genes NAC que incluyen diferentes dominios (NAM, ATAF1/2 y CUC2) constituye una de las más extensas familias de factores de transcripción en plantas, representada por 105 genes en *Arabidopsis* (Ooka et al. 2003) o 140 genes en arroz (Fang et al. 2008). Nos propusimos buscar el número de miembros de esta familia en melón usando Phylome (Huerta-Cepas et al. 2011), una base de datos que incluye árboles filogenéticos de distintas familias de genes en diversas especies (phylomedb.org). Así, se identificaron 58 genes pertenecientes a la familia de los NAC en melón, un número considerablemente inferior a lo observado en otras especies. Con todos los miembros detectados se construyó un árbol filogenético; observándose que los genes MELO3C016536 y MELO3C016540 están agrupados dentro del mismo cluster (Figura 7.6).

Además llevamos a cabo un alineamiento múltiple de MELO3C016536 y MELO3C016540 con otras proteínas NAC de distintas especies y de función conocida en *Arabidopsis* (ATAF1, ATAF2, AtNAC2, AtNAP, TIP, NST1, NST2, NST3, NAC1, SLNAM, CUC1, CUC2, arroz (SNAC1), trigo (NAM-B1), judía (PvNAP), plátano (MaNAC2), *citrus* (CitNAC) y tomate (NOR) (Figura 7.7).

Los resultados mostraban que la mayoría de las proteínas NAC de función conocida podían ser clasificadas en los mismos sub grupos basándonos en las similitudes de los diferentes dominios NAC. Así, se formaban distintos grupos que coincidían con las funciones descritas: dos grupos relacionados con la senescencia o maduración del fruto, otro grupo para proteínas de respuesta a estrés biótico o abiótico, un grupo de reguladores de la formación de paredes celulares secundarias y un último involucrado en el desarrollo del meristemo apical (Figura 7.7). MELO3C016540 fue agrupada cerca del gen NOR de tomate dentro de un grupo de proteínas involucradas en procesos de senescencia en *Arabidopsis* como son las proteínas ATNAC2 y NAMB1. MELO3C016536 agrupó únicamente con una proteína relacionada con procesos de maduración del fruto descrita en plátano (Shan et al. 2012).

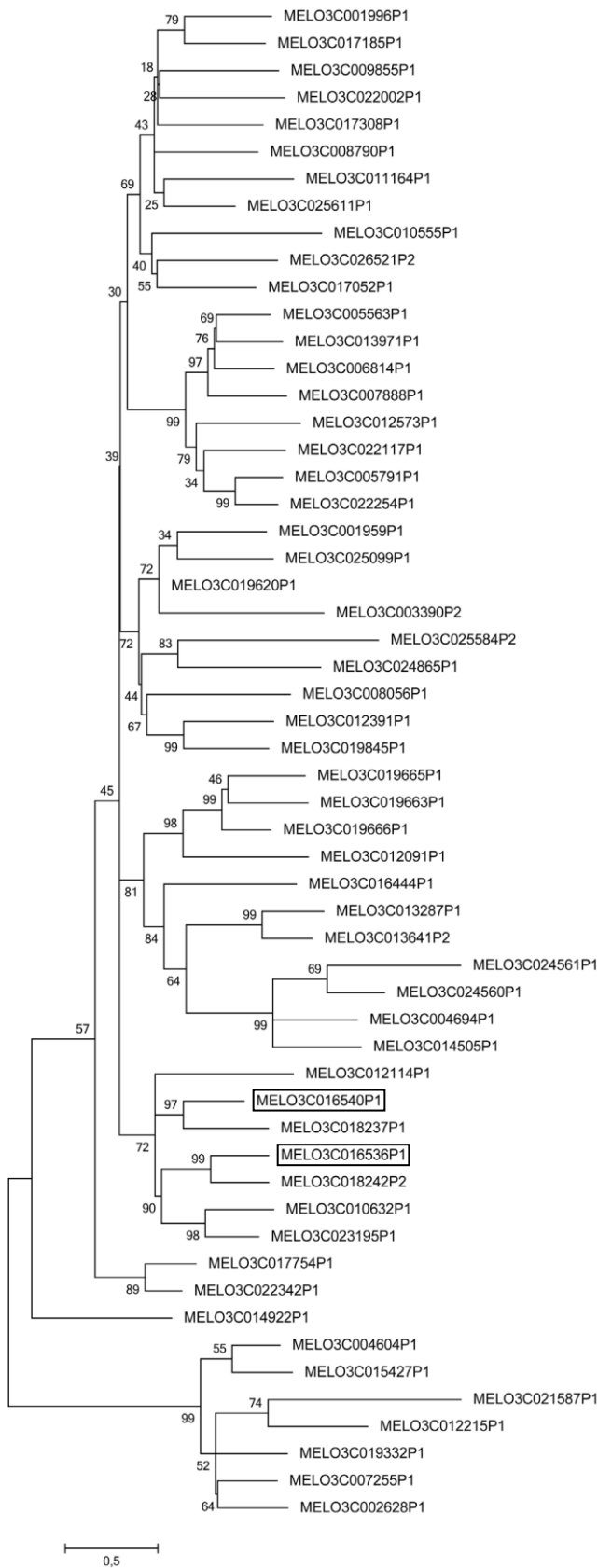


Figura 7.6. Reconstrucción filogenética de la familia de las NAM-like proteins en *Cucumis melo*. Para la construcción del árbol fueron utilizadas las secuencias proteicas completas obtenidas a partir del filoma de melón (phylomeDB.org). El árbol fue construido siguiendo el método de Maximum Likelihood con MEGA 5.0. Marcados con un recuadro las dos proteínas NAC-domain del intervalo de *ETHQV6.3*.

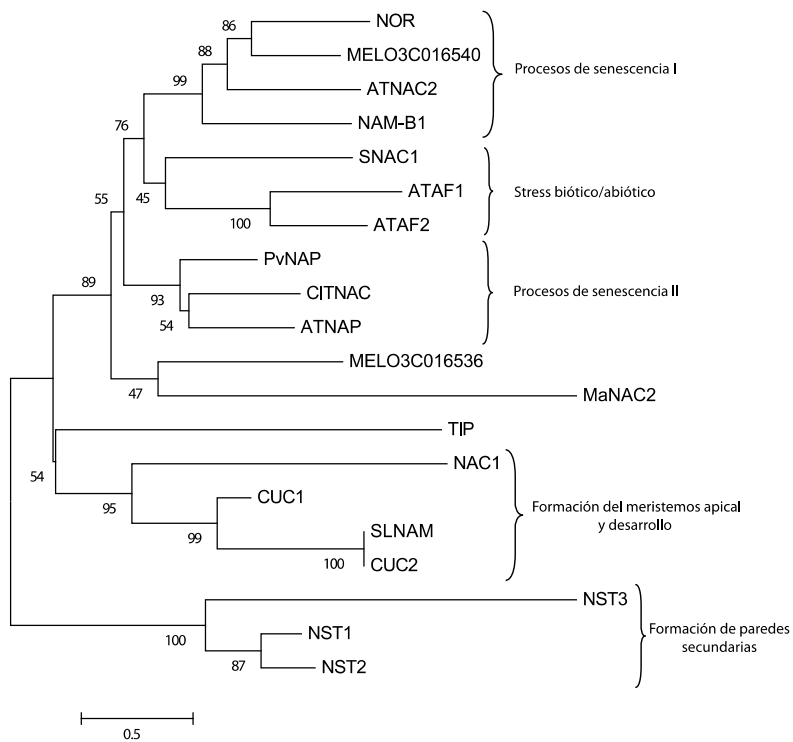


Figura 7.7. Árbol filogenético obtenido mediante neighbor-joining en MEGA 5.0 de las proteínas de melón MELO3C016536 y MELO3C016540 con otras proteínas NAC de distintas especies y de función conocida. Las secuencias de las proteínas fueron alineadas mediante CLUSTALX. El número de los nodos indica el valor para el "bootstrap" obtenido a partir de una simulación con 1000 interacciones. La definición funcional de cada subgrupo dependió de información descrita en la literatura.

7.3 DISCUSIÓN

En este capítulo hemos caracterizado un posible gen candidato (MELO3C016536) para el locus *ETHQV6.3* a partir de los genes anotados en la secuencia del genoma del melón recientemente publicada (Garcia-Mas et al. 2012). A pesar del elevado número de genes presentes en el intervalo del QTL, se decidió la caracterización de un miembro de la familia de factores de transcripción NAM por tres motivos principalmente: (1) utilizando los recombinantes originados durante el estudio de progenie de 2010-F₂ redujimos el intervalo de posibles genes candidatos y un miembro de esta familia continuaban formando parte del mismo, (2) la existencia de un miembro de esta familia que había sido clonado con éxito en tomate siendo el responsable del fenotipo no climatérico del mutante NOR que mostraba características similares al genotipo no climatérico de melón PS y (3) los datos transcriptómicos obtenidos de la micromatriz de melón en los que la expresión de MELO3C016536 era 32 veces superior en frutos de melón (35 DAP) en la línea SC3-5-1 en comparación con el parental PS.

Este gen presentaba los cinco dominios característicos de los miembros de esta familia confirmando su pertenencia a la familia de las proteínas NAC en melón. Se ha detectado una mutación en la posición 799 en el extremo carboxílico de la proteína lejos de las regiones más conservadas. Esta mutación es un cambio no conservativo entre un aminoácido pequeño polar como es la serina, que suele formar parte de los centros activos de muchas proteínas, y una prolina que es un aminoácido hidrofóbico cuya principal característica es su estructura formando un anillo pentagonal, lo que determina la posición externa que suele ocupar dentro de la proteína. Se han descrito algunos casos en los que un cambio entre estos aminoácidos implica una pérdida de función de la proteína normalmente debido a un cambio en la estructura de la misma; por ejemplo un cambio de una prolina por una serina en la posición 160 en el transportador AtCLCa provoca la pérdida de selectividad en el transporte de nitratos en *Arabidopsis* (Wege et al. 2010). Otro ejemplo sería la pérdida de la resistencia a TMV ("*Tobacco Mosaic Virus*") por un cambio de una prolina a una serina en el dominio NBS del gen de resistencia *N* en tabaco (Dinesh-Kumar et al. 2000).

El cambio nucleotídico que da lugar a la sustitución de la serina por una prolina nos ha permitido desarrollar un nuevo marcador de tipo CAPS (cCL1154) que puede ser incorporado al mapeo del locus *ETHQV6.3* mediante el uso de un mayor número de individuos recombinantes en la región. Esto nos permitiría confirmar la cosegregación observada en la familia 10M80-90, del estudio de progenie, entre el marcador cCL1154 y el fenotipo climatérico.

Hasta el momento se han descrito cuatro tipos de procesos principales en los que participan miembros de la familia de los factores de transcripción tipo NAC: (1) procesos de desarrollo de la planta como el mantenimiento del meristemo apical (Souer et al. 1996; Ooka et al. 2003; Kim et al. 2007), el desarrollo de los cotiledones (Aida et al. 1997), desarrollo de raíces laterales (Xie et al. 2000; Guo et al. 2005) o la formación de la flor (Sablowski and Meyerowitz 1998); (2) respuestas a estreses bióticos y abióticos (Selth et al. 2005; Olsen et al. 2005; Nakashima et al. 2007); (3) procesos de senescencia (Guo and Gan 2006; Uauy et al. 2006); y por último (4) la formación de paredes secundarias (Mitsuda et al. 2007; Zhong et al. 2007).

Los datos de expresión de la micromatriz muestran como MELO3C016536 se expresa en pulpa de fruto de melón y como la expresión aumenta a lo largo del desarrollo del fruto coincidiendo con el patrón de producción de etileno en las líneas climatéricas Vèdrantais y Dulce, y como en el parental no climatérico PS los valores de expresión son significativamente menores. De la misma forma se habían observado diferencias significativas entre las muestras SC3-5-1_6a y SC3-5-18a y PS a 35 DAP; siendo la expresión en las muestras climatéricas del orden de 32 veces superior. Con todos estos datos podríamos sugerir que MELO3C016536 podría estar asociado a procesos de maduración climatérica (mediada por etileno) en la línea SC3-5-1.

A partir de los datos de la secuenciación del genoma del melón se identificaron 58 miembros de la familia de las proteínas NAC en melón; un número considerablemente inferior al encontrado en otras especies como *Arabidopsis* (105) o arroz (140). Recientemente se ha identificado un nuevo miembro de la familia NAC en tomate *SINAC4* que actúa como un regulador positivo de la maduración de los frutos afectando a la síntesis del etileno y a la acumulación de carotenoides. Así la represión

de dicho gen en tomate daba lugar a una extensión de la vida media de los frutos, éstos no mostraban degradación de la clorofila y producían menos etileno debido a una menor expresión de los genes implicados en la síntesis autocatalítica de la hormona y una reducción en la acumulación de carotenoides. Además, en el mismo estudio se observó que el etileno no inducía su síntesis y se demostró, mediante un sistema de doble híbrido, la interacción de *SINAC4* con *rin* y *nor*; sugiriendo que *SINAC4* regularía tanto procesos dependientes como independientes del etileno aguas arriba de RIN (Zhu et al. 2013). El gen ortólogo de *SINAC4* en melón es el gen MELO3C010632 que no pertenece al intervalo de *ETHQV6.3*, por lo que no puede ser considerado un gen candidato para dicho locus. A pesar de ello, en el estudio de la familia de factores de transcripción NAC en melón, MELO3C010632 agrupa en el mismo cluster que MELO3C016540 y MELO3C016536 por lo que probablemente todos ellos pueden estar involucrados en el mecanismo de regulación de la maduración del fruto en melón.

Para intentar determinar la función de los miembros de la familia NAC de melón que se encontraban en la región, seleccionamos distintas proteínas NAC de función conocida pertenecientes a otras especies. De esta forma MELO3C016540 y el gen *nor* (NOR), descrito en tomate y relacionado con la maduración del fruto, agrupan junto a dos proteínas (AtNAC2 y NAM-B1) asociadas a procesos de senescencia en *Arabidopsis* y en trigo respectivamente. AtNAC2 es inducible por estrés salino, ABA, 1-aminociclopropano-1-carboxilato y ácido acético y está involucrada en procesos de senescencia además de en respuestas a estrés salino o en la formación de raíces laterales (He et al. 2005); mientras que NAM-B1, además de participar en procesos de senescencia, está relacionado con el transporte de nutrientes desde las hojas a los granos en desarrollo (Uauy et al. 2006). Este gen fue previamente caracterizado en el laboratorio sin que se observaran cambios en la secuencia tanto en la región codificante como en el promotor entre líneas no climatéricas (PS y SC) y líneas climatéricas (Dulce, Vèdrantais, SC3-5-1) (Saladié comunicación personal).

En el caso del otro miembro de la familia NAC de melón estudiado, MELO3C016536, la única proteína con la que agrupaba era un miembro de la familia de los NAC de plátano (MaNAC2) relacionada con la maduración del fruto, descrita en

un estudio en el que se aislaron seis proteínas NAC de frutos de plátano, entre las que se encontraba MaNAC2. La expresión de este gen se encuentra regulada por la acción del etileno y se ha demostrado la unión de éste a un componente clave en el mecanismo de percepción y transducción de la señal, MaEIL5 (EIN3-like), que se encuentra normalmente inactivado durante la maduración del fruto (Shan et al. 2012). Investigaciones adicionales son necesarias para demostrar que el gen MELO3C016536 es el gen responsable de la maduración climatérica en la línea SC3-5-1. Actualmente se continúa con el clonaje posicional del locus *ETHQV6.3* mediante el uso de una nueva población de mayor tamaño de 1,400 individuos originada a partir de un individuo 2008-F₂, que poseía una única introgresión del parental SC en GL VI en heterocigosis. El uso combinado de esta nueva población F₂ y de la información transcriptómica obtenida a partir del experimento de RNAseq permitirán identificar el gen responsable del locus *ETHQV6.3*; y por lo tanto comprobar el papel de MELO3C016536 en la maduración climatérica de los frutos de la línea SC3-5-1.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados en esta tesis doctoral aportan un análisis genético exhaustivo de la maduración de tipo climatérica en frutos de melón en la línea SC3-5-1 y suponen una primera aproximación al estudio de las diferencias transcriptómicas entre los dos modelos de maduración que coexisten en la especie. La combinación de ambas aproximaciones ha permitido la identificación y caracterización de un gen candidato para la producción de frutos climatéricos en la línea climatérica SC3-5-1.

En melón la maduración climatérica de los frutos lleva asociada, debido al característico pico en la producción de etileno, una serie de cambios fisiológicos como la abscisión de los frutos (Abeles 1992), el cambio de color de la piel externa de verde a amarillo y la producción de aromas característicos (Flores et al. 2002; Guis M Ben Amor M 1997) como son los compuestos de tipos éster acetato, acetaldehidos como el hexanal y algunos tipos de alcoholes (Obando et al. 2008). Por el contrario las variedades no climatéricas no muestran ninguna de las características anteriores produciendo frutos verdes, no dehiscentes y que no producen el característico aroma dulzón de las variedades climatéricas. Durante la caracterización fenotípica de la línea de introgresión SC3-5-1 se observaron todas las características de la maduración climatérica,; en claro contraste con los parentales no climatéricos PS y SC a partir de los cuales fue originada.

La maduración climatérica ha sido descrita como genéticamente dominante sobre la no climatérica; siendo la producción de etileno y la dehiscencia de los frutos controlada por los genes *Al-3* y *Al-4* en los GL VIII y IX, además de otros QTLs con efectos menores en la producción de la hormona en los GL I, II, III y XI (Périn et al. 2002). El fenotipado de una población de NILs originada a partir del cruce entre los genotipos no climatéricos PS y SC (Eduardo et al. 2007), permitió la detección de un QTL en GL III asociado a la maduración de tipo climatérico en la NIL climatérica SC3-5 (Moreno et al. 2008). Vegas et al. (2010) detectaron una segunda introgresión en el GL

VI en esta introgresión, confirmándose la presencia de QTLs implicados en maduración climatérica en ambas introgresiones: *ETHQB3.5*, en el GL III y *ETHQV6.3* en el GL VI. En trabajos anteriores se habían detectado QTLs en la misma región afectando distintas características fenotípicas relacionadas con la maduración de tipo climatérica (Cuevas et al. 2009; López-Sesé et al. 2003) que pueden deberse a efectos pleiotrópicos de *ETHQV6.3*, aunque ninguno de estos QTLs asociados a la producción de etileno cosegregaba con los loci *Al* descritos por Périn et al. (2002c), indicando la complejidad de la regulación genética de la maduración climatérica de los frutos en melón. Se ha estudiado la interacción epistática entre *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3* observándose como en aquellos individuos que poseían ambos QTLs se adelantaba la aparición del pico de etileno, produciendo una precocidad en el inicio de la maduración climatérica.

La creciente disponibilidad de genomas vegetales secuenciados, el desarrollo de nuevas herramientas genómicas y la mejora en la detección de los polimorfismos está acelerando la identificación, mediante clonaje posicional, de QTLs en distintas especies; sin embargo seguirán existiendo algunas dificultades en el clonaje de caracteres con baja heredabilidad, difícil fenotipado o que se localizan en regiones cromosómicas de baja recombinación como las zonas centroméricas de los cromosomas. Es por ello que la construcción, durante este trabajo, de un mapa genético de alta resolución de *ETHQV6.3* situado en la región centromérica del GL VI, delimitando el intervalo en el que se encuentra el QTL a una región de 2.75 Mbp dentro del *scaffold00028* del genoma de melón, supone un importante paso previo al clonaje del mismo. Posteriormente al trabajo en el que se enmarca esta tesis doctoral, a partir de un individuo de la población 2008-F₂ que poseía exclusivamente la introgresión en el GL VI en heterocigosis, se ha desarrollado una nueva población F₂ de 1,400 individuos. El uso de esta nueva población que sólo posee *ETHQV6.3* ha facilitado enormemente el fenotipado, al no estar presente el efecto de *ETHQB3.5*, pues a pesar de requerir un mayor tiempo de fenotipado de los frutos (individuos de la nueva población con *ETHQV6.3* pueden llegar a mostrar la dehiscencia a 55-60 DAP en lugar de los 35 DAP de aquellos que poseían ambos QTLs) nos permiten conocer el efecto de dicho locus sobre el fenotipo climatérico. Por el contrario, en la población 2010-F₂ algunos

recombinantes que mostraban frutos dehiscentes alrededor de 40 DAP fueron descartados del análisis al no poder distinguir entre el efecto de *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*. Tanto con la población 2010-F₂ como con la nueva población se ha requerido del análisis de la progenie de los individuos recombinantes para poder verificar el fenotipo al tratarse éste de un carácter complejo. La nueva población F₂ de 1,400 individuos ha sido genotipada obteniéndose 27 individuos recombinantes en el intervalo de *ETHQV6.3* (2.75 Mbp). Éstos individuos recombinantes han sido genotipados con nuevos SNPs que cubren el intervalo, y 14 individuos han sido seleccionados para llevar a cabo un estudio de progenie. Actualmente se están evaluando las progenies y los resultados preliminares verifican los resultados del mapeo fino de *ETHQV6.3* obtenidos en la población 2010-F₂. (Ríos comunicación personal).

A pesar del gran avance producido en el estudio de la maduración climatérica y los elementos que la componen, quedan importantes cuestiones por resolver como es el papel de otras hormonas y la interacción de éstas con el etileno para controlar distintos aspectos de la maduración o el mecanismo por el cual éste es capaz de regular la acción de un gran número de genes a distintos tiempos de una forma tan precisa. En los últimos años, debido al desarrollo de un gran número de herramientas genómicas, se ha producido un considerable avance en el estudio de esta intrincada red que regula la maduración del fruto en tomate gracias a distintos estudios transcriptómicos (Alba et al. 2005; Alba et al. 2004; Karlova et al. 2011; Osorio et al. 2011; Wang et al. 2009), proteómicos (Catalá et al. 2011; Faurobert et al. 2007; Yeats et al. 2010) y metabolómicos (Bino et al. 2005; Carrari 2006; Nashilevitz et al. 2010). Incluso en las menos estudiadas especies no climatéricas, se han llevado a cabo distintos trabajos como en naranja (Yu et al. 2012), piña (Koia et al. 2012) o en vid (Agudelo-Romero et al. 2013) para intentar determinar el papel de las distintas hormonas y establecer los desencadenantes de la maduración en las mismas.

Particularmente interesante es el estudio de la maduración en melón donde coexisten genotipos climatéricos y no climatéricos, por lo que se ha llevado a cabo el estudio de las diferencias entre ambos mecanismos en melón mediante el análisis del

transcriptoma, metaboloma y estudios de genética inversa como el TILLING o EcoTILLING en el marco del proyecto MELRIP. Durante este trabajo de Tesis, al no disponer de replicas biológicas al tener que descartar algunas muestras debido a la segregación de la línea SC3-5-1, nos hemos centrado en el estudio de la muestra climatérica SC3-5-1_16a (*ETHQB3.5* + *ETHQV6.3*), la muestra climatérica SC3-5-1_4a (*ETHQB3.5*) y el parental no climatérico PS durante el estadio maduro (35 DAP) con el objetivo de identificar una serie de genes candidatos para ambos QTLs. Además, el análisis de los datos transcriptómicos obtenidos para las variedades climatéricas Dulce y Vèdrantais, y las variedades no climatéricas PS y SC, nos ha permitido comparar y verificar los datos observados en las muestras de SC3-5-1. Así, hemos podido concluir y confirmar lo observado durante la caracterización fisiológica de la línea SC3-5-1 y sus parentales. PS no posee la capacidad ni de sintetizar ni percibir el etileno en fruto a pesar de poseer la maquinaria necesaria para ello (Saladié comunicación personal), posiblemente debido a una o varias mutaciones en algún elemento regulador de toda la ruta. La introgresión de alelos de SC para los dos QTLs (*ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*) en el fondo genético de PS permite desencadenar la respuesta climatérica de forma individual, pero especialmente cuando se encuentran presentes ambos, confirmando la interacción epistática detectada durante el estudio genético del carácter. Adicionalmente se llevó a cabo la secuenciación masiva del transcriptoma de la línea SC3-5-1 y PS a dos tiempos distintos de desarrollo, antes y después del inicio de la maduración, lo que nos ayudará a validar los resultados obtenidos en el experimento del micromatriz y, una vez analizados en profundidad, permitirá conocer los cambios que se producen entre ambos estadios y las diferencias entre los dos tipos de maduración.

El mapeo de QTLs combinado con los datos transcriptómicos obtenidos a partir de micromatrices han permitido la selección de genes candidatos en distintas especies (Baxter 2005; Di Matteo et al. 2010; Yano et al. 2012). Así, haciendo uso de los datos de la expresión de la micromatriz se encontraron para *ETHQV6.3* tres posibles genes candidatos, dos miembros de la familia NAM/NAC (MELO3C016540 y MELO3C016536) y un receptor de tipo quinasa (MELO3C016579). Mientras que MELO3C016536 se expresaba del orden de 32 veces más en la línea climatérica SC3-5-

1_18a que en PS en estadio maduro (35 DAP), las diferencias en la expresión de MELO3C016540 eran estadísticamente no significativas (<2). Al analizar la expresión de estos dos genes en las líneas climatéricas (Dulce y Vèdrantais) y no climatéricas (PS y SC) se observa como la expresión aumenta a lo largo del desarrollo del fruto exclusivamente en el caso de los genotipos climatéricos, siendo siempre mayor el incremento en MELO3C016536, lo que parece sugerir un papel predominante del mismo en la maduración de frutos climatéricos en melón.

Los principales avances en la comprensión de los mecanismos reguladores de la maduración de tipo climatérica se han producido gracias al estudio de mutantes monogénicos de tomate: “*ripening inhibitor*” (*rin*), “*non-ripening*” (*nor*), *colorless non-ripening* (*cnr*), “*Green ripe*” (*Gr*), “*green flesh*” (*gf*), “*high pigment*” (*hp1*), “*high pigment 2*” (*hp2*) y “*never ripe*” (*Nr*); (Barry et al. 2008; Lanahan et al. 1994; Liu et al. 2004; Manning et al. 2006; Mustilli 1999; Vrebalov et al. 2002). Los mutantes *ripening-inhibitor* (*rin*), *non-ripening* (*nor*) y *Colorless non-ripening* (*Cnr*) desarrollan frutos incapaces de madurar incluso tras ser tratados con etileno. Estos mutantes comparten una serie de características, como la ausencia de producción de etileno e incremento de la respiración climatérica, produciendo frutos verdes y firmes (Giovannoni 2004; Manning et al. 2006; Vrebalov et al. 2002); muy similares a los que muestran los frutos de la línea PS. Los genes afectados *RIN*, *NOR* y *CNR* promueven maduración en el fruto a través de una ruta reguladora que actúa aguas arriba de la biosíntesis y señalización del etileno. El mutante *rin* codifica para una proteína MAD-box perteneciente al grupo SEPALLATA (*SEP4*); (Hileman 2006) que contiene una delección parcial, mientras que *Cnr* es debido a un cambio epigenético que resulta en una hipermetilación del promotor del gen SPB-box (“*SQUAMOSA promoter binding protein*”). *NOR* es un miembro de la familia de factores de transcripción NAM/NAC, como los genes candidatos MELO3C016540 y MELO3C016536. Un reciente estudio en el que se combinaban los datos proteómicos, transcriptómicos y metabolómicos de los mutantes *rin* y *nor* durante el desarrollo y la maduración de los frutos (Osorio et al. 2011) ha permitido identificar nuevos genes regulados por etileno, confirmando la hipótesis anterior que indicaba que *RIN* y *NOR* actúan de forma conjunta y en cascada en la regulación de la maduración climatérica en tomate (Giovannoni et al. 1995;

Thompson et al. 1999). Además, en el mismo estudio se observaba como *NOR* tenía un efecto más amplio en genes dependientes e independientes de etileno expresados durante la maduración de los frutos lo que sugiere que éste actuaría aguas arriba de *RIN*.

Finalmente, teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, se seleccionó dentro del conjunto de genes candidatos el gen MELO3C016536 para su caracterización. El probable gen ortólogo en melón (MELO3C016540) al gen *NOR* de tomate había sido previamente caracterizado en nuestro departamento sin que se observasen diferencias significativas a nivel de secuencia entre un conjunto de genotipos climatéricos (Dulce, Vèdrantais, SC3-5-1) y no climatéricos (PS y SC) en la región codificante del gen (Saladié, comunicación personal). No obstante, en un trabajo realizado en una colección TILLING de mutantes originada a partir de la línea monoica climatérica CharMono y tras el cribado de 3,306 individuos se obtuvieron 9 mutantes para el gen MELO3C016540 (*CmNOR*) (Dahmani-Mardas et al. 2010), y resultados preliminares sugieren que uno de ellos presenta una ligera extensión de la vida media postcosecha de los frutos que posiblemente sea debida a una menor producción de etileno y por tanto a cambios en el proceso de maduración (Dahmani comunicación personal). Algunas proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción NAM/NAC forman homo o heterodimeros para llevar a cabo su función. Así, se ha observado en *Arabidopsis* que NAC1 y ANAC019 forman homodimeros involucrados en la señalización por auxinas promoviendo la formación de raíces laterales (Olsen et al. 2005; Xie 2000), o en el caso de *Brassica*, BNAC14 forma heterodimeros con BnNAC3, BnNAC5-8, BnNAC5-11 y BnNAC485 en mecanismos de respuesta a estrés abiótico (Hegedus et al. 2003). Más recientemente en arroz se ha cribado mediante el sistema de doble híbrido una colección de cDNAs utilizando OsNAC5 como sonda y se han identificado distintos interactores, incluyéndose él mismo, demostrando la capacidad de dimerización de dichas proteínas; en el mismo estudio mediante el uso de diferentes construcciones a partir de OsNAC que presentaban una serie de deleciones se ha podido identificar los dominios involucrados en la formación de homo o heterodimeros (Jeong et al. 2009). En tomate además del gen *NOR* se ha identificado otro miembro perteneciente a la misma familia involucrado en la maduración

climatérica de los frutos pese a que se desconoce si éstos forman heterodímeros o no (Giovannoni comunicación personal). Tampoco podríamos descartar por tanto una interacción entre los genes MELO3C016536 y MELO3C016540, que podría ser estudiada mediante un sistema de doble híbrido si se confirmase que MELO3C016536 corresponde efectivamente a *ETHQV6.3*.

En el estudio de la función de MELO3C016540 y MELO3C016536 mediante su estudio filogenético con distintas proteínas NAC de función conocida pertenecientes a otras especies, MELO3C016540 y su ortólogo en tomate (NOR) agrupan junto a dos proteínas (*AtNAC2* y *NAM-B1*) asociadas a procesos de senescencia en *Arabidopsis* (He et al. 2005) y en trigo (Uauy et al. 2006), respectivamente. MELO3C016536 agrupa exclusivamente con *MaNAC2*, que es una proteína involucrada en la maduración del fruto en plátanos. (Shan et al. 2012). En ambos casos dicha comparación sugiere que tanto el ortólogo del gen *nor* de tomate MELO3C016540 como MELO3C016536 podrían estar involucrados en procesos de maduración de frutos de melón.

Para profundizar en el origen y función de esta familia de factores de transcripción en melón primero identificamos 58 miembros, a partir de los datos de la secuencia del genoma del melón, para la construcción de un árbol filogenético. Las proteínas MELO3C016536 y los ortólogos en melón de los genes *nor* (MELO3C016540) y *SINAC4* (MELO3C016532) de tomate están agrupados dentro del mismo cluster por lo que podrían desempeñar funciones similares relacionadas con la maduración de los frutos.

En la caracterización de MELO3C016536 se ha identificado un único polimorfismo tipo SNP en la región codificante del gen que da lugar a un cambio aminoacídico en la secuencia de la proteína, una serina en el parental PS se convierte en prolina en la línea SC3-5-1. Tan sólo experimentos de complementación transitoria y/o estable o la identificación de mutantes mediante TILLING podrán confirmar si la presencia de la serina en PS es la responsable del fenotipo no climatérico observado en el mismo.

9. CONCLUSIONES

Los principales resultados obtenidos durante en esta Tesis Doctoral nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha detectado un nuevo QTL (*ETHQV6.3*) involucrado en la maduración climatérica de los frutos en la línea SC3-5-1, además del QTL *ETHQB3.5* que había sido descrito anteriormente en la misma línea. La línea SC3-5-1 produce frutos que maduran de forma climatérica, a pesar de que las líneas parentales de SC3-5-1, SC y PS, producen frutos de maduración no climatérica.
2. Se ha demostrado la interacción epistática entre *ETHQB3.5* y *ETHQV6.3*, que resulta en la precocidad de los frutos reduciéndose el tiempo necesario para la producción de frutos maduros respecto a ambos QTLs por separado.
3. Se ha elaborado un mapa genético de baja resolución de la región del locus *ETHQV6.3* usando una población F₂ de 152 individuos (2008-F₂), localizando a éste en una región de 8.8 cM entre los marcadores CMBR002 y CMN61_14.
4. Se ha construido un mapa de alta resolución en la región de *ETHQV6.3* usando una población F₂ de 967 individuos (2010-F₂), localizando el locus entre los marcadores AI_03-B03 y FR14-P22. El uso de individuos de progenie F₃ ha permitido reducir el intervalo a una región de 2.8 Mbps del scaffold00028 entre los marcadores AP2/ERF y FR14-P22.
5. Se ha llevado a cabo un estudio transcriptómico de la maduración del fruto en la línea SC3-5-1 y su parental PS a 35 DAP. A pesar de que la línea SC3-5-1 segregaba para *ETHQV6.3*, un análisis de algunas muestras individuales ha permitido la selección de un gen candidato perteneciente a la familia de los factores de transcripción NAM/NAC (MELO3C016536) diferencialmente expresado, que mapea en el intervalo del QTL.
6. Se ha preparado un experimento para el estudio transcriptómico mediante RNAseq de la línea SC-3-5-1 y su parental PS antes y después del inicio de la maduración. Datos de análisis posteriores a este trabajo de tesis han permitido

validar algunos de los datos transcriptómicos obtenidos con la micromatriz de melón.

7. Se ha caracterizado la secuencia del gen de la MELO3C016536 y se ha identificado una mutación que produce un cambio aminoacídico en la secuencia de la proteína, una serina en el parental PS se convierte en prolina en la línea SC3-5-1.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abeles (1992)** Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, et al. (1991)** Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252:1651–6.
- Adams-Phillips L, Barry C, Kannan P, et al. (2004)** Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. *Plant Molecular Biology* 54:387–404.
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. (1997)** Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant cell* 9:841–57.
- Agudelo-Romero P, Bortolotti C, Pais MS, et al. (2013)** Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiology et Biochemistry* 67:105–119.
- Akashi Y, Fukuda N, Wako T, Kato MMK (2002)** Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melons, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes. *Euphytica* 125:385–396.
- Alba R, Fei Z, Payton P, et al. (2004)** ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *The Plant Journal* 39:697–714.
- Alba R, Payton P, Fei Z, et al. (2005)** Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell* 17:2954–2965.
- Alonso-Blanco, C., & Koornneef, M. (2000).** Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science*, 5(1), 22–9.
- Anders S, Huber W (2010)** Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11:R106.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991)** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:208–218.
- Ayub R, Guis M, Ben Amor M, et al. (1996)** Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology* 14:862–6.
- Balagué C, Watson CF, Turner AJ, et al. (1993)** Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS* 212:27–34.
- Barreto GPM, Barreto GP., Fabi J., et al. (2011)** Influence of ethylene on carotenoid biosynthesis during papaya postharvesting ripening. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:620 – 624.
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, et al. (1996)** Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal* 9:525–35.
- Barry CS, McQuinn RP, Chung M-Y, et al. (2008)** Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. *Plant Physiology* 147:179–87.
- Baudracco-Arnas S, Pitrat M (1996)** A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93:57–64.
- Baxter CJ (2005)** Comparison of changes in fruit gene expression in tomato introgression lines provides evidence of genome-wide transcriptional changes and reveals links to mapped QTLs and described traits. *Journal of Experimental Botany* 56:1591–1604.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000)** Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant cell* 12:1103–15.

- Beaulie JC, Lea JM (2003)** Aroma volatile differences in commercial orange-fleshed Cantaloupes, the inbred parental lines and stored fresh-cuts. In: XXVI International Horticultural Congress on Issues and Advances in Postharvest Horticulture 628:809-815.
- Ben-Amor M, Flores B, Latché A, et al. (1999)** Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. *Plant, Cell & Environment* 22:1579–1586.
- Benson G (1999)** Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27:573–580.
- Bino RJ, De Vos CHR, Lieberman M, et al. (2005)** The light-hyperresponsive high pigment-2dg mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytologist* 166:427–438.
- Birnboim HC, Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513–23.
- Blanca JM, Cañizares J, Ziarsolo P, et al. (2011)** Melon transcriptome characterization: Simple Sequence Repeats and Single Nucleotide Polymorphisms discovery for high throughput genotyping across the species. *The Plant Genome Journal* 4:118-131.
- Blanca J, Esteras C, Ziarsolo P, et al. (2012)** Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. *BMC Genomics* 13:280. doi: 10.1186/1471-2164-13-280
- Borevitz JO (2003)** Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome research* 13:513–523.
- Boualem A, Fergany M, Fernandez R, et al. (2008)** A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* 321:836–838.
- Boualem A, Troadec C, Kovalski I, et al. (2009)** A conserved ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in two *Cucumis* species. *PLoS One* 4:e6144.
- Brotman Y, Kovalski I, Dogimont C, et al. (2005)** Molecular markers linked to papaya ring spot virus resistance and Fusarium race 2 resistance in melon. *Theoretical and Applied Genetics* 110:337–45.
- Brotman Y, Silberstein L, Kovalski I, et al. (2002)** Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1055–1063.
- Byers RE, Baker LR, Sell HM, et al. (1972)** Ethylene: A natural regulator of sex expression of *Cucumis melo* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69:717–720.
- Bortiri E, Jackson D, Hake S (2006)** Advances in maize genomics: the emergence of positional cloning. *Current Opinion in Plant Biology* 9:164–171.
- Byrne PF, McMullen MD, Snook ME, et al. (1996)** Quantitative trait loci and metabolic pathways: genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:8820–5.
- Carrari F (2006)** Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57:1883–1897.
- Castillejo C, de la Fuente JI, Iannetta P, et al. (2004)** Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany* 55:909–18.
- Catalá C, Howe KJ, Hucko S, et al. (2011)** Towards characterization of the glycoproteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit using Concanavalin A lectin affinity chromatography and LC-MALDI-MS/MS analysis. *Proteomics* 11:1530–1544.
- Chen JF, Staub JE, Jiang J (1998)** Reevaluation of karyotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: *Genetic Resources and Crop Evolution*, Volume 45, Number 4 - SpringerLink.

- Chen Y-F, Shakeel SN, Bowers J, et al. (2007)** Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282:24752–8.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan J-P, et al. (2004)** Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science* 167:1301–1305.
- Chiriboga M-A, Schotsmans WC, Larrigaudière C, et al. (2011)** How to prevent ripening blockage in 1-MCP-treated “Conference” pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91:1781–8.
- Chung M-Y, Vrebalov J, Alba R, et al. (2011)** A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SIAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *The Plant Journal* 64:936–947.
- Clayberg C (1992)** Interaction and linkage test of flesh color genes in *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genet Coop Rep* 15:53.
- Clepet C, Joobeur T, Zheng Y, et al. (2011)** Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC genomics* 12:252.
- Corbacho J, Romojaro F, Pech JC, et al. (2013)**. Transcriptomic events involved in melon mature-fruit abscission comprise the sequential induction of cell-wall degrading genes coupled to a stimulation of endo and exocytosis. *PLoS One*, 8(3).
- Collard B, Jahufer M, Brouwer J, Pang E (2005)** An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.
- Craig Chinault A, Carbon J (1979)** Overlap hybridization screening: Isolation and characterization of overlapping DNA fragments surrounding the leu2 gene on yeast chromosome III. *Gene* 5:111–126.
- Cuevas HE, Staub JE, Simon PW, et al. (2008)** Mapping of genetic loci that regulate quantity of beta-carotene in fruit of US Western Shipping melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 117:1345–59.
- Cuevas HE, Staub JE, Simon PW, Zalapa JE (2009)** A consensus linkage map identifies genomic regions controlling fruit maturity and beta-carotene-associated flesh color in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 119:741–56.
- Dahmani-Mardas F, Troadec C, Boualem A, et al. (2010)** Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PLoS One* 5:15776.
- Dai N, Cohen S, Portnoy V, et al. (2011)** Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant Mol Biol* 76:1–18.
- Danin-Poleg Y, Reis N, Baudracco-Arnas S, et al. (2000)** Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging. *Genome* 43:963–974.
- Danin-Poleg Y, Reis N, Tzuri G, Katzir N (2001)** Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theoretical and applied genetics* 102:61–72.
- Danin-Poleg Y, Tadmor Y, Tzuri G, et al. (2002)** Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. *Euphytica* 125:373–384.
- Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, et al. (2005)** Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology* 23:890–5.
- Deleu W, Esteras C, Roig C, et al. (2009)** A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. *BMC Plant Biology* 9:90.
- Diaz A, Fergany M, Formisano G, et al. (2011)** A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology* 11:111.
- Di Matteo A, Sacco A, Anacleria M, et al. (2010)** The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology* 10:163.

- Dinesh-Kumar SP, Tham WH, Baker BJ (2000)** Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:14789–94.
- Dinka SJ, Campbell M, Demers T, et al. (2007).** Predicting the size of the progeny mapping population required to positionally clone a gene. *Genetics*, 176(4): 2035–54.
- Doerge RW (2002)** Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature reviews Genetics* 3:43–52.
- Doganlar S, Tanksley SD, Mutschler MA (2000)** Identification and molecular mapping of loci controlling fruit ripening time in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 100:249–255.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Dos-Santos N, Jiménez-Araujo A, Rodríguez-Arcos R, Fernández-Trujillo JP (2011)** Cell wall polysaccharides of Near-Isogenic Lines of melon (*Cucumis melo* L.) and their inbred parents which show differential flesh firmness or physiological behavior. *Journal of agricultural and food chemistry* 59:7773–7784.
- Eduardo I, Arus P, Monforte AJ (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* 112:139–148.
- Eduardo I, Arus P, Monforte AJ, et al. (2007)** Estimating the genetic architecture of fruit quality traits in melon using a genomic library of near isogenic lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132:80–89.
- El-Sharkawy I, Manríquez D, Flores FB, et al. (2005)** Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol Biol* 59:345–362.
- Eriksson EM, Bovy A, Manning K, et al. (2004)** Effect of the Colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiology* 136:4184–97.
- Eshed Y, Zamir D (1995)** An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141:1147–62.
- Essafi A, Diaz-Pendon JA, Moriones E, et al. (2009)** Dissection of the oligogenic resistance to Cucumber mosaic virus in the melon accession PI 161375. *Theoretical and Applied Genetics* 118:275–284.
- Esteras C. (2012)** Desarrollo y aplicación de herramientas genómicas para la mejora de especies cucurbitáceas por calidad y resistencia a enfermedades. *Universidad Politécnica de Valencia* 100-102.
- Esteras C, Formisano G, Roig C, et al. (2013)** SNP genotyping in melons: genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theoretical Applied Genetics* 5:1285-1303.
- Ezura, Fukino N (2009)** Research tools for functional genomics in melon (*Cucumis melo* L.): Current status and prospects. *Plant Biotechnology* 26:359–368.
- Ezura, Owino (2008)** Melon ripening and ethylene. *Plant Science* 175:121–129.
- Fang L, Yong X, Yue Z, et al. (2009)** Construction of permanent genetic map and comparative analysis of Xinjiang Hami melon [*Cucumis melo* L. ssp. *melo* convar. *ameri* (Pang.) Greb.]. *Acta Horticulturae Sinica* 36:1767–1774.
- Fang Y, You J, Xie K, et al. (2008)** Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 280:547–63.
- Faurobert M, Mihr C, Bertin N, et al. (2007)** Major proteome Variations Associated with Cherry Tomato Pericarp Development and Ripening. *Plant Physiology* 143:1327–1346.
- Fernandez-Silva I, Eduardo I, Blanca J, et al. (2008a)** Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118:139–150.
- Fernandez-Silva I, Moreno E, Eduardo I, et al. (2008b)** On the genetic control of heterosis for fruit shape in melon (*Cucumis Melo* L.). *Journal of Heredability*.

- Fernandez-Silva I, Moreno E, Essafi A, et al. (2010)** Shaping melons: agronomic and genetic characterization of QTLs that modify melon fruit morphology. *Theoretical and applied genetics* 121:931–40.
- Fernández-Trujillo JP, Obando J, Martínez JA, et al. (2007)** Mapping fruit susceptibility to postharvest physiological disorders and decay using a collection of near-isogenic lines of melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132:739–748.
- Flores F, El Yahyaoui F, de Billerbeck G, et al. (2002)** Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *Journal of Experimental Botany*.
- Foolad MR (2007)** Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics* 2007:1–52.
- Fridman, E., Pleban, T., & Zamir, D. (2000).** A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4718–23. **Fujita H, Syono K (1996)** Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 37:1094–101.
- Fujisawa M, Shima Y, Higuchi N, et al. (2012)** Direct targets of the tomato-ripening regulator RIN identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses. *Planta* 235:1107–1122.
- Fukino N, Sakata Y, Kunihiya M, S M (2007)** Characterisation of novel simple sequence repeat (SSR) markers for melon (*Cucumis melo* L.) and their use for genotype identification. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 82:330–334.
- Fukino N, Ohara T, Monforte AJ, et al. (2008)** Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118:165–175.
- Garcia-Mas J, Oliver M, Gómez-Paniagua H, de Vicente MCC (2000)** Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theoretical and Applied Genetics* 101:860–864.
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, et al. (2012)** The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1205415109–.
- García-Gago JA, Posé S, Muñoz-Blanco J, et al. (2009)** The polygalacturonase FaPG1 gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signaling & Behavior* 4:766–8.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. (2004)** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5:R80.
- Ghassemian M (2000)** Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12:1117–1126.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993)** Fruits: A developmental perspective. *The Plant Cell* 5:1439–1451.
- Giovannoni JJ, Noensi EN, Ruezinsky D, et al. (1995)** Molecular genetic analysis of the ripening inhibitor and non-ripening loci of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol Genet Genomics* 195–206.
- Giovannoni JJ (2004)** Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell* 16:170–180.
- Giovannoni JJ (2007)** Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* 10:283–289.
- Given NK, Venis MA, Gierson D (1988)** Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* 174:402–406.
- Gómez G, Torres H, Pallás V (2005)** Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *The Plant Journal* 41:107–16.

- Gonzalez M, Xu M, Esteras C, et al. (2011)** Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de sapo melons. *BMC Research Notes* 4:289.
- Gonzalez-Ibeas D, Blanca J, Roig C, et al. (2007)** MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC Genomics* 8:306.
- Gonzalez-Ibeas D, Cañizares J, Aranda MA (2012)** Microarray analysis shows that recessive resistance to Watermelon mosaic virus in melon is associated with the induction of defense response genes. *Mol Plant Microbe Interact* 25:107–118.
- Gonzalo MJ, Claveria E, Monforte AJ, Dolcet-Sanjuan R (2011)** Parthenogenic haploids in melon: generation and molecular characterization of a Doubled Haploid Line population. *Journal of American Society for Horticultural Science* 136:145–154.
- Gonzalo MJ, Oliver M, Garcia-Mas J, et al. (2005)** Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 110:802–811.
- González VM, Garcia-Mas J, Arús P, Puigdomènech P (2010)** Generation of a BAC-based physical map of the melon genome. *BMC Genomics* 11:339.
- Guis M Ben Amor M, Ayub R, Bouzayen M, Pech JC, Latché A BR (1997)** Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *Journal of American Society for Horticultural Science* 122:748–751.
- Guo H, Ecker JR (2004)** The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7:40–49.
- Guo H-S, Xie Q, Fei J-F, Chua N-H (2005)** MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. *The Plant Cell* 17:1376–86.
- Guo Y, Gan S (2006)** AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* 46:601–12.
- Harding A-H, Wareham NJ, Bingham SA, et al. (2008)** Plasma vitamin C level, fruit and vegetable consumption, and the risk of new-onset type 2 diabetes mellitus: the European prospective investigation of cancer--Norfolk prospective study. *Arch Intern Med* 168:1493–1499.
- Harel-Beja R, Tzuri G, Portnoy V, et al. (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* 121:511–533.
- Haritatos E, Keller F, Turgeon R (1996)** Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: implications for phloem loading. *Planta* 198:614–622.
- Hazen SP, Pathan MS, Sanchez A, et al. (2005)** Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional & Integrative Genomics* 5:104–16.
- He X-J, Mu R-L, Cao W-H, et al. (2005)** AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal* 44:903–16.
- Hegedus D, Yu M, Baldwin D, et al. (2003)** Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant molecular biology* 53:383–397.
- Hileman LC (2006)** Molecular and Phylogenetic Analyses of the MADS-Box gene family in tomato. *Molecular biology and evolution* 23:2245–2258.
- Hirayama T, Alonso JM (2000)** Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant and Cell Physiology* 41:548–555.
- Hu H, Dai M, Yao J, et al. (2006)** Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:12987–12992.
- Hua J, Meyerowitz EM (1998)** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94:261–271.

- Huerta-Cepas J, Capella-Gutierrez S, Pryszcz LP, et al. (2011)** PhylomeDB v3.0: an expanding repository of genome-wide collections of trees, alignments and phylogeny-based orthology and paralogy predictions. *Nucleic Acids Research* 39:D556–60.
- Hugues M (1948)** The inheritance of two character of *Cucumis melo* and their interrelationship. *Proceedings in American Society for Horticultural Science* 52:399-402.
- Imam M, Abo-Bakr M, Hanna H (1972)** Inheritance of some economic characters in crosses between sweet melon and snake cucumber. Inheritance of qualitative characters. *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 3:363-380.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. (2003)** Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4:249–64.
- Ishiki Y, Oda A, Yaegashi Y, et al. (2000)** Cloning of an auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (CMe-ACS2) from melon and the expression of ACS genes in etiolated melon seedlings and melon fruits. *Plant Science* 159:173–181.
- Itkin M, Seybold H, Breitel D, et al. (2009)** TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *The Plant Journal* 60:1081–95.
- Ito T, Seki M, Hayashida N, et al. (1999)** Regional insertional mutagenesis of genes on *Arabidopsis thaliana* chromosome V using the Ac/Ds transposon in combination with a cDNA scanning method. *The Plant Journal* 17:433–44.
- Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt EE, et al. (1999)** Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated *Citrus* fruit and its regulation during development. *The Plant Journal* 20:653–61.
- Jander G (2002)** *Arabidopsis* Map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiology* 129:440–450.
- Jeffrey C (1980)** A review of the Cucurbitaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 81:233–247.
- Jeffrey C (1990)** Systematics of the Cucurbitaceae: An overview. *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Cornell Univ Press, Ithaca, NY, USA 2-9.
- Jeong JS, Park YT, Jung H, et al. (2009)** Rice NAC proteins act as homodimers and heterodimers. *Plant Biotechnol Rep* 3:127–134.
- Jia H-F, Chai Y-M, Li C-L, et al. (2011)** Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* 157:188–99.
- Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, et al. (2004)** The Fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *The Plant Journal* 39:283–97.
- Kao CH, Zeng ZB, Teasdale RD (1999)** Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152:1203–16.
- Karlova R, Rosin FM, Busscher-Lange J, et al. (2011)** Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *The Plant Cell* 23:923–941.
- Katz E, Lagunes PM, Riov J, et al. (2004)** Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric *Citrus* fruit. *Planta* 219:243–52.
- Katzir N, Daning-Poleg Y, Tzuri G, et al. (1996)** Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1282–1290.
- Kerje T, Grum M (2000)** The Origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. *Acta Horticulturae* 510:37-44
- Kevany BM, Tieman DM, Taylor MG, et al. (2007)** Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal* 51:458–67.

- Kikuchi S, Taketa S, Ichii M, Kawasaki S (2003)** Efficient fine mapping of the naked caryopsis gene (nud) by HEGS (High Efficiency Genome Scanning)/AFLP in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 108:73–78.
- Kim CY, Liu L, Kim J-Y (2007)** Signaling network for stem cell maintenance and functioning in Arabidopsis shoot apical meristem. *Journal of Plant Biology* 50:274–281.
- Kirkbride JH (1993)** Biosystematic Monograph of the Genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): Botanical Identification of Cucumbers and Melons. US Department of Agriculture. Parkway Publishers 159.
- Klee H, Tieman D (2002)** The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum* 115:336–341.
- Klee HJ, Giovannoni JJ (2011)** Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics* 45:41–59.
- Koia JH, Moyle RL, Botella JR (2012)** Microarray analysis of gene expression profiles in ripening pineapple fruits. *BMC Plant Biology* 12:240.
- Konieczny A, Ausubel FM (1993)** A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers *The Plant Journal* 4:403–10.
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1994)** The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant Cell* 6:521–30.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, et al. (1987)** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174–181.
- Lander ES, Botstein D (1989)** Mapping mendelian factors underlying Quantitative Traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185–199.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. (2007)** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–8.
- Lasserre E, Bouquin T, Hernandez JA, et al. (1996)** Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular and General Genetics* 251:81–90.
- Lee JM, Joung J-G, McQuinn R, et al. (2011)** Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals the ethylene response factor SIERF6 to play an important role in ripening and carotenoid accumulation. *The Plant Journal* 70:191–204.
- Lelievre J-M, Latche A, Jones B, et al. (1997)** Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 101:727–739.
- Lin X, Kaul S, Rounsley S, et al. (1999)** Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402:761–768.
- Lin Z, Hong Y, Yin M, et al. (2008)** A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *The Plant Journal* 55:301–10.
- Liou P, Chang Y, Hsu W, et al. (1998)** Construction of a linkage map in *Cucumis melo* (L.) using random amplified polymorphic DNA markers. *Acta Horticulturae* 461:123–132.
- Liu BH (1998)** *Statistical Genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press, Boca Raton.
- Liu Y, Roof S, Ye Z, et al. (2004)** Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:9897–9902.
- Liu Y-Z, Baig MNR, Fan R, et al. (2009)** Identification and expression pattern of a novel NAM, ATAF, and CUC-Like gene from *Citrus sinensis* Osbeck. *Plant Molecular Biology Reporter* 27:292–297.
- Lohse M, Nunes-Nesi A, Kruger P, et al. (2010)** Robin: An Intuitive Wizard Application for R-Based Expression Microarray Quality Assessment and Analysis. *Plant Physiology* 153:642–651.

- Lopez-Sese, A. I., Staub, J. E., & Gomez-Guillamon, M. L. (2003).** Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(1), 41–52.
- Luan F, Delannay I, Staub JE (2008)** Chinese melon (*Cucumis melo* L.) diversity analyses provide strategies for germplasm curation, genetic improvement, and evidentiary support of domestication patterns. *Euphytica* 164:445–461.
- Luciano M, Batty GD, McGilchrist M, et al. (2010)** Shared genetic aetiology between cognitive ability and cardiovascular disease risk factors: Generation Scotland's Scottish family health study. *Intelligence* 38:304–313.
- Luo M, Wang YH, Frisch D, et al. (2001)** Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (Fom-2). *Genome* 44:154–62.
- Magwene PM, Willis JH, Kelly JK (2011)** The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. *PLoS Computational Biology* 7:e1002255.
- Makarevitch I, Thompson A, Muehlbauer GJ, Springer NM (2012)** Brd1 gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase. *PloS One* 7:e30798.
- Manning K (1998)** Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* 205:622–31.
- Manning K, Tor M, Poole M, et al. (2006)** A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38:948–952.
- Manríquez D, El-Sharkawy I, Flores FB, et al. (2006)** Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant Molecular Biology* 61:675–685.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. (2005)** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376–80.
- Martin A, Troadec C, Boualem A, et al. (2009)** A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* 461:1135–8.
- Mascarell-Creus A, Cañizares J, Vilarrasa-Blasi J, et al. (2009)** An oligo-based microarray offers novel transcriptomic approaches for the analysis of pathogen resistance and fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genomics* 10:467.
- Matsumura H, Liu B, Abe J, Takahashi R (2008)** AFLP Mapping of Soybean Maturity Gene E4. *Journal of Heredity* 99:193–197.
- McMurchie EJ, McGlasson WB, Eaks IL (1972)** Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237:235–236.
- Mewis I, Appel HM, Hom A, et al. (2005)** Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology* 138:1149–62.
- Michelmore RW, Paran I, & Kesseli RV. (1991).** Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(21), 9828–9832.
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, et al. (1998)** The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant cell* 10:1307–1319.
- Mirmiran P, Noori N, Zavareh MB, Azizi F (2009)** Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease. *Metabolism* 58:460–468.

- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, et al. (2007)** NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell* 19:270–80.
- Mizuno S, Hirasawa Y, Sonoda M, et al. (2006)** Isolation and characterization of three DREB/ERF-type transcription factors from melon (*Cucumis melo*). *Plant Science* 170:1156–1163.
- Mliki A, Jack E Staub, Zhangyong S, Ghorbel A (2001)** Genetic diversity in melon (*Cucumis melo* L.): An evaluation of African germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48:587–597.
- Monforte AJ, Garcia-Mas J, Arus P (2003)** Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding* 153–157.
- Monforte AJ, Oliver M, Gonzalo MJ, et al. (2004)** Identification of quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108:750–758.
- Moore S, Vrebalov J, Payton P, Giovannoni J (2002)** Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *Journal of Experimental Botany* 53:2023–30.
- Morales M, Orjeda G, Nieto C, et al. (2004)** Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1017–1034.
- Morales M, Orjeda G, Nieto C, et al. (2005)** A physical map covering the nsv locus that confers resistance to melon necrotic spot virus in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical Applied Genetics* 111:914–922.
- Moreno E, Obando JM, Dos-Santos N, et al. (2007)** Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theoretical and Applied Genetics* 116:589–602.
- Mustilli AC (1999)** Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. *The Plant Cell* 11:145–158.
- Nakashima K, Tran L-SP, Van Nguyen D, et al. (2007)** Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51:617–30.
- Naudin CV (1859)** Essais d'une monographie des especes et des variétés du genre *Cucumis*. - *Ann. Sci. Nat. Bot.* sr. 4, 11: 5-87.
- Nelson JC (1997)** QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding* 3:239–245.
- Neuhausen SL (1992)** Evaluation of restriction fragment length polymorphism in *Cucumis melo*. *Theoretical and Applied Genetics* 83:379-384.
- Nieto C, Morales M, Orjeda G, et al. (2006)** An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal* 48:452–62.
- Nashilevitz S, Melamed-Bessudo C, Izkovich Y, et al. (2010)** An orange ripening mutant links plastid NAD(P)H Dehydrogenase complex activity to central and specialized metabolism during tomato fruit maturation. *The Plant Cell* 22:1977–1997.
- Nishiyama K, Guis M, Rose JKC, et al. (2007)** Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany* 58:1281–90.
- Obando J, Fernandez-Trujillo JP, Martinez JA, et al. (2008)** Identification of melon fruit quality Quantitative Trait Loci using near-isogenic lines. *Journal of American Society for Horticultural Science* 133:139–151.
- Obando-Ulloa JM, Nicolai B, Lammertyn J, et al. (2009)** Aroma volatiles associated with the senescence of climacteric or non-climacteric melon fruit. *Postharvest Biology and Technology* 52:146–155.
- Obando-Ulloa JM, Ruiz J, Monforte AJ, Fernández-Trujillo JP (2010)** Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry* 118:822–815.

- Oliver M, Garcia-Mas J, Cardús M, et al. (2001)** Construction of a reference linkage map for melon. *Genome* 44:836–45.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio L Lo, Skriver K (2005)** NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10:79–87.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, et al. (2003)** Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 10:239–47.
- Osorio S, Alba R, Damasceno CMB, et al. (2011)** Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol* 157:405–25.
- Oumouloud A, Arnedo-Andres MS, Gonzalez-Torres R, Alvarez JM (2008)** Development of molecular markers linked to the Fom-1 locus for resistance to Fusarium race 2 in melon. *Euphytica* 164:347–356.
- Ophir, R., Eshed, R., Harel-Beja, et al. (2010).** High-throughput marker discovery in melon using a self-designed oligo microarray. *BMC Genomics*, 11, 269.
- Paris MK, Zalapa JE, McCreight JD, Staub JE (2008)** Genetic dissection of fruit quality components in melon (*Cucumis melo* L.) using a RIL population derived from exotic × elite US Western Shipping germplasm. *Molecular Breeding* 22:405–419.
- Pateraki I (2004)** Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany* 55:1623–1633.
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, et al. (1988)** Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721–6.
- Pauquet J, Burget E, Hagen L, et al. (2004)** Map-based cloning of the Vat gene from melon conferring resistance to both aphid colonization and aphid transmission of several viruses. *Progress in cucurbit genetics and breeding research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Olomouc, Czech Republic, 12-17 July, 2004. Palacký University in Olomouc, 325–329*
- Pech JC, Bouzayen M, Latché A (2008)** Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science* 175:114–120.
- Penninckx IAMA (1998)** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defense gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10:2103–2114.
- Perchepped L, Bardin M, Dogimont C, Pitrat M (2005a)** Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping. *Phytopathology* 95:556–65.
- Perchepped L, Dogimont C, Pitrat M (2005b)** Strain-specific and recessive QTLs involved in the control of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in a recombinant inbred line population of melon. *Theoretical and applied genetics* 111:65–74.
- Pérez-de-Castro, A. M., Vilanova, S., Cañizares, et al. (2012).** Application of genomic tools in plant breeding. *Current Genomics*, 13(3), 179–95.
- Périn C, Hagen LS, Giovinazzo N, et al. (2002a)** Genetic control of fruit shape acts prior to anthesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 266:933–941.
- Périn C, Hagen S, De Conto V, et al. (2002b)** A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1017–1034.
- Périn C, Gomez-Jimenez MC, Hagen L, Dogimont C, Pech JC, Latché A, Pitrat M, Lelièvre JM. (2002c)** Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiology* 129:300–309.

- Perl-Treves R, Galun E (1985)** The *Cucumis* plastome: physical map, intrageneric variation and phylogenetic relationships. *Theoretical and Applied Genetics* 1–13.
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M (2001)** The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7:275–291.
- Pitrat M (2008)** Melon (*Cucumis melo* L.). In *Handbook of crop breeding, vol I: Vegetables*. E.
- Pitrat M, Chauvet M, Foury C (1999)** Diversity, history and production of cultivated cucurbits. *Acta Horticulturae* 492:21–28.
- Powell ALT, Nguyen C V, Hill T, et al. (2012)** Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science* 336:1711–5.
- Portnoy, V., Diber, A., Pollock, et al. (2011)**. Use of Non-Normalized, Non-Amplified cDNA for 454-Based RNA Sequencing of Fleshly Melon Fruit. *The Plant Genome Journal*, 4(1), 36.
- Ren T, Qu F, Morris TJ (2000)** HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *The Plant Cell* 12:1917–1926.
- Renner SS, 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.
- Ritschel PS, Lins TC, Tristal RL et al. (2004)** Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). 4:9.
- Robinson RW, Decker-Walter D. (1997)** Cucurbits - Crop Production Science in Horticulture.
- Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, et al. (1989)** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059–1065.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J (2000)** An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:11102–11107.
- Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW, et al. (1991)** 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *Journal of Molecular Biology* 222:937–61.
- Rounsley SD, Last RL (2010)** Shotguns and SNPs: how fast and cheap sequencing is revolutionizing plant biology. *The Plant Journal* 61:922–7.
- Rozen S SH (2000)** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* 365–386.
- Rudd S (2003)** Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends in plant science* 8:321–9.
- Sablowski RW, Meyerowitz EM (1998)** A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92:93–103.
- Saito K, Hayano-Saito Y, Kuroki M, Sato Y (2010)** Map-based cloning of the rice cold tolerance gene Ctb1. *Plant Science* 179:97–102.
- Salanoubat M, Lemcke K, Rieger M, Ansorge, Unseld M, Fartmann B, Valle G, Blöcker H, Perez-Alonso M et al. (2000)** Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 40:820-822.
- Salvi S, Tuberosa R (2005)** To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science* 10:297–304.
- Sax K (1923)** The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552–60.

- Schaefer H, Telford IRH, Renner SS (2008)** *Austrobryonia* (Cucurbitaceae), a New Australian Endemic Genus, is the Closest Living Relative to the Eurasian and Mediterranean *Bryonia* and *Ecballium*. *Systematic Botany* 33:125–132.
- Seaton G, Haley CS, Knott SA, et al. (2002)** QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 18:339–340.
- Sebastian P, Schaefer H, Telford IRH, Renner SS (2010)** Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14269–73.
- Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, et al. (2005)** A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *The Plant Cell* 17:311–25.
- Seymour GB (1993)** *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman & Hall, London.
- Shalit M, Katzir N, Tadmor Y, et al. (2001)** Acetyl-coa: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:794–9.
- Shan W, Kuang J, Chen L, et al. (2012)** Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 63:5171–87.
- Silberstein L, Kovalski I, Huang R, et al. (1999)** Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 79:11.
- Silva JA, da Costa TS, Lucchetta L, et al. (2004)** Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. *Postharvest Biology and Technology* 32:263–268.
- Simpson JT, Wong K, Jackman SD, et al. (2009)** ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research* 19:1117–23.
- Smeds L, Künstner A (2011)** ConDeTri--a content dependent read trimmer for Illumina data. *PLoS ONE* 6:e26314.
- Smyth, G. (2004)**. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3(1).
- Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR (1998)** Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* 12:3703–14.
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, et al. (1996)** The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85:159–70.
- Staub JE, Box J, Meglic V, McCreight TFHJD (1997)** Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining intraspecific variation in *Cucumis*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:257–269.
- Staub J, Daning-Poleg Y, Fazio G, et al. (2000)** Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. *Euphytica* 115:225-241.
- Stepansky A, Kovalski I, Perl-Treves R (1999)** Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution* 217:313–332.
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, et al. (2006)** Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology* 140:150–8.
- Szabó Z, Gyulai G, Humphreys M, et al. (2005)** Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica* 146:87-94.
- Tadmor Y, Katzir N, Meir A, et al. (2007)** Induced mutagenesis to augment the natural genetic variability of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Science* 55:159–169.

- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M (2001)** The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128:1127–1135.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. (2011)** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–9.
- Tanksley SD (1993)** Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27:205–33.
- Tanksley SD, Ganai MW, Martin GB (1995)** Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends in Genetics* 11:63–8.
- Tanksley SD (2004)** The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell* 16 Suppl:S181–189.
- Theologis A, Ecker JR, Palm CJ, et al. (2000)** Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:816–820.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, et al. (2004)** Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37:914–939.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. (1997)** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876–82.
- Thompson AJ, Tor M, Barry CS, et al. (1999)** Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiology* 120:383–390.
- Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, Klee HJ (2001)** Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant Journal* 26:47–58.
- Tijssens LMM, Dos-Santos N, Jowkar MM, et al. (2009)** Postharvest firmness behaviour of near-isogenic lines of melon. *Postharvest Biology and Technology* 51:326–320.
- Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, et al. (2003)** Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Research* 13:524–530.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009)** TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25:1105–1111.
- Tucker ML (2002)** Functional Analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic Leucine zipper transcription factors. *Plant Physiology* 130:1487–1496.
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, et al. (2006)** A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314:1298–301.
- Varshney (2007)** Genomics-Assisted Crop Improvement. *Springer* 1:1-13.
- Van Leeuwen H, Monfort A, Zhang HB, Puigdomenech P (2003)** Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 51:703–718.
- Vegas J, Garcia-Mas J, Monforte AJ (2010)** Characterization of fruit ripening in the melon near isogenic line SC3-5-1. *Proc Cucurbitaceae 2010. Section Breeding and Genetics. ASHA. Alexandria, VA* 3–7.
- Vidya Vardhini B, Rao SSR (2002)** Acceleration of ripening of tomato pericarp discs by brassinosteroids. *Phytochemistry* 61:843–7.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. (1995)** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407–14.
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJM, et al. (2009)** Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *The Plant Cell* 21:3041–3062.

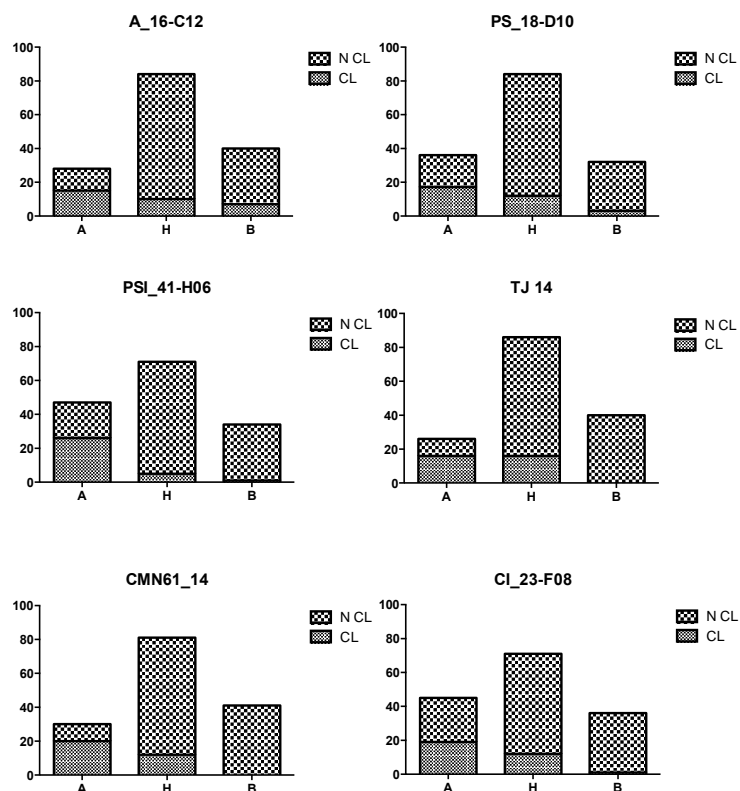
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, et al. (2002)** A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science* 296:343–6.
- Vuylsteke, M., R. Mank, R. Antonise, E. Bastiaans, M.L. et al. (1999)**. Two high-density AFLP (R) linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 921–935.
- Walters TW (1989)** Historical overview on domesticated plants in China with special emphasis on the Cucurbitaceae. *Economic Botany* 43:297–313.
- Wang Y, Thomas C, Dean R (1997)** A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:791–798.
- Wang Y, Thomas C, Dean R (2000)** Genetic mapping of fusarium wilt resistance gene (Fom-2) in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Breeding* 6:379–389.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009)** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics* 10:57–63.
- Wege S, Jossier M, Filleur S, et al. (2010)** The proline 160 in the selectivity filter of the *Arabidopsis* NO(3)(-)/H(+) exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *The Plant Journal* 63:861–9.
- Wu R, Ma C, Casella G (2007)** Statistical genetics of Quantitative Traits: linkage, maps and QTL Statistics for Biology and Health 384.
- Xiao H, Jiang N, Schaffner E, et al. (2008)** A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* 319:1527–30.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH (2000)** *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development* 14:3024–36.
- Yahyaoui FEL, Wongs-Aree C, Latche A, et al. (2002)** Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *European Journal of Biochemistry* 269:2359–2366.
- Yano K, Takashi T, Nagamatsu S, et al. (2012)** Efficacy of microarray profiling data combined with QTL mapping for the identification of a QTL gene controlling the initial growth rate in rice. *Plant and Cell Physiology* 53:729–739.
- Yeats TH, Howe KJ, Matas AJ, et al. (2010)** Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *Journal of Experimental Botany* 61:3759–3771.
- Yi SS, Akashi Y, Tanaka K, et al. (2009)** Molecular analysis of genetic diversity in melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Myanmar and their relationship with melon germplasm from East and South Asia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:1149–1161.
- Yokotani N, Tamura S, Nakano R, et al. (2003)** Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). *Journal of Experimental Botany* 54:2775–6.
- Yoo S-D, Sheen J (2008)** MAPK signaling in plant hormone ethylene signal transduction. *Plant Signaling and Behavior* 3:848–9.
- Yu K, Xu Q, Da X, et al. (2012)** Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC Genomics* 13:10.
- Zalapa JE, Staub JE, McCreight JD, et al. (2007)** Detection of QTL for yield-related traits using recombinant inbred lines derived from exotic and elite US Western Shipping melon germplasm. *Theoretical and applied genetics* 114:1185–201.
- Zamir D (2001)** Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature reviews Genetics* 2:983–989.
- Zeng ZB (1994)** Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457–68.

- Zhang M, Yuan B, Leng P (2009)** The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 60:1579–1588.
- Zhang Z (2006)** The gene controlling the Quantitative Trait Locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18:1524–1536.
- Zhong R, Richardson EA, Ye Z-H (2007)** Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Planta* 225:1603–11.
- Zhu M, Chen G, Zhou S, et al. (2014)** A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor, SINAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. *Plant Cell Physiol* 55:119–35.
- Zhuang F, Chen J, Staub J, Quian C (2004)** Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR and RAPD marker analysis. *Plant Breeding* 123:167-172.

APÉNDICES

Apéndice A.1. Secuencias y condiciones para la amplificación de los marcadores utilizados para el genotipado de las poblaciones en esta tesis. Se incluyen las referencias para aquellos marcadores que habían sido publicados y se indican con un asterisco los marcadores desarrollados durante esta tesis.

Marcador	Tipo	GL	Cebador	Cebador	Ta	[MgCl ₂]	Enzima	Restricción	Referencia
PS_18-D10	SSR	III	GATTCCTGGGCTGTACCTC	GCTAAGGAAAGGGTTTGTTCG	51	2	-	-	Fernandez et al. 2010
A_16-C12	SSR	III	ATAAATGGGTCATCGGAGGAG	GGTGGTGAATTAATGGAAGC	51	2	-	-	Fernandez et al. 2011
PSI_41-H06	SSR	VI	CAACATTCTCCATTCA	CACCACCTGTGACATTGTACG	59	2	-	-	Fernandez et al. 2008a
CMCT123	SSR	VI	CGGATTGACTTATTGCCAAG	CATGTGCATGTGTGCATGTAC	51	2	-	-	Danin-Poleg et al. 2000
CMN21-37	SSR	VI	CCTCCATGGAGGTTTGTCC	TTGGATGTAGAAAACAGCAGACA	59	2.5	-	-	Fukino et al. 2008
MU10920	SSR	VI	CCAAGTCCACCATCCATT	GAGTGGGAGCGGTTTAATGG	51	2	-	-	Diaz et al. 2011
CI_56-B01	CAPS	VI	CAGCCCTTTCGTCAAAT	CTTTAAACCAGACAGCAAG	54	1.5	TaqI	-	Deleu et al. 2009
AI_19-F11	CAPS	VI	TGTGGATGAACCTAACAAAGCAGT	ACGTAACAGATGAGAGCCCAATTT	59	1.5	HinfI	-	Deleu et al. 2009
CMBR002	SSR	VI	CGGGGAGAGAAAAGAGAGA	TGGTTTTTCGTTAATACCTTTGG	58	2	-	-	Ritschel et al. 2004
AI_03-B03	CAPS	VI	GCAGGAGCTTTGTAGAGCTTCT	ACGAACTCCGCATAATCA	58	1.5	VspI	-	Deleu et al. 2009
AI_15-G04	CAPS	VI	GGCTATCTCCAGCAGAAG	CTTGATCTGCCACTGTGG	59	1.5	HinII	-	*
28.37	SSR	VI	TGCTATGGTCATGTGTTC	TGCTGATTCAAGAGGCTTCA	51	2	-	-	*
FR14-P22	CAPS	VI	AGGGAAAGGAAAGTACCCAAATG	TTCCGCATAATACCAATCAT	60	1.5	BtgI	-	Deleu et al. 2009
28.3215	SSR	VI	TTGTTATTCATTTATTGCCATT	TGGGTTGACAGACACATTTTGG	60	2	-	-	*
28.3377	SSR	VI	GGAAGGGCAAATCTGGAATA	CTTCAGGTCGCAACACATA	59	2	-	-	*
CMCTN41	SSR	VI	CCCCAAGATTCGTATTAATC	TGGTAGTAGAGATGATATAC	51	2	-	-	Gonzalo et al. 2005
CMN61_14	SSR	VI	TGCAGGATCAAGAATCAAGTT	ACGAACTCCGCATAATCA	56	2	-	-	Fukino et al. 2008
TJ_14	SSR	VI	TTCCAATGCCCTAAAGTTGC	CAAGCAAACCAAGACATGC	56	2	-	-	Morales et al. 2004
CI_23-F08	SSR	VI	CATAGAGCATTTGCCGGAGT	TGAAAAGCTAGCATGGATTGG	59	2	-	-	Fernandez et al. 2008a



Apéndice A.2. Análisis de la correlación entre el tipo de maduración y los marcadores moleculares A_16-C12, PS_18-D10, PSI_41-H06, TJ_14, CMN 61-14 y CI_23-F08. Siendo CL climatérico, N CL no climatérico, y A= homocigoto para el parental SC, B= homocigoto para el parental PS y H heterocigoto.

Apéndice A.3. Genotipado y fenotipado de los individuos del estudio de progenie originado a partir de recombinantes 2008-F₂.

FAMILIA	PLANTA	A_16-CL12	PS_18-D10	PS_41-H06	MU10920	AL_19-F11	CHBR 002	AL_03-B03	FR14-P22	CHTCN41	CHN61.14	ECM 14	CL_23-F08	DEHISCENCIA	CAMBIO COLOR	AROMAS	TIPO MADURACION	FECHA POLINIZACION
8M38-3		A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H				NCL	
	1	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	No	No	No	N CL	08-Jul
	2	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	09-Jul
	3	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	03-Jul
	4	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	H	No	No	No	N CL	07-Jul
	15	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	No	No	No	N CL	
	16	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	No	No	No	N CL	22-Jul
	12	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	Si	Si	No	CL	01-Jul
	5	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	Si	Si	Si	CL	09-Jul
	6	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	Si	Si	Si	CL	07-Jul
	7	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	-	Si	Si	Si	CL	09-Jul
	8	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	A	no	no	no	N CL	06-Jul
	11	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	No	No	No	N CL	08-Jul
	9	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	A	no	no	no	N CL	09-Jul
	13	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	H	H	No	No	No	N CL	23-Jul
	14	A	A	A	A	A	B	B	B	H	H	H	H	No	No	No	N CL	07-Jul
	10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	si	si	si	CL	08-Jul
8M40-2		A	A	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H				NCL	
	3	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	
	7	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	
	12	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	06-ago
	4	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	
	13	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	si	si	CL	10-ago
	8	A	A	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	No	No	No	N CL	16-Jul
	9	A	A	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	No	No	No	N CL	
	6	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	
	10	A	A	B	B	B	B	A	A	A	B	B	B	Si	Si	Si	CL	07-ago
	11	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	B	Si	Si	Si	CL	07-ago
	1	A	A	B	H	H	H	H	H	H	H	H	A	No	No	No	N CL	16-Jul
	2	A	A	B	H	H	H	H	H	B	B	B	B	No	No	No	N CL	
	14	A	A	B	A	A	A	A	A	H	H	H	H	Si	Si	Si	CL	06-ago
	5	A	A	B	A	A	A	A	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	08-ago
8M38-4		A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	H				NCL	
	9	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	10-ago
	11	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	No	No	No	N CL	26-ago
	12	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	H	No	No	No	N CL	10-ago
	13	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	H	No	No	No	N CL	
	8	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	No	No	No	N CL	
	2	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	No	No	No	N CL	07-Jul
	4	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	No	No	No	N CL	25-ago
	6	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	A	No	No	No	N CL	
	10	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	H	No	No	No	N CL	28-ago
	1	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	H	No	No	No	NCL	15-Jul
	15	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	H	No	No	No	N CL	
	16	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	H	No	No	No	N CL	
	3	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	A	No	No	No	N CL	26-ago
	5	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	H	A	No	No	No	N CL	23-ago
	7	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	No	No	No	N CL	11-ago
	14	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	No	No	No	N CL	23-ago
8M71-11		A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A				NCL	
	3	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	30-Jul
	4	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	30-Jul
	8	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	16-Jul
	11	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	27-Jul
	13	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	No	No	No	N CL	24-Jul
	9	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	No	No	No	N CL	31-Jul
	12	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	21-Jul
	14	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	20-Jul
	15	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	24-Jul
	5	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	29-Jul
	6	A	A	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	No	No	No	N CL	
	7	A	A	A	A	A	A	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	15-Jul
	1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	29-Jul
	2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	30-Jul

FAMILIA	PLANTA	A_16-C12	PS_18-D10	PS_41-H06	MU10920	AL_19-F11	CMBR002	AL_03-B03	FR14-P22	CMTCM 41	CMN61_24	T1 14	C_23-F08	DEHISCENCIA	CAMBIO COLOR	AROMAS	TIPO MADURACION	FECHA POLINIZACION
BM71-6		A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A				NCL	
	1	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	
	4	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	30-jun
	6	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	16-jun
	2	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	No	No	No	N CL	31-jun
	10	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	Si	Si	Si	CL	28-jun
	8	A	A	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	21-jun
	11	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	
	12	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	
	7	A	A	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	29-jun
	9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	21-jun
	5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	29-jun
	3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	28-jun
	13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	29-jun
BM39-3		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H				CL	
	9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	Si	Si	Si	CL	15-jun
	10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	Si	Si	Si	CL	30-jun
	6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	Si	Si	Si	CL	01-jun
	1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	30-jun
	3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	09-jun
	5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	15-jun
	14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	07-jun
	15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	15-jun
	16	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	
	7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	B	Si	Si	Si	CL	
	8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	B	Si	Si	Si	CL	09-jun
	4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	Si	Si	Si	CL	09-jun
	12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	Si	Si	Si	CL	30-jun
	13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	Si	Si	Si	CL	08-jun
	2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	09-jun
	11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	
BM39-2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H				CL	
	8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	Si	Si	Si	CL	15-jun
	10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	Si	Si	Si	CL	16-jun
	1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	
	2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	
	11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	21-jun
	12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	12-jun
	7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	Si	Si	Si	CL	20-jun
	5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	Si	Si	Si	CL	20-jun
	9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	Si	Si	Si	CL	21-jun
	6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	09-jun
	3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	15-jun
	4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	29-jun
BM71-19		A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	H				NCL	
	1	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	
	11	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	28-jun
	3	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	29-jun
	8	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	-	No	No	No	N CL	12-ago
	13	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	No	No	No	N CL	27-jun
	15	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	No	No	No	N CL	28-jun
	2	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	-	No	No	No	N CL	15-jun
	5	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	H	No	No	No	N CL	28-jun
	4	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	27-jun
	7	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	08-jun
	9	A	A	H	H	H	H	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	21-jun
	10	A	A	H	H	H	H	H	B	B	A	A	H	No	No	No	N CL	
	6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	Si	Si	Si	CL	07-ago
	14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	Si	Si	Si	CL	
BM71-13		A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A				NCL	
	5	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	27-jun
	8	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	N CL	28-jun
	9	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	No	No	No	CL	
	13	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	16-jun
	11	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	15-jun
	15	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	15-jun
	2	A	A	A	A	H	H	H	H	H	A	A	A	No	No	NO	N CL	29-jun
	4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	30-jun
	6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	21-jun
	7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	24-jun
	12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	16-jun
	14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Si	Si	Si	CL	21-jun

Apéndice A.4. Secuencias de los cebadores de los adaptadores Pst, PrePst y los cebadores selectivos Pst+2, con la longitud (nt) de los mismos, utilizados en las reacciones AFLP. En negrita se indican los nucleótidos selectivos.

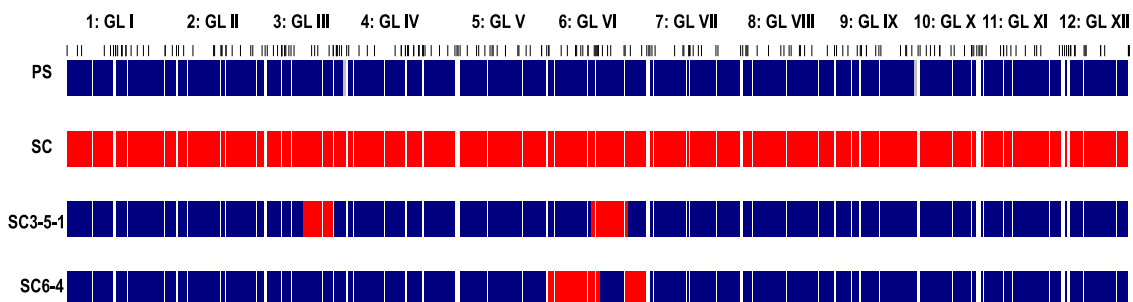
Cebadores	Secuencia 5'-3'	Nt
Adapt Pst-F	CTCGTAGACTGCGTACATGCA	21
Adapt Pst-R	TGTACGCAGTCTAC	14
PrePst-F	GACTGCGTACATGCAG	16
Pst-1	GACTGCGTACATGCAG AA	18
Pst-2	GACTGCGTACATGCAG AT	18
Pst-3	GACTGCGTACATGCAG AC	18
Pst-4	GACTGCGTACATGCAG AG	18
Pst-5	GACTGCGTACATGCAG TT	18
Pst-6	GACTGCGTACATGCAG TA	18
Pst-7	GACTGCGTACATGCAG TC	18
Pst-8	GACTGCGTACATGCAG TG	18
Pst-9	GACTGCGTACATGCAG GG	18
Pst-10	GACTGCGTACATGCAG GA	18
Pst-11	GACTGCGTACATGCAG GT	18
Pst-12	GACTGCGTACATGCAG GC	18
Pst-13	GACTGCGTACATGCAG CC	18
Pst-14	GACTGCGTACATGCAG CG	18
Pst-15	GACTGCGTACATGCAG CT	18
Pst-16	GACTGCGTACATGCAG CA	18

Apéndice A.5. Secuencias de los adaptadores Mse, PreMse y los cebadores selectivos Mse+3, con la longitud (nt) de los mismos, utilizados en las reacciones AFLP.

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Nt
Adapt Mse-F	GACGATGAGTCCTGAG	16
Adapt Mse-R	TACTCAGGACTCAT	14
PreMse-F	GATGAGTCCTGAGTAA	16

Primers Mse+3							
AAA	AGA	CAA	CGA	TAA	TGA	GAA	GGA
AAC	AGC	CAC	CGC	TAC	TGC	GAC	GGC
AAG	AGG	CAG	CGG	TAG	TGG	GAG	GGG
AAT	AGT	CAT	CGT	TAT	TGT	GAT	GGT
ACA	ATA	CCA	CTA	TCA	TTA	GCA	GTA
ACC	ATC	CCC	CTC	TCC	TTC	GCC	GTC
ACG	ATG	CCG	CTG	TCG	TTG	GCG	GTG
ACT	ATT	CCT	CTT	TCT	TTT	GCT	GTT

Apéndice A.6. Genotipo gráfico de los parentales PS, SC y las líneas isogénicas de melón SC6-4 y SC3-5-1.



Apéndice A.7. Secuencias, tamaños y posición de las bandas AFLP clonadas durante el desarrollo de nuevos marcadores en el GL VI.

Marcador	Secuencia	Longitud	Posición
Pst12-AGC	GATTTACCGCAGGCACTAAAAAGCCAGCTATTTGTGGACAAATCTCGGAGAGTGTCAA CAAACATTCTTGGTACTTGGCTGGTGGCTATGAAATGAACCTCATGGTGGCTGTTGATT TCACAGGTTTATTAGTATCTTTTACAATAAAATCATAATTCTAGACTACTACAAATTTTAT TCTTCAAATTATTAGTTACTGAGTTGGTCAGTAACATAAATCTTTTCAACATGGTGGCTCA CTGACGGTAGTGTTTTCTGAAGCGTACTTTTGACCCTGAATATCAAGTAGTCATCTTGG TTTTAGCTGTTTGTGTGCGTTAGAAGTCAACTCACCACTTCGCCCTCAGCTGGCTGAACTG GACTAGCCTTGCACTACATTCTCAC	395	Scaffold0006
Pst12-ACT (PS)	CTGCGTACATGCAGGCTTGATTTCTTTATATAATTATTCTTCTTCTATATATCTTTGTGTTGC CGATCCTTTCAAGTAAATGTTTACTCAGGACTCATCAATCGAATT	100	Scaffold0062
Pst12-ACT (SC)	CTGCGTACATGCAGGCTGTTTCTTTATATAATTATTCTTCTTCTATATATCTTTGTGTTGCC GATCCTTTCAAGTAAATGTTTACTCAGGACTCATCAATCGAATT	98	Scaffold0062
Pst-13ACG	AAGTCAAAGGGAAGCGCACCCTTTTGATCAAGAATAGATAAATATATTAGCCACATGTT GTATGAATTATATGTTGAGGGTTTGATTTGTTTGTGGCCTGCAGAAATCTGGTCATAAC CAGCTTAGCA	131	Scaffold0015
Pst13-AAG (PS)	AAGAAGTCGGTAATTATTACCACTTATAGACATAGTGTACTGTTAGGTGACCTAAAATTG TCAGTAATAAACCTCCACCAAAAATAATGTGCAGTGTATGGGGATGGCTGCAGATGAAG GTGTGCAATGTGCATGAGAAAAG	141	Scaffold0023
Pst13-AAG (SC)	AAGAAGTCGGTAATTATTACCACTTATAGACATAGTGTACTGTTAGGTGACCTAAAATTG TCAGTAATAAACCTCCACCAAAAATAATGTGCACAGTGTATGGGGATGGCTGCAGATGA AGGTGTGCAATGTGCATGAGAAAAG	143	Scaffold0023

Apéndice A.8. Genotipado y fenotipado de los individuos del estudio de progenie originado a partir de recombinantes 2010-F₂.

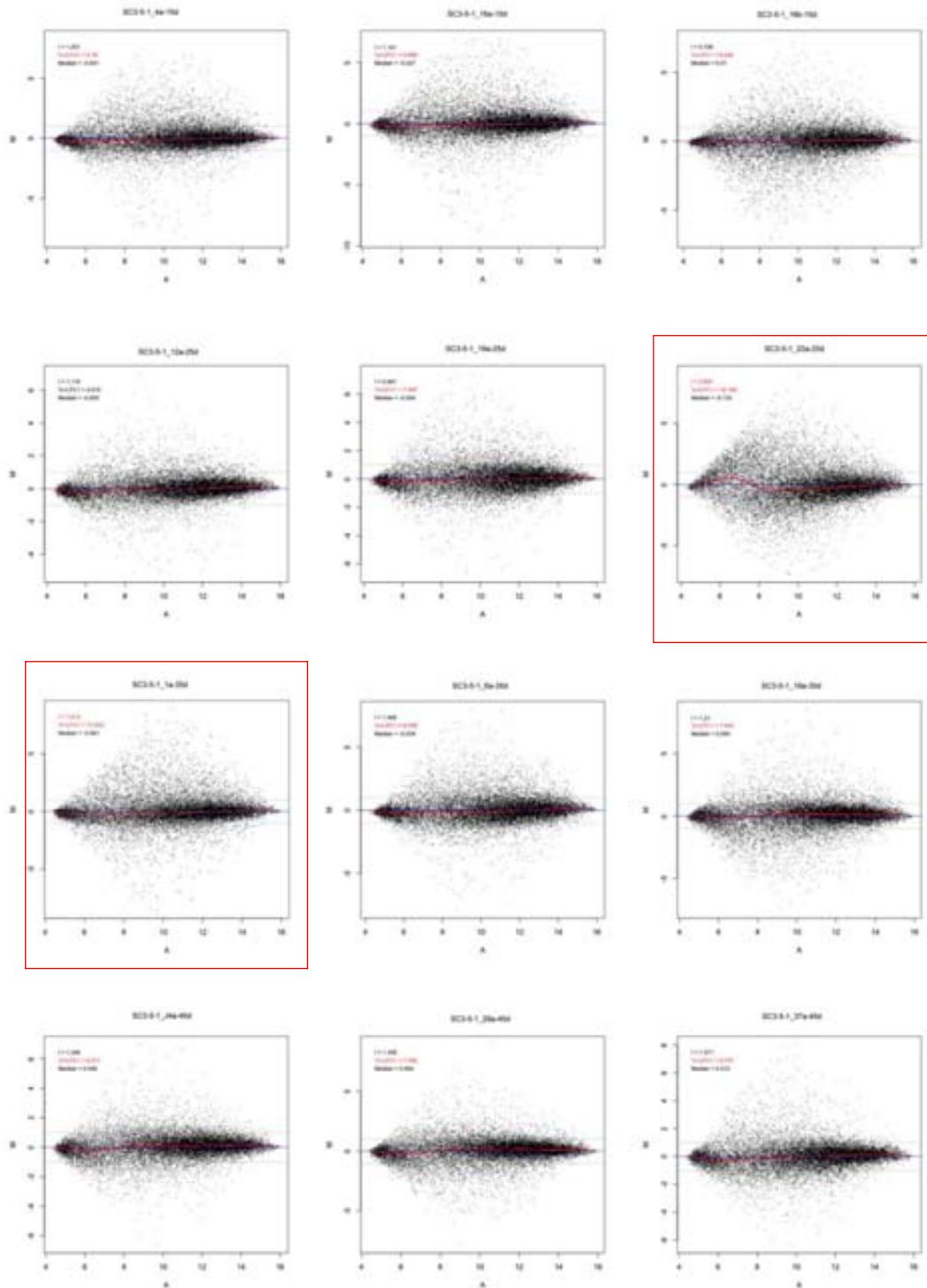
FAMILIA	PLANTA	A_16-C12	RS_18-010	PL_11-106	RI_15-604	28.37	W2/ERF	28.173	FR14-P22	28.315	28.317	CMCTM1	DEHISCENCIA	CAMBIO COLOR	Brix	TIPO MADURACION	FECHA POLINIZACION		
10M80-10 (rec 59)		A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	32 dap	Yes			CL		
	2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	39	Yes	11.3		CL	16-junio	
	3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	34	Yes	9.3		CL	27-junio	
	5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	40	Yes	12		CL	01-junio	
	7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	37	Yes	14		CL	20-junio	
	10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	37	Yes	12.3		CL	22-junio	
	23	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	10.2		CL	06-junio	
	24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	36	Yes	10.3		CL	15-junio	
	25	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	36	Yes	9.5		CL	04-jul	
	21	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	40	yes	8.6		CL	15-junio	
	11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	34	Yes	11.8		CL	21-junio	
	12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	39	Yes	11.2		CL	02-junio	
	13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	33	Yes	-		CL	09-junio	
	17	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	34	Yes	11.2		CL	09-junio	
	18	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	35	Yes	10.1		CL	06-junio	
	22	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	38	Yes	10.6		CL	09-junio	
	19	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	39	Yes			CL	16-junio	
	20	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	35	Yes	8.2		CL	06-junio	
	10M80-13 (rec 73)		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	33 dap	Si			CL	
		3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	35	Yes	10		CL	06-junio
4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	12		CL	27-junio	
5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	40	Yes	10.8		CL	01-junio	
6		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	39	Yes			CL	16-junio	
7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	40	Yes	8		CL	31-maig	
9		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	34	Yes	10.2		CL	27-junio	
10		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	9.3		CL	07-junio	
11		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	10.2		CL	15-junio	
15		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	33	Yes	10.8		CL	06-junio	
18		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	33	Yes	10.7		CL	14-junio	
24		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	40	Yes			CL	14-junio	
1		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	40	Yes	11		CL	01-junio	
2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	37	Yes	11.3		CL	06-junio	
17		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	40	Yes	10.2		CL	31-maig	
22		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	34	Yes	9.3		CL	16-junio	
21		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	41	Yes	8.6		CL	15-junio	
10M80-25 (rec 99)			A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	A	40 dap				NCL	
		2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	36	Yes	10.9		CL	06-junio
		10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	38	Yes	11		CL	02-junio
	12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	11		CL	04-jul	
	13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	40				CL	16-junio	
	14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	38	Yes			CL	09-junio	
	17	A	A	H	A	A	A	A	A	A	A	A	40	Yes	10.8		CL	01-junio	
	9	A	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	42	Yes	9.2		NCL	27-junio	
	6	A	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	42	Yes	9.8		NCL	09-junio	
	7	A	H	H	H	H	H	H	H	-	A	A	55				NCL	04-jul	
	11	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	A	45	yes	12		NCL	07-junio	
	18	A	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	49	yes			NCL	06-junio	
	16	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	A	42	Yes	11.2		NCL	07-junio	
	10M80-26 (rec 100)		A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	37 dap				CL	
		4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	38	Yes	8.7		CL	06-junio
		16	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	38	Yes			CL	14-junio
17		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	38	Yes	10.3		CL	01-jul	
3		A	A	H	A	A	A	A	A	A	A	A	37	Yes	12.1		CL	10-junio	
1		A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	41	Yes	10.2		NCL	15-junio	
7		A	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	49	Yes	12.8		NCL	07-junio	
10		A	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	46	Yes	12		NCL	15-junio	
12		A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	41	Yes	9.8		NCL	07-junio	
13		A	B	B	B	B	H	A	A	A	A	A	55				NCL	15-junio	
20		A	B	B	B	B	H	A	A	A	A	A	40	Yes	9.1		CL	15-junio	
25		A	B	B	B	H	H	A	A	A	A	A	45	Yes	8		NCL	09-junio	
10M80-28 (rec 103)			A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	33 dap				CL	
		3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	11.8		CL	06-junio
		5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	-		CL	23-junio
		15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	36	Yes	11.3		CL	14-junio
	21	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	Yes	11.6		CL	06-junio	
	18	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	36	Yes	8.2		CL	06-junio	
	1	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	36	Yes	9.1		CL	06-junio	
	2	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	34	Yes	9.3		CL	04-jul	
	4	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	35	Yes	10.1		CL	27-junio	
	11	A	A	A	A	A	A	H	-	H	-	H	34	Yes	10		CL	07-junio	
	12	A	A	A	A	A	A	H	-	H	-	H	34	Yes	12		CL	09-junio	
	13	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	38	Yes	-		CL	01-jul	
	14	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	33	Yes	11.8		CL	07-junio	
	19	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	33	No	9		CL	17-junio	
	22	A	A	A	A	A	A	A	H	B	B	B	40	Yes	10.2		CL	14-junio	
	6	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	35	Yes	9.7		CL	07-junio	
9	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	38	Yes	11.3		CL	17-junio		
10	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	36	Yes	11.1		CL	15-junio		
16	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	32	Yes	9.3		CL	15-junio		
17	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	35	Yes	12		CL	06-junio		
24	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	35	Yes	12.5		CL	07-junio		
10M80-90 (rec 71)		A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	51 dap				NCL		
	13	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H		No			NCL	14-junio	
	18	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	52	No	11		NCL	07-junio	
	19	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	47	Yes	10.3		NCL	14-junio	
	21	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	42	Yes	12.8		NCL	14-junio	
	25	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	45	No	11		NCL	27-maig	
	10	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	54	No			NCL	14-junio	
	11	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	41	Yes	10		NCL	31-maig	
	14	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	42	Yes	-		NCL	07-junio	
	20	A	A	A	H	H	H	H	B	B	B	B	52	Yes			NCL	09-junio	
	17	A	A	A	H	H	H	H	B	B	B	B	42	Yes	12		NCL	01-junio	
	6	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	No			NCL	04-jul	
	7	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	50	No	8.2		NCL	31-maig	
	4	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	49	Yes	10.1		NCL	01-junio	
	12	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	40	Yes	9.8		CL	09-junio	
	5	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	37	Yes	13.2		CL	10-junio	

Apéndice A.9. Genes candidatos en el intervalo del locus *ETHQV6.3*, en el *scaffold00028*, entre los marcadores *AP2/ERF* y *FR14-P22*, después del mapeo fino. En negrita se indican aquellos genes candidatos si en el mapeo fino del locus se tienen en cuenta los recombinantes *F₄* del estudio de progenie 2010-*F₂*.

Melonomics ID	Posición	Inicio	Final	Cadena	Función
MELO3C016413	75112	75112	79484	+	AP2-like ethylene-responsive transcription factor ALL6
MELO3C016416	189455	189455	193306	+	Similar to Protein SGT1 homolog At5g65490
MELO3C016417	193600	193600	197931	-	Similar to Myosin-1(Ricinus communis)/Kinase interacting
MELO3C016418	231709	231709	239459	+	MSCS-like 2 protein
MELO3C016419	240828	240828	243184	+	
MELO3C016420	301600	301600	307863	+	SNARE associated Golgi protein family
MELO3C016421	305291	305291	310723	-	endoglucanase [Cucumis melo]
MELO3C016426	415336	415336	419839	-	FRO2-like protein; NADPH oxidase-like
MELO3C016427	420684	420684	424234	-	FRO1-like protein; NADPH oxidase-like
MELO3C016430	445034	445034	447095	-	Rossmann-fold NAD(P)-binding domain-containing protein
MELO3C016431	466690	466690	473033	+	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase
MELO3C016434	518639	518639	524247	-	AAA-type ATPase-like protein
MELO3C016435	549532	549532	557473	-	PHD-type zinc finger protein
MELO3C016437	579575	579575	585623	+	GTP-binding protein
MELO3C016443	668269	668269	676308	+	RNA-binding protein containing a PIN domain [Zea mays]
MELO3C016444	713812	713812	715689	+	NAC domain containing protein 35
MELO3C016445	788040	788040	788447	-	putative beta-1,3-galactosyltransferase 2
MELO3C016446	822254	822254	823006	+	gag-pro [Pisum sativum]
MELO3C016448	835397	835397	843198	+	methionine S-methyltransferase
MELO3C016449	882560	882560	883477	+	heat shock protein
MELO3C016450	945730	945730	953560	-	EMB1879 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] DUF647
MELO3C016456	999600	999600	1008864	-	myb domain protein 4r1
MELO3C016458	1032188	1032188	1033050	-	transcription factor, RWP-RK domain-containing protein
MELO3C016459	1044755	1044755	1053015	-	60S ribosomal protein
MELO3C016463	1119479	1119479	1134049	+	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
MELO3C016465	1154370	1154370	1157142	-	putative peptide/nitrate transporter
MELO3C016466	1178430	1178430	1178714	-	hypothetical protein [Cucumis melo subsp. melo]
MELO3C016468	1249041	1249041	1251725	-	zinc finger CCCH domain-containing protein
MELO3C016471	1274140	1274140	1274711	-	FtsH extracellular protease
MELO3C016472	1280500	1280500	1282445	-	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein, Zip finger
MELO3C016473	1290003	1290003	1301054	-	uncharacterized protein
MELO3C016474	1326325	1326325	1340952	+	GTP-binding family protein
MELO3C016475	1344840	1344840	1352598	-	chloride channel protein
MELO3C016476	1411322	1411322	1414278	+	I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase
MELO3C016478	1491658	1491658	1492380	-	Zinc finger CCCH domain-containing protein
MELO3C016482	1512319	1512319	1519070	-	zinc ion binding / DNA binding protein
MELO3C016483	1550916	1550916	1554595	-	Phosphoribosylamine-glycine ligase
MELO3C016485	1584786	1584786	1588278	-	uncharacterized protein
MELO3C016486	1598430	1598430	1601427	+	Ras-related protein RABD1
MELO3C016487	1627025	1627025	1633703	+	elongation factor EF-1 gamma subunit
MELO3C016488	1635551	1635551	1639807	+	uncharacterized protein
MELO3C016489	1644191	1644191	1644937	-	envelope-like protein (Cucumis melo)
MELO3C016490	1651572	1651572	1657352	-	RNA-binding KH domain-containing protein
MELO3C016491	1659650	1659650	1662067	-	
MELO3C016494	1725741	1725741	1727319	-	Polygalacturonase precursor

MELO3C016495	1753881	1753881	1758903	+	Carotenoid Isomerase; FAD dependent oxidoreductase
MELO3C016496	1763410	1763410	1765389	-	serine/threonine protein kinase
MELO3C016497	1775609	1775609	1776402	-	uncharacterized protein
MELO3C016498	1833069	1833069	1840759	+	MAC/Perforin domain-containing protein
MELO3C016499	1866334	1866334	1870076	-	uncharacterized protein
MELO3C016502	1985606	1985606	1990438	+	Receptor Protein Kinase (similar BAM1 arabidopsis)
MELO3C016503	2013790	2013790	2017550	+	Sodium Transporter Hypothetical
MELO3C016505	2045149	2045149	2048155	+	Sodium Transporter Hypothetical
MELO3C016506	2075433	2075433	2075879	-	Glutamate receptor 3.6 [Medicago truncatula]
MELO3C016507	2095466	2095466	2101390	-	uncharacterized protein
MELO3C016510	2136036	2136036	2139401	+	acetylglucosaminyltransferase
MELO3C016512	2177506	2177506	2180568	+	Cytocrome C oxidase
MELO3C016513	2182842	2182842	2184013	-	metallothionein-like protein type 3 [Cucumis sativus]
MELO3C016514	2213361	2213361	2213933	+	RING-H2 finger protein
MELO3C016515	2244117	2244117	2248254	+	cytidyltransferase family
MELO3C016516	2277590	2277590	2277810	+	Thioredoxin
MELO3C016517	2294492	2294492	2298134	+	Expansin
MELO3C016518	2319146	2319146	2321162	+	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
MELO3C016520	2377995	2377995	2381501	+	Unknown Protein
MELO3C016521	2396076	2396076	2399372	+	Unknown Protein
MELO3C016523	2417308	2417308	2419527	+	leucine-rich repeat-containing protein
MELO3C016525	2465650	2465650	2468039	-	fiber protein Fb34
MELO3C016527	2532096	2532096	2532912	-	threonine synthase
MELO3C016529	2577426	2577426	2579746	+	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein
MELO3C016530	2609977	2609977	2613178	+	ABC transporter G family
MELO3C016534	2644177	2644177	2647258	+	ABC transporter G family
MELO3C016536	2691454	2691454	2693030	-	NAC domain (CL1154)
MELO3C016540	2824829	2824829	2826597	+	NOR

Apéndice A.10. El efecto de la normalización de LOWESS sobre la señal de hibridación obtenida para los chips SC3-5-1 se muestra en un gráfico M-A. En la que A es la señal promedio de la intensidad calculada como $[0.5 * (\log P_m + \log P_{Mx})]$ siendo P_m la intensidad de la señal para el chip y P_{Mx} la mediana de la intensidad para todos los chips y M, calculada como la relación $\log(P_m/P_{Mx})$.



Apéndice A.11. Listado de genes expresados diferencialmente en las líneas SC3-5-1_6a, SC3-5-1_18a y PS en la ruta de síntesis, percepción y transducción del etileno obtenida mediante MAPMAN. Se indica su código en Melonomics y la posición en el genoma, scaffold y GL.

Melogene ID	Función	Melonomic ID	Posición Genoma	GL	SC3-5-1_6a vs PS (35DAP)	SC3-5-1_18a vs PS (35DAP)	SC3-5-1_18a vs SC3-5-1_6a (35DAP)
	Ethylene synthesis						
c15d_41-c10-m13r_c	SAM	MELO3C024471	scaffold00068	LG VIII	4,20		-3,74
ccl3787contig1	SAM	MELO3C012911	scaffold00018	LG IV	-3,40	-1,27	2,19
cPSI_39-H08-M13R_c	cmACS2	MELO3C016340	scaffold00027	LG VII	1,63		-1,09
cSSH1N10_c	cmACS5	MELO3C010779	scaffold00014	LG III	4,16	7,06	2,89
cA_02-A09-M13R_c	cmACS3	MELO3C007662	scaffold00007	LG VIII	3,59		-2,66
cFR15J17_c	cmACO1	MELO3C014437	Scaffold00022	LG V	5,45	4,84	
cCL451Contig1	cmACO1	MELO3C014437	Scaffold00022	LG V	6,66	5,15	-1,50
cA_04-F11-M13R_c	cmACO1	MELO3C014437	Scaffold00022	LG V	3,20		-2,95
cA_01-G05-M13R_c	cmACO2	MELO3C004619	Scaffold00003	LG V	3,73		-2,66
cCL4919Contig1	cmACO2	MELO3C004619	Scaffold00003	LG V	1,94		-1,46
cCL3430Contig1	cmACO5	MELO3C019735	scaffold00039	LG XI	1,24	1,51	
	Ethylene perception						
cCL1270Contig1	cmETR2	MELO3C006451	scaffold00006	LG VI	1,24		
cA_22-B04-M13R_c	cmETR1	MELO3C012652	Scaffold00017	LG I	3,74		-3,85
cCL1444contig1	CTR1	MELO3C009433	scaffold00011	LG IV	-1,58		1,82
cCL4283contig1	EIN3	MELO3C010335	scaffold00012	LG II	2,19		-1,60
cPSI_11-E04-M13R_c	ATH	MELO3C026738	scaffold00104	-	1,44	3,22	1,12
	Ethylene transcriptional regulation						
cCL1118Contig1	EREBP	MELO3C007267	scaffold00007	LG VIII	-2,43	-2,77	
cCL3840Contig1	EREBP	MELO3C011572	scaffold00015	LG III	-1,14	-1,70	
cCL3475Contig1	EREBP/APETALA2	MELO3C022181	scaffold00051	LG IX	-3,28	-2,88	
cCL3293Contig1	EREBP	MELO3C017940	scaffold00031	LG VII	2,74	1,71	-1,03
cCL5010Contig1	EREBP	MELO3C017940	scaffold00031	LG VII	3,84	2,42	-1,40
cCL6170Contig1	ERT	MELO3C004553	scaffold00003	LG V	3,49	2,33	-1,14
cPS_28-E11-M13R_c	EREBP	MELO3C005629	scaffold00005	LG IX	8,55	6,83	-1,93
cCL3743Contig1	EREBP	MELO3C021306	scaffold00047	LG XI	1,33	2,02	
cCL3683Contig1	EREBP	MELO3C006430	scaffold00006	LG VI	1,09	2,02	
cCL1517Contig2	EREBP	MELO3C010840	scaffold00014	LG III	2,02	1,01	
cCL5563Contig1	EREBP	MELO3C019506	Scaffold00038	LG VI	3,76	-2,50	-6,22
cCL2560Contig1	EREBP	MELO3C013926	scaffold00021	LG VI	1,39	-1,87	-3,21
cCL5369Contig1	EREBP	MELO3C005466	scaffold00005	LG IX	2,64		-1,76
cHS_31-H10-M13R_c	EREBP	MELO3C004579	scaffold00003	LG V	1,60		-1,93
cPSI_33-G04-M13R_c	EREBP	MELO3C014261	scaffold00022	LG V	3,78		-3,78
cAI_17-E11-M13R_c	EREBP	MELO3C005941	scaffold00006	LG VI	1,62		-1,84
cA_06-C12-M13R_c	EREBP	MELO3C012896	scaffold00018	LG IV	3,07		-3,59
cCL400Contig1	EREBP	MELO3C005465	scaffold00005	LG IX	1,24		-2,12
cCL1726Contig1	EREBP	MELO3C012896	scaffold00018	LG IV	3,19		-3,72
c15d_38-B04-M13R_c	EREB	MELO3C016980	scaffold00029	LG VII	1,63		-2,02
cAI_32-C04-M13R_c	EREBP	MELO3C005629	scaffold00005	LG IX	3,14		-3,46
cAI_06-G09-M13R_c	EREBP	MELO3C006870	scaffold00006	LG VI	3,07		-2,90
cPS_21-G06-M13R_c	EREBP	MELO3C005630	scaffold00005	LG IX	3,78		-4,50
cPSI_17-E09-M13R_c	EREBP	MELO3C005747	scaffold00005	LG IX	2,89		-3,71
cAI_25-F05-M13R_c	EREBP	MELO3C009442	scaffold00011	LG IV	3,67		-3,70
cPS_17-D08-M13R_c	EREBP	MELO3C003002	scaffold01595	LG IX	1,25		-1,43
c46d_32-F06-M13R_c	EREBP	MELO3C015739	scaffold00026	LG I	-1,57		
cCL2943Contig1	EREBP	MELO3C008014	scaffold00007	LG VIII	2,15		-2,00
cCI_44-C10-M13R_c	EREBP	MELO3C015667	scaffold00025	LG II	1,40		-1,53
cFR14O9_c	EREBP	MELO3C010977	scaffold00014	LG III	2,13		-1,74
c46d_23-B11-M13R_c	EREBP	MELO3C024520	scaffold00068	LG VIII	-1,42		2,26
cA_32-C06-M13R_c	EREBP	MELO3C007657	scaffold00007	LG VIII	2,79		-3,07
cCI_54-E05-M13R_c	EREBP	MELO3C026024	scaffold00086	LG VIII	1,24		
c46d_36-H11-M13R_c	EREBP	MELO3C019590	scaffold00039	LG XI	-1,50		1,68
cCL2551Contig1	EREBP	MELO3C019763	scaffold00039	LG XI	-1,32		
cCL1534Contig2	EREBP	MELO3C016780	scaffold00029	LG VII	-1,95		1,37
cCL4666Contig1	EREBP	MELO3C006626	scaffold00006	LG VI	4,20		-3,62
	Other putative regulators						
cCL3226Contig1	NAC/NAM	MELO3C013641	scaffold00020	LG XI	-1,54	-2,00	
cCL5122Contig1	NAC/NAM	MELO3C012114	scaffold00016	-	3,98	1,02	-2,98
cCL1154Contig1	NAC/NAM	MELO3C016536	scaffold00028	LG VI	4,08	4,91	0,82
cA_12-H01-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C001959	scaffold00001	-		-1,06	-1,35
cCL5324Contig1	NAC/NAM	MELO3C017185	scaffold00030	LG II	1,40	1,43	
cA_25-D01-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C008056	scaffold00007	LG VIII		1,11	1,40
c15d_22-H03-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C024642	scaffold00069	LG II		1,53	
cPSI_35-E01-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C010555	scaffold00033	-		-2,18	-2,64
cPSI_26-F11-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C024560	scaffold00068	-	2,18		-1,52
cPS_34-F11-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C014505	scaffold00022	LG V	2,06		-1,66
cCI_17-H05-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C012215	scaffold00016	LG XI	-1,26		1,58
c15d_10-D11-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C014141	scaffold00021	LG VI	-1,35		1,07
cCL5589Contig1	NAC/NAM	MELO3C018237	scaffold00032	-	-1,76		1,09
cPSI_13-D08-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C004694	scaffold00004	LG XII	1,40		-1,45
cPSI_18-H09-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C017185	scaffold00030	LG II	1,10		
cAI_33-E11-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C014505	scaffold00022	LG V	3,65		-3,43
cCL4437Contig1	NAC/NAM	MELO3C012215	scaffold00016	LG X	-1,11		
cCL5609Contig1	NAC/NAM	MELO3C011164	scaffold00014	LG III	4,17		-4,41
cAI_23-A10-M13R_c	NAC/NAM	MELO3C024115	scaffold00065	LG I	1,27		-1,08
cCL5336Contig1	NAC/NAM	MELO3C022342	scaffold00052	LG XI	-2,65		1,83
cCL1112Contig1	NAC/NAM	MELO3C023195	scaffold00059	LG XI	1,12		
cCL2588Contig1	TAGL	MELO3C022205	scaffold00051	LG IX	1,82		-2,03
cCL3917Contig1	TPI	-	-	-	7,79	5,51	4,86
c46d_11-A08-M13R_c	MADS	MELO3C003778	scaffold01596	LG IV		1,33	
cCL3452Contig1	MADS	MELO3C011093	scaffold00014	LG III		2,35	-2,66
cPSI_24-C03-M13R_c	MADS	MELO3C018030	scaffold00031	LG VII		4,18	-4,47
c46d_03-F10-M13R_c	DET1	MELO3C006225	scaffold00006	LG VI	-1,33		-1,82
cA_23-H05-M13R_c	NYE1 or Staygreen2	MELO3C005616	scaffold00005	LG IX	2,08		-2,56

Apéndice A.12. Listado de genes expresados diferencialmente en las líneas SC3-5-1_6a, SC3-5-1_18a y PS de la familia de las quininas obtenida mediante MAPMAN. Se indica su código en Melonomics y la posición en el genoma, scaffold y GL.

Melogen ID	Melonomics ID	Scaffold	GL	SC3-5-1_6a vs PS (35DAP)	SC3-5-1_18a vs PS (35DAP)	SC3-5-1_18a vs SC3-5-1_6a (35DAP)
ccl3512contig1		-		-2,2461855		
cci_28-c12-m13r_c	MELO3C006097	scaffold00006	LG VI	-2,5307004	-2,676636	
ccl4787contig1	MELO3C002662	scaffold00001	LG XII	-4,180867		2,426439
cci_55-a10-m13r_c	MELO3C016579	scaffold00028	LG VI	-2,5526478		
ccl2802contig1	MELO3C013983	scaffold00021	LG VI	-3,585356	-3,6162188	
ccl4681contig1	MELO3C002504	scaffold00001	LG XII	-3,5661433	-2,094133	
cps_09-c10-m13r_c	MELO3C007367	scaffold00007	LG VIII	-2,3866591	-2,2109852	
cpsi_07-e11-m13r_c	MELO3C009089	scaffold00011	LG IV	-2,7901323		
chs_21-h10-m13r_c	MELO3C024236	scaffold00067	LG I	-2,7644124	-2,551713	
ca_14-e12-m13r_c	MELO3C002542	scaffold00001	LG XII	-2,030023		2,3962402
c46d_15-c12-m13r_c	MELO3C006961	scaffold00006	LG VI	-3,0901904		
cci_29-d08-m13r_c	MELO3C009223	scaffold00011	LG IV		-2,3193195	
chs_04-a11-m13r_c	MELO3C011836	scaffold00016	LG X		-2,000811	
cci_49-b11-m13r_c	MELO3C002102	scaffold00001	LG XII			-2,1963425
ccl5934contig1	MELO3C005261	scaffold00005	LG IX			2,177136
cfr18a14_c	MELO3C023218	scaffold00059	LG XI	-2,039058		
chs_23-a09-m13r_c	MELO3C021381	scaffold00047	LG XI	-2,0356607		
c46d_14-e06-m13r_c	MELO3C020817	scaffold00045	LG XI	-3,7306602		2,0085235
cpsi_36-a10-m13r_c	MELO3C016920	scaffold00029	LG VII		-2,144505	
ccl4765contig1	MELO3C019780	scaffold00040	LG III			-2,3453176
cci_28-c12-m13r_c	MELO3C006097	scaffold00006	LG VI	-2,5307004	-2,676636	
ccl4288contig1	MELO3C019939	scaffold00040	LG III	-4,0355535	-2,260729	
ccl4787contig1	MELO3C002662	scaffold00001	LG XII	-4,180867		2,426439
cps_40-f12-m13r_c	MELO3C020817	scaffold00045	LG XI	4,1345835		-5,4169464
ccl4743contig1	MELO3C006855	scaffold00006	LG VI	2,2347465		
c15d_03-g01-m13r_c	MELO3C010113	scaffold00012	LG II	-2,239595		2,5475445
ca_04-h12-m13r_c	MELO3C025882	scaffold00084	LG XI	-2,735614	-4,5645123	
cps_23-c05-m13r_c	MELO3C025722	scaffold00082	LG XI	4,590239		-4,67682
ccl5801contig1	MELO3C012268	scaffold00016	LG X	-2,868192		2,1829948
c46d_30-a01-m13r_c	MELO3C011283	scaffold00014	LG III	-3,5056462	-4,9818444	
cai_23-d10-m13r_c	MELO3C015524	scaffold00025	LG X	2,4601216		-3,3287642
c15d_32-d06-m13r_c	MELO3C005170	scaffold00005	LG IX	-3,2124462		
cci_54-e09-m13r_c	MELO3C026308	scaffold00090	-	4,500033		-3,9145305
ccl5510contig1	MELO3C015454	scaffold00025	LG II	-2,136971		2,4837492
cpsi_14-e08-m13r_c	MELO3C016920	scaffold00029	LG VII	-2,1206844		
ccl5296contig1	MELO3C009609	scaffold00011	LG IV	4,2817426		-3,9619513
cci_01-b06-m13r_c	MELO3C022040	scaffold00051	LG IX	-3,3782933		
c46d_15-c12-m13r_c	MELO3C006961	scaffold00006	LG VI	-3,0901904		
ca_37-b07-m13r_c	MELO3C017028	scaffold00029	LG VII	-2,3525374		
ca_23-e07-m13r_c	MELO3C017028	scaffold00029	LG VII	-2,0876248		
c46d_06-c09-m13r_c	MELO3C019939	scaffold00040	LG III	2,8023314	2,6006646	
ccl4288contig1	MELO3C002662	scaffold00001	LG XII	-4,0355535	-2,260729	
ccl4787contig1	MELO3C018552	scaffold00034	LG I	-4,180867		2,426439
cfr11b2_c	MELO3C003486	scaffold01596	LG IV	2,3816216	2,9858649	
cci_53-c11-m13r_c	MELO3C003486	scaffold01596	LG IV	-5,4920597	-2,5610285	2,9561007
ccl5118contig1	MELO3C011117	scaffold00014	LG III	-5,394015	-2,624113	2,7717319
c15d_24-a10-m13r_c	MELO3C006343	scaffold00006	LG VI	-5,8375783	-4,12119	
ccl5215contig1	MELO3C006343	scaffold00006	LG VI	-4,7427683		3,2097964
cci_19-g06-m13r_c	MELO3C015416	scaffold00025	LG X			-2,2036273
c46d_26-b02-m13r_c	MELO3C019939	scaffold00040	LG III			2,1969805
cai_20-h06-m13r_c	MELO3C002144	scaffold00001	LG XII		-2,012491	
cfr14f16_c	MELO3C002542	scaffold00001	LG XII	3,4133592		-2,5894375
cci_44-c01-m13r_c	MELO3C024236	scaffold00067	LG I	2,1257408		-2,9900987
cps_41-a10-m13r_c	MELO3C008445	scaffold00008	LG III	3,213396		
cpsi_11-d10-m13r_c	MELO3C008445	scaffold00008	LG III	2,3539517		
ca_27-e06-m13r_c	MELO3C008095	scaffold00008	LG III		2,6618447	

Apéndice A.13. Listado de genes expresados diferencialmente en las líneas SC3-5-1_6a, SC3-5-1_18a y PS de miembros del proceso de degradación mediada por el proteosoma, obtenida mediante MAPMAN. Se indica su código en Melonomics y la posición en el genoma, scaffold y GL.

Melogen ID	Melonomics ID	Scaffold	GL	SC3-5-1_6a vs PS (35DAP)	SC3-5-1_18a vs PS (35DAP)	SC3-5-1_18a vs SC3-5-1_6a (35DAP)
DUB						
cfr13j21_c	MELO3C011203	scaffold00014	LG III	-1,3800721		1,5854073
ccl3500contig1	MELO3C014526	scaffold00022	LG V	-1,4773918		1,1615765
cfr14d17_c	MELO3C014526	scaffold00022	LG V	-1,2327625		2,247631
ca_18-a10-m13r_c	MELO3C011097	scaffold00014	LG III	-1,4111505		1,2055919
cps_31-g09-m13r_c	MELO3C009558	scaffold00011	LG IV	-1,1411449		1,5098974
cci_60-b01-m13r_c	MELO3C009558	scaffold00011	LG IV	-1,3062291		1,3190643
ca_11-h11-m13r_c	MELO3C018182	scaffold00032	LG IV	-1,7220445		2,2133536
Ubiquitina						
ccl5798contig1	MELO3C025562	scaffold00080		-1,1907011		
chs_36-h07-m13r_c	MELO3C000376	scaffold00022	LG V	2,852745	2,2320642	
cci_06-g02-m13r_c	MELO3C004120	scaffold00003	LG V	-1,3953626		
cpsi_27-a11-m13r_c		scaffold00011	LG IV	2,3501213		
ccl558contig1	MELO3C025417	scaffold00078	LG VI	2,2983785		
Ligasa de ubiquitina						
cci_52-h07-m13r_c	MELO3C007990	scaffold00007	LG VIII	-3,781495		
cci_15-e10-m13r_c	MELO3C021512	scaffold00048	LG IX	-3,7311556		
ca_22-g01-m13r_c	MELO3C026960	scaffold00118		-2,1720042		
cpsi_27-e09-m13r_c	MELO3C026594	scaffold00098	LG IV	3,80748		
ccl4117contig1	MELO3C002240	scaffold00001	LG XII	-2,3889263		
cai_12-d01-m13r_c	MELO3C023546	scaffold00060	LG I	3,051009		-2,9200737
cci_52-e10-m13r_c	MELO3C002110	scaffold00001	LG XII	-3,7218084		3,9791207
ca_13-a05-m13r_c	MELO3C018740	scaffold00034	LG I	2,1783042		
ccl2302contig1	MELO3C010809	scaffold00014	LG III	-2,2793355		
ccl4582contig1	MELO3C021779	scaffold00049	LG XII	-3,2061968		
cps_04-f04-m13r_c	MELO3C026594	scaffold00098	LG IV	3,2112632		
cfr12o3_c	MELO3C016008	scaffold00026	LG I	4,2093596		
ccl2319contig1	MELO3C022726	scaffold00054	LG IV	-2,0813873		
c46d_26-f10-m13r_c	MELO3C024183	scaffold00066	LG I	-2,459008		
ccl2381contig1	MELO3C016008	scaffold00026	LG I	2,6126392		
cps_22-h03-m13r_c	MELO3C016008	scaffold00026	LG I	4,067794		
chs_22-d01-m13r_c	MELO3C013502	scaffold00020	LG XI	-2,8419597		
ccl5471contig1	MELO3C017047	scaffold00029	LG VII	2,1292474		
ccl650contig1	MELO3C006095	scaffold00006	LG VI	2,1313376		
ca_21-a05-m13r_c	MELO3C006615	scaffold00042	LG VI	2,3150876		
ccl4213contig1	MELO3C005058	scaffold00004	LG XII	-2,5305486		
RBX						
cai_21-b05-m13r_c		scaffold00025	LG II	3,013196		-2,6832626
F-BOX						
cci_12-a10-m13r_c	MELO3C005495	scaffold00005	LG IX	2,1584663		-2,377185
ccl4853contig1	MELO3C015898	scaffold00026	LG I	-2,454686		
cci_52-c07-m13r_c	MELO3C007404	scaffold00007	LG VIII	3,381191		-2,8578393
ccl4283contig1	MELO3C010335	scaffold00012	LG II	2,190986		
cci_64-f05-m13r_c	MELO3C005495	scaffold00005	LG IX	2,380385		-3,3028154
ccl1593contig2	MELO3C014507	scaffold00022	LG V	3,1040704		
cpsi_41-f05-m13r_c	MELO3C015287	scaffold00025	LG II	-2,2213132		
ccl4340contig1	MELO3C014876	scaffold00023	LG VI	-3,7630112		3,244501
ccl2437contig1	MELO3C008341	scaffold00008	LG III	2,7229116		
cpsi_08-g11-m13r_c	MELO3C006114	scaffold00006	LG VI	-2,167442		
cai_37-f02-m13r_c	MELO3C007321	scaffold00007	LG VIII	2,0330594		-3,7922642
ccl1593contig1	MELO3C014507	scaffold00022	LG V	3,264079		
cssh4n22_c	MELO3C008341	scaffold00008	LG III	-2,0373025		

Apéndice A.14. Listado de genes putativamente implicados en la maduración climática del fruto en la línea SC3-5-1. Se indica su código en las bases de datos de Melogen y Melonomic, su posición en el genoma, scaffold y grupo de ligamiento (GL), la expresión en log₂ observada en los experimentos de RNA-Seq y en la micromatriz y la significancia estadística de la diferencia de expresión génica según el método FDR ("false discovery rate"). RP= fruto maduro, UNRP= fruto inmaduro. Inf= infinito, valor que se obtiene cuando es el Log₂ 0, no existe expresión en una de las líneas.

Función	Melogene ID	Melonomic ID	Posición Genoma	GL	Expresión (log ₂)				FDR				Microarray
					PS RP - PS UNRP	SC RP - SC UNRP	PS RP - SC RP	PS UNRP - SC UNRP	PS RP - PS UNRP	SC RP - SC UNRP	PS RP - SC RP	PS UNRP - SC UNRP	
Síntesis etileno													
SAM	c15d_41-c10-m13r_c	MELO3C024471	scaffold00068	LG VIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAM	cc13787contig1	MELO3C012911	scaffold00018	LG IV	-1.34	-0.62	1.53	2.25	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	-1.27
cmACS2	cPSI_39-H08-M13r_c	MELO3C016340	scaffold00027	LG VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cmACS5	cSH1N10_c	MELO3C010779	scaffold00014	LG III	-	-0.10	-Inf	-Inf	-	FALSE	TRUE	FALSE	7.06
cmACS3	cA_02-A09-M13R_c	MELO3C007662	scaffold00007	LG VIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cmACO1	cFR15117_c	MELO3C014437	Scaffold00022	LG V	-	2.41	-Inf	-Inf	-	TRUE	TRUE	TRUE	4.84
cmACO1	cL451Contig1	MELO3C014437	Scaffold00022	LG V	-	2.41	-Inf	-Inf	-	TRUE	TRUE	TRUE	5.15
cmACO1	cA_04-F11-M13R_c	MELO3C014437	Scaffold00022	LG V	-	2.41	-Inf	-Inf	-	TRUE	TRUE	TRUE	-
cmACO2	cA_01-G05-M13R_c	MELO3C004619	Scaffold00003	LG V	-4.22	-Inf	Inf	2.05	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-
cmACO2	cL4919Ccontig1	MELO3C004619	Scaffold00003	LG V	-4.22	-Inf	Inf	2.05	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-
cmACOS	cL3430Ccontig1	MELO3C019735	scaffold00039	LG XI	1.27	0.78	-2.49	-2.99	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	1.51
Percepción etileno													
cmETR2	cC11270Contig1	MELO3C006451	scaffold00006	LG VI	-1.68	0.42	-3.11	-1.02	TRUE	FALSE	TRUE	FALSE	-
cmETR1	cA_22-B04-M13R_c	MELO3C012652	Scaffold00017	LG I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTR1	cL1444Ccontig1	MELO3C009433	scaffold00011	LG IV	-1.07	0.12	-0.64	0.55	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-
EN3	cL4283Ccontig1	MELO3C010335	scaffold00012	LG II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATH	cPSI_11-E04-M13R_c	MELO3C026738	scaffold00104	-	-Inf	0.77	-Inf	0.03	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	3.22
Regulación transcripcional													
ERBP	cC11118Contig1	MELO3C007267	scaffold00007	LG VIII	-0.02	-0.53	0.83	0.32	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-2.77
ERBP	cC13840Contig1	MELO3C011572	scaffold00015	LG III	0.75	0.46	3.25	3.06	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-1.70
ERBP/APETALA2	cC13475Contig1	MELO3C022181	scaffold00051	LG IX	1.51	-Inf	Inf	2.16	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-2.88
ERBP	cC13293Contig1	MELO3C017940	scaffold00031	LG VII	-0.98	2.43	-4.40	-0.99	FALSE	FALSE	TRUE	FALSE	1.71
ERBP	cC15010Contig1	MELO3C017940	scaffold00031	LG VII	-0.98	2.43	-4.40	-0.99	FALSE	FALSE	TRUE	FALSE	2.42
ERT	cC16170Contig1	MELO3C004553	scaffold00003	LG V	Inf	1.71	-0.95	-Inf	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	2.33
ERBP	cPS_28-E11-M13R_c	MELO3C005629	scaffold00005	LG IX	-	-	-	-	-	-	-	-	6.83
ERBP	cC13743Contig1	MELO3C021306	scaffold00047	LG XI	-1.64	1.09	-2.36	0.36	FALSE	FALSE	TRUE	FALSE	2.02
ERBP	cC13683Contig1	MELO3C006430	scaffold00006	LG VI	-Inf	Inf	-Inf	Inf	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	2.02
ERBP	cC11517Contig2	MELO3C010840	scaffold00014	LG III	1.41	1.04	1.71	1.34	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	1.01
Otros reguladores													
NAC/NAM	cC13226Contig1	MELO3C013641	scaffold00020	LG XI	-3.18	-	Inf	Inf	FALSE	-	FALSE	FALSE	-2.00
NAC/NAM	cC15122Contig1	MELO3C012114	scaffold00016	-	-	Inf	-Inf	-	-	FALSE	FALSE	-	1.02
NAC/NAM	cC11154Contig1	MELO3C016536	scaffold00028	LG VI	0.44	1.75	-4.00	-2.69	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	4.91
NAC/NAM	cA_12-H01-M13R_c	MELO3C001959	scaffold00001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1.06
NAC/NAM	cC15324Contig1	MELO3C017185	scaffold00030	LG II	Inf	-0.06	-0.99	-Inf	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	1.43
NAC/NAM	cA_25-D01-M13R_c	MELO3C008056	scaffold00007	LG VIII	-0.45	-0.35	-0.74	-0.65	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	1.11
NAC/NAM	c15d_22-H03-M13R_c	MELO3C024642	scaffold00069	LG II	-Inf	-Inf	-	0.16	FALSE	FALSE	-	FALSE	1.53
TAGL	cC12588Contig1	MELO3C022205	scaffold00051	LG IX	-	-	-	-	-	-	-	-	-2.18
TPI	cC13917Contig1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.51
MADS	cA6d_11-A08-M13R_c	MELO3C003778	scaffold01596	LG IV	-	-0.95	-Inf	-Inf	-	FALSE	FALSE	FALSE	1.33
MADS	cC13452Contig1	MELO3C011093	scaffold00014	LG III	-	-	-	-	-	-	-	-	2.35
MADS	cPSL_24-C03-M13R_c	MELO3C018030	scaffold00031	LG VII	-	-	-	-	-	-	-	-	4.18
DET1	cA6d_03-F10-M13R_c	MELO3C006225	scaffold00006	LG VI	-Inf	-0.10	-Inf	-1.16	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-
DET1	cA_23-H05-M13R_c	MELO3C005616	scaffold00005	LG IX	Inf	1.69	-1.87	-Inf	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE	-
Ubiquitina Proteasa	cfr13j21_c	MELO3C011203	scaffold00014	LG III	0.99	-0.75	-1.19	-2.94	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-
Ubiquitina Proteasa	ca_18-a10-m13r_c	MELO3C011097	scaffold00014	LG III	-2.09	-1.68	-1.16	-0.75	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-
Ubiquitina Proteasa	cc12302contig1	MELO3C010809	scaffold00014	LG III	-0.29	-0.60	1.05	0.75	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	-
Receptor quinasa	c46d_30-a01	MELO3C011283	scaffold00014	LG III	-	-Inf	-	-Inf	-	FALSE	-	FALSE	-2.41
Receptor quinasa	cc15118contig1	MELO3C003486	scaffold00014	LG III	1.88	-Inf	Inf	0.42	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	2.18

Apéndice A.15. Lista de proteínas NAC de función conocida pertenecientes a distintas especies con su número de accesión en Genebank y la referencia del trabajo en el que fueron descritas. Con un guión (-) se indican aquellas que no se encuentran depositadas en la base de datos del Genebank.

Gen	Genebank ID	Especie	Referencia
CitNAC	ABM67699	<i>Citrus sinensis</i>	Liu et al. 2009
MaNAC2	-	<i>Musa acuminata</i>	Shan et al. 2012
ATAF1	NP_171677	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Theologis et al 2000
ATAF2	NP_680161	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Entrega directa
SNAC1	ABD52007	<i>Oryza sativa</i>	Hu et al. 2006
AtNAC2	NP_188170	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Salanoubat et al. 2000
NAM-B1	ABI94353	<i>Triticum dicoccoides</i>	Uuay et al. 2006
AtNAP	NP_564966	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Theologis et al. 2000
TIP	AAF87300	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ren et al. 2000
NST1	NP_182200	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lin et al. 1999
NST2	NP_191750	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Salanoubat et al. 2000
NST3	NP_174554	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Theologis et al. 2000
NAC1	AAF21437	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Xie et al. 2000
SLNAM	NP_200206	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Entrega directa
CUC1	BAB20598	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Takada et al. 2001
CUC2	BAA19529	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aida et al. 1997
PvNAP	AAK84884	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tucker et al. 2002
NOR	NP_001234652	<i>Solanum lycopersicum</i>	US 6,762,347 B

