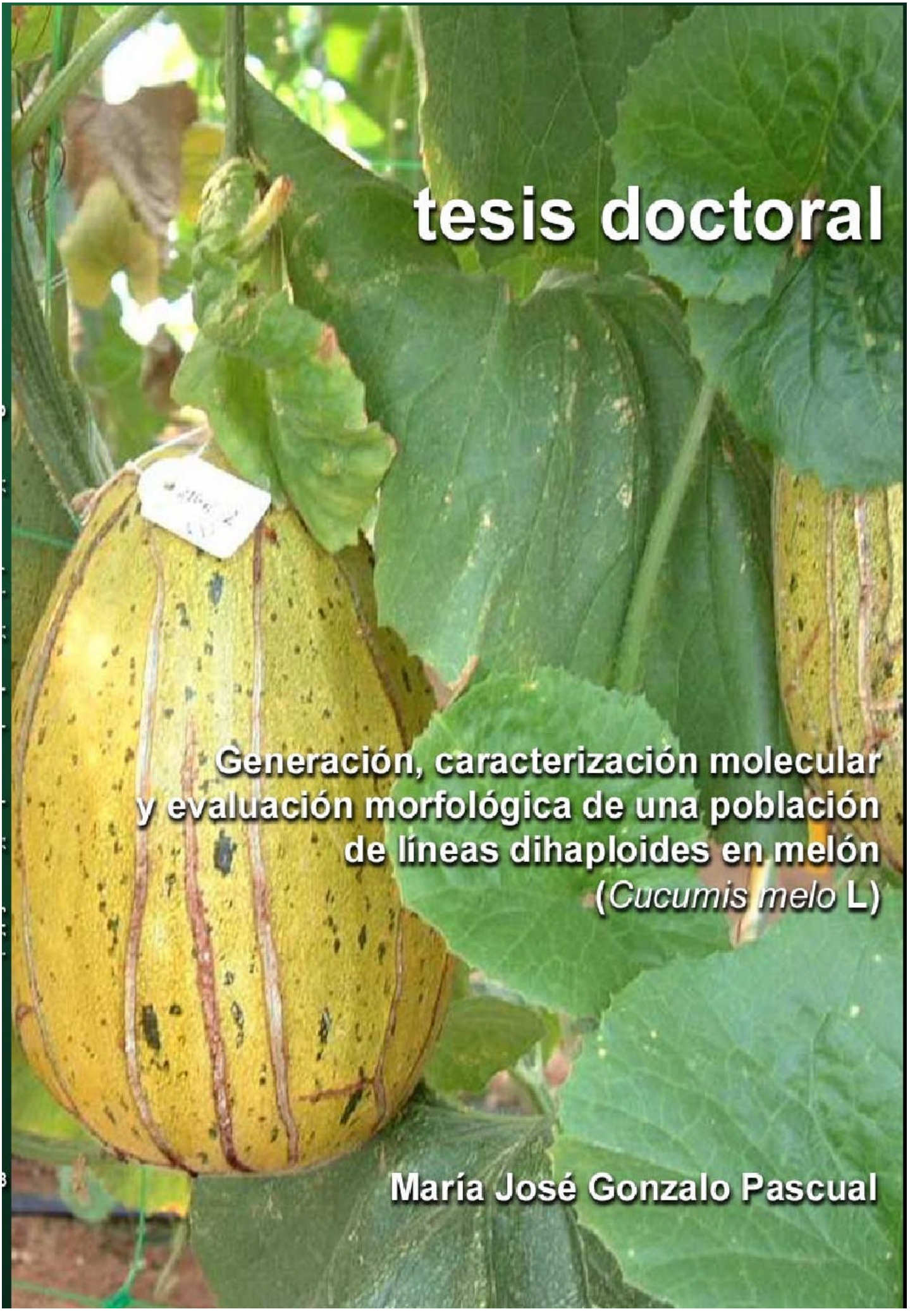


tesis doctoral

Generación, caracterización molecular y evaluación morfológica de una población de líneas dihaploides en melón (*Cucumis melo* L)

María José Gonzalo Pascual

Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària
Departament de producció Vegetal i Ciència Forestal

Generación, caracterización molecular y evaluación morfológica de una población de líneas dihaploides en melón (*Cucumis melo* L.).

Memoria presentada por:

María José Gonzalo Pascual

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Lleida, Licenciada en Ciencias Biológicas

Tesis realizada bajo la dirección de los Drs. Ramon Dolcet-SanJuan y Antonio José Monforte Gilabert en el departamento de Genètica Vegetal del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA).

Los directores | El Tutor | La autora

Dr. Ramón Dolcet-SanJuan | Dr. Antonio J Monforte | Dr. Juan A Martín-Sánchez | M José Gonzalo

Lleida, 14 de Octubre 2003

Agradecimientos

Con estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y acompañado en la realización de este trabajo:

En primer lugar, a mis directores Dr. RAMÓN DOLCET-SANJUÁN y Dr. ANTONIO MONFORTE GILABERT por su apoyo, dedicación, soporte, consejos y la gran ayuda que me han dado durante estos años.

Al IRTA por la beca pre-doctoral que me ha permitido realizar esta tesis y al Dr. PERE ARÚS jefe del departamento de Genética Vegetal del IRTA de Cabrils, donde he estado estos 4 años.

Al Dr. JUAN ANTONIO MARTÍN–SÁNCHEZ por aceptar la tutoría de este trabajo.

A todos los compañeros del IRTA de Cabrils, en especial:

A los del departamento de cultivo in vitro por las charlas en las cámaras y hacer que todas las horas de trabajo fueran mucho más agradables y pasaran volando: Dr. ENRIC MELE, Dra QUIMA MESSENGUER, Dra VICTORIA MARFA (por los viajes a la estación, la compañía, los buenos consejos y las ayudas de traducción), ELENA (gracias a ella nunca me ha faltado nada en el laboratorio y por todos los viajes a Barcelona), TOÑI, SANDRA, GISELA, ROGER, MARTA, JOSE ('la Jose',por todas las semillitas abiertas y la compañía en los cafecitos después de comer) y a los que participaron en algún momento en la difícil búsqueda de embriones. Especialmente a MANOLI por los buenos ratos de risas, los viajes y los botes y botes de medio; a ELISABETH por la acogida como si fuera de la familia y por todo lo que a trabajado no solo en la tesis, también le han tocado mudanzas, compras, y aguantarme muchos fines de semana; y a ANGEL V., inseparables desde el primer día, por esos paseos para conocer Catalunya y los fines de semana al borde del mar.

A los del departamento de Biología Molecular: Dr. JORDI GARCIA-MAS, Dr. WERNER HOWAD, Dra. AMPARO MONFORT, Dr. TORBEN JAHRMANN por los consejos y ánimos; TRINI, VANESA, FUENSI (gracias a ellas nunca me ha faltado ayuda, ni un sitio en el laboratorio) y MÓNICA (juntas desde el principio en el IRTA) por todos esos divertidos y nutritivos desayunos que hemos disfrutado. ANGEL M (porque aunque a veces se hace el remolón siempre me ha ayudado); Mourad (compañero de exilio en 'la casita de becarios'); NURIA e IBO ('Dr. Melón') que han colaborado mucho en la parte molecular de este trabajo y han pasado mucho calor recogiendo florecitas.

Al personal de IrtaGen: Dr. JORDI BALLESTER, Dra IMMA FOLCH, que me dieron la oportunidad de compartir con ellos los últimos meses en el laboratorio, por sus consejos y apoyo, especialmente a ESTEVE por su gran ayuda en la realización de la portada.

Al colectivo de becarios-precarios, por los buenos ratos de descanso, que siempre hacen más fácil las largas horas pasadas en el centro y más divertidas, por todo el ánimo que me han dado y por los buenos momentos extra-laborales: MERI, CRISTINA, SONIA, MIGUEL, MIREIA, JOB, ENRIC y PEPA (los que están y los que pasaron por aquí, que seguro que se me olvida alguno). Especialmente a JORDI, EULALIA y MONTSE por los viernes socio-culturales y los vermutillos de los domingos.

A todos los amigos que me han estado apoyando desde la distancia:

MARIAN por todas esas incursiones al mundo Barceloní y alrededores y por no obligarme nunca a comer de esas tortitas 'tan buenas' y JOSE (el Jose) por sus historias que siempre son tan curiosas.

LAURA V., SANTIAGO, CARLITOS 'Paturuzú', MATA, OSCAR, LAURA S, LUIS, ROSA y el resto de la cuadrilla de Zaragoza que siempre han estado dándome ánimos y por enseñarme el Pirineo Aragonés. NERY, PILAR, ANTONIO y por supuesto AFIF, que aunque no nos veamos mucho siempre está ahí para lo que sea y MERTXE, YOLA, TXOSSE, MARICARMEN y ALICIA que después de tantos años cuando nos vemos es como si no hubiera pasado el tiempo.

AINHOA, EIDER, NEKANE, KARLOS, TXARLY, MAIKO, RAMÓN, JUANTXO y ANA, la cuadrilla de Donosti, que nunca me han dejado sola, han venido a visitarme siempre que han podido, me han mantenido informada para que no me sintiera lejos de casa y han celebrado por todo los alto todos los regresos (que han sido bastantes). Y por supuesto al nuevo miembro BEÑAT, que nos va a tener que aguantar mucho a todos sus osabas-izebas (que no le pase nada!).

A JULIO, por su apoyo y animo durante todo este tiempo, a pesar de la distancia. Y por ayudarme a contar aquellas semillas (que hubiera sido de la tesis si no.....).

A toda mi familia, por su apoyo incondicional en todas mis decisiones y su cariño (que remedio, para que esta la familia!!!). A mis padres, JULIÁN y CELINA, a mi hermana MERTXE, JOSE LUIS mi cuñado y al rey de la casa JULEN que nos ha llenado de alegría. A mi otro ahijado JON que todavía se acuerda de mí, aunque casi no me ve. A mis primos a pesar de machacarme por ser la última del concurso, pero me resarciré. Y a mis tios/as que siempre están ahí para lo que necesite a pesar de que sea un poco arisca e independiente, en especial a TIMO e ISAÍAS por acogerme como una hija.

RESUM

El meló (*Cucumis melo L.*) és una espècie vegetal de gran importància econòmica, amb la que s'han establert nombrosos programes de millora. Dins d'ells, és de gran importància la utilització de línies pures, la seva obtenció ha avançat en gran mesura per la utilització de tècniques de biotecnologia, entre les que es troben, l'obtenció de poblacions de línies diphaploids i els marcadors moleculars.

La producció de línies haploids diploiditzades, disminueix el temps de generació necessari per a obtenir individus completament homozigots a una mateixa generació. Així mateix, la naturalesa homozigòtica d'aquestes línies i el seu potencial per a ser perpetuades il·limitadament per llavor, fan de les poblacions de línies dihaploids, siguin molt útils per a estudis genètics com la generació de mapes genètics, on els marcadors dominants i codominants poden ser mapats amb idèntica precisió. Així mateix, la disponibilitat de material vegetal, genèticament idèntic de manera il·limitada, fa possible que es puguin afegir nous marcadors a mesura que es vagin generant i que aquestes poblacions siguin molt útils per a la localització de gens majors i QTLs (Quantitative Trait Loci), podent-se estudiar, al mateix temps, genotips en diferents localitzacions i estudiar-se la interacció genotip per ambient (GxE).

En aquest treball es va estudiar la resposta partenogènica de varis genotips de meló, donat que s'havia descrit la importància del genotip en l'obtenció de LDHs. Després d'aquest estudi es va poder descriure 3 passos limítrofs en el procés d'obtenció de LDHs: Eficàcia en l'obtenció d'embrions a partir de llavors de fruits partenocàrpics, supervivència dels embrions en el procés de cultiu *in vitro* i obtenció de línies diploiditzades, perpetuades per llavor a partir d'aquests embrions. Es va observar diferent comportament en els genotips estudiats en cadascun dels passos limítrofs definits per a el procés. Posteriorment es va generar, per partenogènesis induïda *in situ* per polinització amb pol·len irradiat, una població de 95 línies dihaploids (LDHs) a partir del creuament de dos línies de meló, PI161375 x T111. Aquestes dos línies es van escollir per presentar característiques agronòmiques importants. La línia T111 pertany a la varietat botànica *inodorus*, del tipus "Piel de Sapo" és una de les línies més consumides a Espanya, mentres que PI161375 "Sogwhan Charmi", pertany a la varietat botànica *chinensis*, presenta nombroses resistències a malalties. Les línies de la població van ser analitzades per marcadors moleculars del tipus codominant (RFLPs i SSRs) per a determinar la seva homozigòsis i es va determinar el seu nivell de ploidia per citometria de flux.

A partir de la població de LDHs es va realitzar un mapa genètic, transferint marcadors moleculars codominants d'alta qualitat del tipus RFLPs i SSRs que ja havien estat posicionats en el mapa F_2 obtingut a partir del mateix creuament i es van incloure 54 nous marcadors del tipus SSR. Es va obtindre un mapa amb 169 marcadors moleculars codominants de grups de lligament, cobrint una distància de 1289.6cM. La densitat de mapa va ser de 7.6cM/marcadors. L'ordre dels marcadors es va mantenir al comparar-lo amb altres mapes de meló existents i amb el mapa realitzat a partir d'una població F_2, el que demostra la consistència del mapa genètic obtingut, permet utilitzar-lo com a mapa de referència per a posteriors estudis amb aquesta espècie i la integració dels dos mapes obtinguts a partir del creuament PI161375 x T111. Integrant es va obtenir un mapa altament saturat amb 331 marcadors codominants que es van distribuir en dotze grups de lligament, cobrint tot el genoma de meló, amb una densitat de 3.02cM/marcador i que van cobrir una distància de 1061cM.

Es va estudiar, també, la segregació de les freqüències aléliques dels marcadors utilitzats en la generació del mapa de la població de LDHs per a identificar zones distorsionades que poguessin estar implicades en el procés d'obtenció d'haploids. Es van observar 6 zones que van presentar distorsió de les freqüències aléliques. Aquestes zones serien candidates a incloure gens que són seleccionats en el procés de generació de LDHs. En 2 d'aquestes zones la segregació va ser favorable a l'al.lel del parental PI161375 i en altres 4 la distorsió va ser favorable a l'al.lel de T111, el que indicaria que els dos parentals influeixen en el procés de generació de les línies dihaploids.

Finalment, es van estudiar diferents caràcters quantitatius implicats en la morfologia floral, morfologia del fruit i la germinació, localitzant 71 QTLs, per a tots els caràcters analitzats. L'alta correlació observada entre la forma de l'ovari i el fruit i la co-localització dels QTLs implicats en aquest caràcters, suggereix que la forma del fruit ve determinada per la forma de l'ovari, és a dir, que els mateixos gens controlen ambdós caràcters, i la forma del fruit ve determinada en les primeres etapes de desenvolupament. També va permetre dividir el caràcter d'herència poligènica, el que explicaria l'aparició de genotips intermitjos en les classificacions taxonòmiques realitzades. Es van trobar, així mateix, QTLs relacionats amb la germinació de les LDHs que ens indiquen que els gens que intervenen en els processos relacionats amb la germinació s'expressen en les primeres etapes del procés, que existeixen al.lels

de PI161375 amb efectes favorables a la germinació i que existeix un important efecte ambiental relacionat amb la llum, observant que amb presència de llum un major porcentatge de germinació.

RESUMEN

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie vegetal de gran importancia económica, en la que se han establecido numerosos programas de mejora. En ellos es de gran importancia la utilización de líneas puras, cuya obtención ha avanzado en gran medida por la utilización de técnicas de biotecnología entre las que se encuentran la obtención de poblaciones de líneas dihaploides y los marcadores moleculares.

La producción de líneas haploides diploidizadas disminuye el tiempo de generación necesario para obtener individuos completamente homocigotos a una generación. Así mismo, la naturaleza homocigótica de estas líneas y su potencial para ser perpetuadas ilimitadamente por semilla, hacen a las poblaciones de líneas dihaploides muy útiles para estudios genéticos como la generación de mapas genéticos, donde los marcadores dominantes y codominantes pueden ser mapados con igual precisión. Así mismo, la disponibilidad de material vegetal genéticamente idéntico de forma ilimitada hace posible que se puedan añadir nuevos marcadores a medida que se vayan generando y que estas poblaciones sean muy útiles para la localización de genes mayores y QTLs (Quantitative Trait Loci), pudiendo estudiarse el mismo genotipo en diferentes localizaciones y estudiarse la interacción genotipo por ambiente (GxE).

En este trabajo se estudió la respuesta partenogénica de varios genotipos de melón, ya que se había descrito la importancia del genotipo en la obtención de LDHs. Tras este estudio se pudieron describir 3 pasos limitantes en el proceso de obtención de LDHs: Eficacia en la obtención de embriones a partir de semilla de frutos partenocárpicos, supervivencia de los embriones en el proceso de cultivo *in vitro* y obtención de líneas diploidizadas, perpetuadas por semilla a partir de estos embriones. Se observó diferente comportamiento de los genotipos estudiados en cada uno de los pasos limitantes definidos para el proceso. Posteriormente se generó, por partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado, una población de 95 líneas dihaploides (LDHs) a partir del cruzamiento de dos líneas de melón, PI161375 x T111. Estas dos líneas se eligieron por presentar características agronómicas importantes. La línea T111 perteneciente a la variedad botánica *inodorus*, de tipo 'Piel de Sapo' es una de las líneas más consumidas en España mientras que PI 161375 'Sogwhan Charmi', perteneciente a la variedad botánica *chinensis*, presenta numerosas resistencias a enfermedades. Las líneas de la población fueron analizadas por marcadores moleculares de tipo codominante (RFLPs y SSRs) para determinar su homocigosis y se determinó su nivel de ploidía por citometría de flujo.

A partir de la población de LDHs se realizó el mapa genético, transfiriendo marcadores moleculares codominates de alta calidad de tipo RFLPs y SSRs que ya habían sido posicionados en el mapa F_2 obtenido a partir del mismo cruce y se incluyeron 54 nuevos marcadores de tipo SSR. Se obtuvo un mapa con 169 marcadores que se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento, cubriendo una distancia de 1289.6cM. La densidad de mapa fue de 7.6cM/marcador. El orden de los marcadores se mantuvo al compararlo con otros mapas de melón existentes y con el mapa realizado a partir de una población F_2, lo que demuestra la consistencia del mapa genético obtenido, permitiendo emplearlo como mapa de referencia para posteriores estudios en esta especie y la integración de los dos mapas obtenidos a partir del cruce PI161375 x T111. Integrando se obtuvo un mapa altamente saturado con 331 marcadores codominantes que se distribuyeron en doce grupos de ligamiento cubriendo todo el genoma de melón, con una densidad de 3.02cM/ marcador y que cubrieron una distancia de 1061cM.

Se estudió también la segregación de las frecuencias alélicas de los marcadores utilizados en la generación del mapa de la población de LDHs para identificar zonas distorsionadas que pudieran estar implicadas en el proceso de obtención de haploides. Se observaron 6 zonas que presentaron distorsión de las frecuencias alélicas. Estas zonas serían candidatas de incluir genes que son seleccionados en el proceso de generación de LDHs. En 2 de estas zonas la segregación fue favorable al alelo del parental PI161375 y en las otras 4 la distorsión fue favorable al alelo de T111, lo que indicaría que los dos parentales influyen en el proceso de generación de las líneas dihaploides.

Finalmente, se estudiaron diferentes caracteres cuantitativos implicados en la morfología floral, morfología de fruto y la germinación, localizando 71 QTLs, para todos los caracteres analizados. La alta correlación observada entre la forma de ovario y fruto y la co-localización de los QTLs implicados en estos caracteres sugiere que la forma

del fruto esta determinada por la forma del ovario, es decir, que los mismos genes controlan ambos caracteres, y la forma de fruto se determina en etapas tempranas del desarrollo. También permitió dividir el carácter de la pubescencia del ovario en dos componentes, longitud y densidad, confirmando que se trata de un carácter de herencia poligénica lo que explicaría la aparición de fenotipos intermedios en las clasificaciones taxonómicas realizadas. Se encontraron, así mismo, QTLs relacionados con la germinación de las LDHs que nos indican que los genes que intervienen en los procesos relacionados con la germinación se expresan en las primeras etapas del proceso, que existen alelos de PI161375 con efectos favorables a la germinación y que existe un importante efecto ambiental relacionado con la luz, observándose en presenc ia de luz un mayor porcentaje de germinación.

ABSTRACT

Melon (*Cucumis melo* L.) is an important vegetal crop; with large number of breeding programs already established. In these programs, the use of inbred lines is very important; the process to obtain these lines can be enhanced with the use of biotechnology techniques as the generation of dihaploid lines population and molecular markers.

DHLs production decreased the generation time needed to obtain complete homocigous plants to one generation. The homocigosity potential to be perpetuated by seed, make DHLs populations an useful tool for genetics studies, as genetic map construction, where the dominants and codominants markers can be mapped with the same precision. Also, the possibility to dispose unlimited material genetically identical make possible to add news markers as soon as they are generated, the localization of major genes and QTLs (Quantitative trait loci) and study the genotype by environment (GxE) interaction by evaluating the same genotype in different locations.

The parthenogenetic response of several melon genotypes was studied. As reported by other authors the genotype had an important effect on the production of DHLs. Three limiting steps were found in the DHLs production process: (1) the parthenogenic embryo production efficiency from parthenocarpic fruits; (2) the in vitro rescue efficiency of parthenogenic embryos; and (3) the production of diploid lines, perpetuated by seed, out of the rescued embryos. For each of these limiting steps, different behaviours were observed on the studied genotypes. Moreover, a population of 95 DHLs was generated from the PI161375 x T111 hybrid, utilizing the *in situ* induction of parthenogenic embryos through pollination by gamma-irradiated pollen. The two parents were chosen for their important agronomic traits. The T111 line, pertaining to *inodorus* botanic variety, of fruit type 'Piel de Sapo', is one of the most consumed in Spain. Whereas, PI 161375 or 'Sogwhan Charmi', pertaining to the *chinensis* botanical variety, has a large number of disease resistances. Presumed parthenogenic lines were analyzed by codominants molecular markers (RFLPs and SSRs) to confirm their homocigosity, and by flow citometry to determine their ploidy level.

A molecular markers map, involving RFLP and SSRs mapped previously in a F_2 population from the same cross, was constructed using the DHL population. 54 new SSRs markers were added to the DHL map. A map with 169 markers distributed in twelve linkage groups was obtained with a distance coverage of 1286 cM. The map density was 7.6cM/marker. The order of markers was maintained when compared with other melon maps and with the F_2 map. This fact proved the consistence of obtained genetic map, allowing their use as a reference map for later studies in this specie and permitting the integration of the two maps obtained from the cross PI161375 X T111. After integration, a highly saturated map with 331 codominats markers, covering the whole genome was obtained. Markers were distributed in twelve linkage groups with a density of 3.02cM/marker covering a distance of 1061cM.

Allelic frequency segregation of markers in DHLs population map was studied to identify genomic regions with segregation distortion. Six regions were observed which could include genes selected during DHLs generation process. Two of the regions showed favourable segregation towards PI 161375 alleles and in the other four the segregation was favourable towards T111 alleles. This confirms the influence of both parentals in the DHLs generation process.

Finally, a study of several quantitative traits involved in floral and fruit morphology and germination of melon was realized. Seventy-one QTLs were localized for all analysed traits. The high correlation observed between ovary and fruit shape and the co-localization of QTLs involved in these traits suggests that the fruit shape was determined by ovary shape, i.e., the same genes control both traits and the fruit shape is determinated in the early period of development. Also, this analysis allowed to divide ovary pubescence trait in two components, hair length and density, and also confirming that this trait is under polygenic control. This could explain the apparition of intermediate phenotypes in the taxonomic classifications by others authors. In addition, QTLs related with germination were found, indicating that the genes involved in germination are expressed in the first steps of the process. PI161375 alleles with favourable effect in germination were uncovered. Light intensity during germination has a major effect on the percentage of seed germination, being higher light intensity associated with higher percentage of germination.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN 4
1.1 El melón 4
1.1.1.- Importancia económica 4
1.1.2 .- Origen y taxonomía. 5
1.1.3.- Características botánicas y agronómicas 7
1.1.4.- Mejora genética del melón 9
1.2.- Haploides y líneas dihaploides (LDHs) 11
1.2.1 - Métodos de inducción de haploides 12
1.2.2.- Antecedentes en la producción de haploides de melón. Metodologías utilizadas y resultados obtenidos 15
1.3.- Marcadores genéticos 16
1.3.1.- Tipos de marcadores 16
1.3.2.- Aplicaciones de los marcadores moleculares 21
1.3.2.1.- Identificación varietal y variabilidad genética 21
1.3.2.2.- Test de parentesco 22
1.3.2.3.- Construcción de mapas genéticos y físicos 22
1.3.2.4.- Bulked Segregant Analysis (BSA) 24
1.3.2.5.- Clonación posicional 25
1.3.2.6.- Análisis de caracteres cuantitativos. 25
1.3.2.7.- Selección asistida por marcadores 28
2.- OBJETIVOS 32
3.-MATERIAL Y MÉTODOS 36
3.1.- Material vegetal 36
3.2.- Producción de plantas haploides y LDHs 38
3.2.1.- Irradiación del polen 40
3.2.2.- Polinización de plantas madre 40
3.2.3.- Rescate de embriones por cultivo *in vitro* 40
3.2.4.- Clonación *in vitro* de las plantas haploides 41
3.2.5.- Determinación del nivel de ploidía 42
3.2.6.- Duplicación del número cromosómico 43
3.2.7.- Mantenimiento in vitro de la población dihaploide 44
3.2.8.- Aclimatación 44
3.2.9.- Autofecundación y obtención de LDHs 45
3.3.- Determinación de la homocigosis de las LDHs 45
3.4.- Marcadores moleculares 46
3.4.1.- RFLPs 46
3.4.1.1.- Extracción de ADN 46
3.4.1.2.- Digestión de ADN con enzimas de restricción 49
3.4.1.3.- Electroforesis 50
3.4.1.4.- Transferencia del ADN a soporte sólido 51
3.4.1.5.- Hibridación de las membranas y detección de las sondas 52
3.4.2.- SSRs 55
3.4.2.1.- Métodos de detección de SSR 58
3.4.2.1.1.- Método radiactivo 58
3.4.2.1.2.- Método no radiactivo 59

3.4.3.- Otros marcadores 60
3.5.- Análisis de ligamiento 60
3.5.1.- Determinación del polimorfismo entre parentales 60
3.5.2.- Construcción de un mapa genético 61
3.5.3.- Integración de mapas 62
3.5.4.- Estudio de la segregación alélica 62
3.6.- Análisis de QTLs 63
3.6.1.- Material vegetal 63
3.6.2.- Caracteres de morfología floral 64
3.6.3.- Caracteres de morfología de fruto 66
3.6.4.- Caracteres relacionados con la germinación de las LDHs 66
3.6.5.- Análisis estadísticos 67
4.- RESULTADOS 70
4.1.- Generación y evaluación molecular de una población de líneas dihaploides (LDHs) en melón (*Cucumis melo* L.), mediante partenogénesis inducida in situ por polinización con polen irradiado 70
4.1.1.- Respuesta de diferentes variedades de melón a la partenogénesis 70
4.1.2.- Generación de una población de LDHs 75
4.1.2.1.- Rescate in vitro de embriones partenogénicos 75
4.1.2.2.- Estudio del nivel de ploidía por citometría de flujo 77
4.1.2.3.- Determinación de la homocigosis de las LDHs por marcadores moleculares 77
4.1.2.4.- Fertilidad de las líneas haploides diploidizadas 79
4.2.- Construcción de un mapa genético de melón a partir de la población de líneas dihaploides, empleando marcadores moleculares RFLPs y SSRs 81
4.2.1.- Polimorfismo entre parentales con marcadores de tipo SSR 81
4.2.2.- Análisis de ligamiento 81
4.2.3.- Integración de mapas 89
4.2.3.1.- Mapa con marcadores dominantes y codominantes 89
4.2.3.2.- Mapa con marcadores codominantes de calidad 94
4.2.4.- Segregación de las frecuencias alélicas 99
4.3.- Estudio de las características de morfología floral, morfología de fruto y germinación de las LDHs y localización de QTLs implicados en estos caracteres en el mapa genético de melón 102
4.3.1.- Distribución de los caracteres cuantitativos 102
4.3.1.1.- Características de morfología floral 102
4.3.1.2.- Características de morfología de fruto 109
4.3.1.3.- Características de germinación de las LDHs 111
4.3.2.- Correlación entre caracteres 116
4.3.3.- Localización y caracterización de QTLs 118
4.3.3.1.- Características de morfología floral 118
4.3.3.2.- Características de morfología de fruto 125
4.3.3.3.- Caracteres relacionados con la germinación 127
5.- DISCUSIÓN 138
5.1.- Respuesta a la partenogénesis de diferentes variedades de melón 138
5.2.- Generación de una población de líneas dihaploides 140
5.3.- Polimorfismo entre parentales con marcadores de tipo SSR 142
5.4.- Generación del mapa genético 143
5.5.- Segregación de las frecuencias alélicas 145
5.6.- Identificación de QTLs implicados en caracteres de morfología floral, de fruto y germinación de las LDHs 146
6.- CONCLUSIONES 154

7.- BIBLIOGRAFIA 158
ANEXO 1 174
ANEXO 2 178

ÍNDICE FIGURAS

Fig. 1.1: Superficie y producción de melón en España 5
Fig. 3.1: Frutos de los parentales e híbrido F_1 del cruzamiento PI161375xT111 38
Fig. 3.2.- Embriones partenogénicos de melón rescatados *in vitro* 41
Fig. 3.3.- Patrón de ploidía tras análisis con citometría de flujo 43
Fig. 3.4.- Gel de calidad de ADN de las líneas de la población LDH 49
Fig. 3.5.- Gel de la digestión, con enzimas de restricción, de ADN de las LDHs 50
Fig. 3.6.- Esquema de la transferencia de ADN digerido a un soporte sólido 51
Fig. 3.7.- Diferencias en la pubescencia de ovario entre las LDHs 64
Fig. 3.8.- Diferencias en la posición de los estambres en relación con el pistilo en las líneas de la población LDH 65
Fig. 4.1.- Respuesta a la partenogénesis de diferentes genotipos de melón 74
Fig. 4.2.- Patrón de bandas de LDHs tras el análisis con RFLPs 78
Fig. 4.3.- Patrón de bandas de las LDHs tras el análisis con SSRs 79
Fig. 4.4.- Mapa genético generado a partir de la población de LDHs 85
Fig. 4.5.-Mapa integrado de una población de LDHs y una F_2 obtenidas a partir del cruzamiento PI 161375xT111 90
Fig. 4.6.-Mapa integrado de una población de LDHs y una F_2 obtenidas a partir del cruzamiento PI161375xT111 con marcadores codominantes 95
Fig. 4.7.- Distribución de las frecuencias alélicas 99
Fig. 4.8.- Distorsión de las frecuencias alélicas 100
Fig. 4.9.- Histogramas de las frecuencias de los caracteres de morfología floral 103
Fig. 4.10.- Histogramas de las frecuencias de los caracteres de morfología de fruto 109
Fig. 4.11.- Distribución de la germinación de los dos parentales de la población de LDHs en el año 2001 111
Fig. 4.12.- Histograma de las frecuencias de los caracteres relacionados con la germinación 112
Fig. 4.13.- Localización de los QTLs identificados en el mapa de la población de LDHs 132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.- Tipos de melón analizados para estudiar la respuesta partenogénica 37
Tabla 3.2.- Composición del medio E20H8 para rescate *in vitro* de embriones partenogénicos 39
Tabla 3.3.- Origen de las sondas utilizadas para los RFLPs 53
Tabla 3.4.- Características de los microsatélites analizados 57
Tabla 4.1.- Respuesta de variedades de melón (*C. melo* L.) a la partenogénesis inducida in situ con polen irradiado 73
Tabla 4.2.- Identificación y origen de las LDHs generadas a partir del cruce PI161375XT111 76
Tabla 4.3.- Descripción de las distribuciones observadas para los caracteres de morfología floral 108
Tabla 4.4.- Descripción de las distribuciones observadas para los caracteres de morfología de fruto 110
Tabla 4.5.-Descripción de las distribuciones observadas para los caracteres relacionados con la germinación 115
Tabla 4.6.- Correlación de los caracteres analizados entre años 116

Tabla 4.7.- Correlación entre caracteres **117**
Tabla 4.8.- Características de los QTLs identificados para los caracteres de morfología floral **124**
Tabla 4.9.- Características de los QTLs identificados para los caracteres de morfología de fruto **126**
Tabla 4.10.- Características de los QTLs identificados para los caracteres relacionados con la germinación **131**

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El melón

1.1.1.- Importancia económica

El melón es una especie vegetal que se cultiva ampliamente en todos los países en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, tanto para el consumo en fresco como para la industria. Principalmente se consume en fresco o es utilizado para la elaboración de dulces. Los frutos jóvenes pueden ser confitados en vinagre o sal o bien ser utilizados en la preparación de sopas y guisos. En ocasiones, el melón es utilizado industrialmente en la elaboración de conservas y congelados. De hecho, cada país tiene sus propios tipos varietales preferidos. Dentro de los melones de mayor comercialización se encuentran los tipos Cantaloupe reticulado y Honeydew, cultivados e importados por los Estados Unidos, y los tipos Galia, Charentais y Piel de Sapo producidos y distribuidos especialmente en Europa.

De acuerdo con las estadísticas de la FAO, el melón es uno de los principales productos de fruta dulce consumida en fresco. La producción mundial de este cultivo se centra principalmente en Asia, con un 65% de la producción total, teniendo como principal productor Turquía. Los otros países productores son: América (13.7% de la producción mundial), con Estados Unidos como principal productor, Europa (9,1%) cuyo principal país productor es España y África con un 6,74% de la producción mundial siendo Egipto el principal productor. España se sitúa en el cuarto puesto de la producción mundial, detrás de Turquía, Estados Unidos e Irán. El año 1998 el melón representó en España el segundo cultivo hortícola después del tomate, tanto en producción (1.019.981t) como en superficie (43.714Ha), los datos del año 2002 son del mismo orden. La mayor producción la presentan la Comunidad Autónoma de Andalucía y Castilla-La Mancha. En la Comunidad Autónoma de Andalucía destaca la producción de Almería con un 69 % de la producción total de la comunidad.

En los últimos años la evolución del cultivo apunta hacia una disminución de la superficie cultivada y a un crecimiento de la producción (**Figura 1.1**). La incorporación de

nuevas prácticas culturales (variedades mejoradas y técnicas de cultivo especializadas) explican esta aparente contradicción (Torres, 1997).

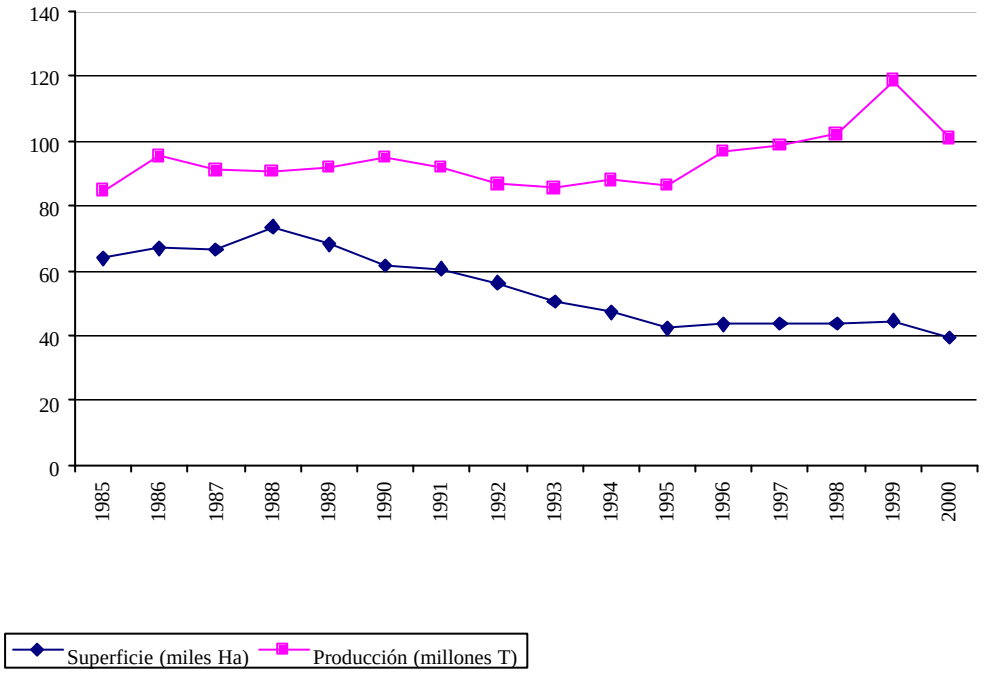


Figura 1.1: Superficie cultivada y producción de melón en España en los años 1985-2000.

1.1.2- Origen y taxonomía

El melón (*Cucumis melo* L.) pertenece a la familia de las Cucurbitáceas. El género *Cucumis* comprende 32 especies, algunas de ellas cultivadas y el resto corresponden a especies silvestres africanas. Dentro de este género, 30 especies, incluyendo *Cucumis melo*, presentan un número de cromosomas básico de n=12 y únicamente dos de ellas, *C. sativus* L. y *C. hystrix* Chakravarty, presentan un número n=7 (Kerje y Grum, 2000).

Su origen se sitúa en África para todas las especies del género *Cucumis* con número cromosómico básico de 12 y *C. sativus*, mientras que *C. hystrix* Chakravarty tiene una distribución desde China a Tailandia e india (Pitrat *et al*., 2000).

El cultivo de melón data de hace mucho tiempo, realizándose ya en el 2000 a.c. en Egipto, Mesopotamia, Este de Irán y China y en el 1000 a.c. en la India. Los primeros melones cultivados probablemente fueron formas no-dulces como *chate* en Egipto y *conomon* en China.

Desde el continente a Africano, el melón se expandió hacia Asia y de allí a Europa. La domesticación se produjo principalmente en Asia donde el comercio intensivo y la elevada población produjeron una rápida dispersión y diversificación de la especie en numerosos cultivares. El Sudeste asiático, Sudoeste asiático y la Península Ibérica se consideran los centros de diversificación secundarios donde la domesticación del melón se habría producido de forma independiente, siendo ésta, probablemente, la causa de la gran variabilidad morfológica de la especie (Kerje y Grum, 2000). El melón es un cultivo muy importante en USA, Japón, Canadá, Europa, y Australia pero en la India, África, Arabia e Irán es un cultivo secundario (Mallick y Masui, 1986).

La especie *Cucumis melo*, es una especie heterogénea, sobre todo por características del fruto (medida y forma, color, piel, color carne, contenido en azúcares, aroma, sabor, aptitud de conservación), considerándose la especie más diversa dentro del género *Cucumis* (Witaker y Davis, 1962; Jeffery, 1980; Kirkbride, 1993). En esta especie se incluyen:

A) Tipos no dulces, normalmente cosechados antes de la maduración que pueden comerse cocinados o crudos.
B) Dulces o tipo postre, los más comunes con muchos cultivares diferentes.
C) Aromáticos no-comestibles (Ej: *dudaim*).

Numerosos autores han intentado hacer una clasificación intraespecífica de melón. Naudin (1859), propuso dividir la especie en 10 variedades botánicas: *cantalupensis*, *reticulatus*, *saccharinus*, *inodorus*, *flexuosus*, *chito*, *dudaim*, *conomon*, *acidulus* y *agrestis*. Esta clasificación fue revisada por Munger y Robinson (1991), que propusieron dividir la especie en siete grupos, uno de ellos (*C. melo* var. *agrestis*) incluiría todas las variedades salvajes y otros 6 grupos (*cantalupensis*, *inodorus*, *flexuosus*, *conomom*, *dudaim* y *momordica*) donde se incluirían las variedades cultivadas.

Jeffery (1980) utilizó el carácter de pubescencia del ovario para delimitar dos subespecies botánicas dentro de *C. melo*: La subespecie *agrestis* que incluiría cultivares con ovario sedoso (*agrestis*, *conomom*, *dudaim* y *momordica*) y la subespecie *melo* que incluiría cultivares con el ovario piloso o velludo (*cantalupensis*, *inodorus* y *flexuosus*).

Pitrat *et al*., (2000) realizó una clasificación en función también de la pubescencia del ovario, quedando la especie dividida en dos subespecies (*melo* y *agrestis*) con 11 y 5 grupos respectivamente.

Se han realizado algunos estudios para clarificar esta clasificación empleando marcadores moleculares (Perl-Treves *et al*., 1998; Silberstein *et al*., 1999; Stepansky *et al*., 1999, Monforte *et al*., 2003a), confirmándose la división de la especie en dos subespecies y la India y África como centros de diversificación.

1.1.3- Características botánicas y agronómicas

La especie C. *melo* L., tiene un sistema radicular muy abundante y ramificado, de crecimiento rápido y del cual algunas de sus raíces pueden alcanzar una profundidad de 1,20 m. Los tallos son herbáceos, recubiertos de formaciones pilosas, y su desarrollo puede ser rastrero o trepador en función de la presencia de zarcillos. Las hojas son redondeadas o reniformes, generalmente divididas de tres a cinco lóbulos, de bordes algo ondulados con vellosidad blanquecina y blanda en el limbo que se hace más espinosa en los pecíolos.

Las flores son de tamaño pequeño, de corola amarilla, con cinco pétalos y por su sexo pueden ser masculinas, femeninas o hermafroditas. Las plantas de melón en relación con las flores que producen pueden ser monoicas o andromonoicas (flores hermafroditas y masculinas en la misma planta). Las flores masculinas suelen aparecer en primer lugar sobre los entrenudos más bajos, mientras las flores femeninas aparecen mas tarde en las ramificaciones de segunda y tercera generación, aunque siempre conjuntamente con otras flores masculinas.

Es una especie típicamente alógama, de polinización entomófila. Las flores hermafroditas no se autofecundan debido a la posición de los estambres que no vierten el polen sobre los estigmas. Por otro lado, necesitan de insectos al tener un polen grueso y pesado que difícilmente mueve el viento.

El fruto recibe el nombre botánico de pepónide y es una infrutescencia carnosa unilocular, constituida por una corteza o epicarpio, soldada al mesocarpio. La forma del fruto es variable, de tipo esférico, deprimida o flexuosa. La corteza de color verde, amarillo, naranja o blanco, puede ser reticulada o estriada. Sus dimensiones son

variables, aunque en general el diámetro mayor del fruto puede variar entre 15 y 60cm. La pulpa puede ser blanca, amarilla, cremosa, anaranjada y verdosa. Inicialmente es pubescente y a medida que se va desarrollando el fruto y madura, pierde la pubescencia.

Las semillas, que ocupan la cavidad central del fruto, insertas sobre el tejido placentario, son fusiformes, aplastadas y de color blanco o amarillo. En un fruto puede haber entre 200 y 600 semillas. En un gramo puede haber aproximadamente entre 22 y 50 semillas, según las variedades. El poder germinativo de las semillas de melón varía de cinco a seis años, si se conservan en buenas condiciones (Maroto, 1989).

El melón es una especie de grandes exigencias de calor e intensidad lumínica, por lo cual en Europa su cultivo al aire libre solo se puede hacer en los países del área mediterránea. Presenta una nula resistencia a las temperaturas bajo cero, afectando estas a la germinación del polen y al cuajado del fruto (Sobrino, 1989).

Respecto al desarrollo de la planta, del hipocotilo de la plántula del melón surge el tallo principal el cual puede llegar a medir unos 3-4 m. Las ramificaciones secundarias se desarrollan poco, evolucionando a ramas fructíferas a medida que se alejan de la base de la planta. De las ramificaciones secundarias salen ramificaciones terciarias que son fructíferas, llevando flores femeninas o hermafroditas y también flores masculinas.

En la proporción entre ambos sexos, pueden influir determinados agentes. Las temperaturas altas, días largos y las giberelinas tienen un efecto masculinizante, mientras que las temperaturas bajas, días cortos y auxinas son feminizantes (Maroto, 1989).

Para conseguir un buen desarrollo de los frutos es necesario que un número importante de granos de polen germinen sobre el pistilo de la flor, en el caso de haber poco polen o que no germine, pueden formarse frutos deformados y con pocas semillas.

Para la formación y maduración de los frutos de melón, a partir de la fecundación, deben transcurrir unos cuarenta días. Los primeros quince días después de la fecundación de las flores, el peso aumenta exponencialmente, al término de los cuales el fruto ha alcanzado la mitad de su volumen total y, a partir de este momento, se inicia la pérdida de color de la pulpa por degradación de los carotenos. Desde este instante la tasa de crecimiento disminuye y cuando ha transcurrido un mes tras la fecundación, puede decirse que el fruto ha alcanzado su tamaño definitivo y empieza la fase de maduración. En esta, se producen importantes cambios bioquímicos que conducen a un incremento en el contenido de azúcares del fruto (Maroto, 1989).

1.1.4- Mejora genética del melón

La importancia económica del melón justifica el establecimiento de programas de mejora en esta especie, cuyos principales objetivos son:

Las producciones tempranas regulares y de alto rendimiento: Una de las características deseables es la precocidad en la producción, factor que permitirá un mayor valor del fruto en el mercado en épocas de no abundancia. Así mismo, se buscan variedades mejoradas que produzcan mayores rendimientos con un menor número de requerimientos.

Resistencias a plagas y enfermedades: Uno de los principales objetivos de los programas de mejora es la resistencia a plagas y enfermedades, ya que uno de los mayores problemas del cultivo de melón son las pérdidas económicas debidas a enfermedades. Las enfermedades más frecuentes son de origen fúngico o vírico. También es importante el control de los vectores de transmisión de virus, principalmente insectos.

Producción de frutos de mayor calidad adaptados a las exigencias del mercado: El melón es una especie muy mejorada para la calidad de fruto, que va unido a las características organolépticas.

Adaptación a diversas condiciones del medio físico: Para aumentar la producción en determinadas zonas, se hace necesario dotar a las variedades de adaptabilidad a condiciones adversas como la tolerancia al frío o a la sequía.

Aumento de la conservación post-cosecha: Los programas de mejora dedicados a incrementar la conservación post-cosecha van encaminados, en la mayoría de los casos, a incorporar el carácter de larga vida del fruto, que esta controlado por la síntesis de etileno. Así mismo se han mejorado algunos de los caracteres relacionados con el transporte de los frutos.

Tradicionalmente, la mejora de melón se ha realizado por selección masal, donde el agricultor lleva a cabo una selección de plantas madres eligiendo aquellas que producen mejores frutos sin ejercer ningún control sobre los parentales masculinos, lo que conlleva cierto grado de heterogeneidad.

En la actualidad, la selección tradicional ha dado paso a otros métodos basados en el cultivo de variedades homocigóticas y de híbridos F_1. A pesar de la alogamia dominante en esta especie es posible la autofecundación de las plantas, de forma que se pueden

fijar líneas puras para un conjunto de caracteres agronómicos sin una baja apreciable del vigor.

Una de las ventajas de los híbridos F_1 es la uniformidad, rendimiento y la fácil introducción de genes dominantes en relación con las líneas puras. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de variedades de melón sean andromonoicas determina que la producción de híbridos F_1 sea muy laboriosa, ya que además de las operaciones necesarias para la fecundación se requiere la emasculación del parental femenino. Este hecho justifica el elevado coste de las semillas F_1 (Álvarez, 1997).

Actualmente, la incorporación de la biotecnología ha permitido acelerar la obtención de algunos objetivos planteados y acceder a áreas insospechadas de la mejora vegetal En este sentido, las técnicas biotecnológicas más interesantes son la selección asistida por marcadores moleculares, las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* y la transformación genética.

En líneas generales, los marcadores genéticos permiten rastrear el ADN de la planta objeto de selección, llegando a conocer si un determinado gen está presente o ausente y si se encuentra en estado de homocigosis o heterocigosis, con lo que la rapidez y seguridad de los procesos de selección tradicionales se ven notablemente mejorados, ampliando la eficacia de la selección de genes o genotipos.

En el melón, es posible el desarrollo de líneas dihaploides mediante la técnica de cultivo *in vitro* por partenogénesis inducida con polen irradiado (Sauton y Dumas de Vaulx, 1987). Esta técnica permite obtener líneas parentales completamente homocigóticas en un tiempo muy corto, reduciendo la duración del proceso de fijación de líneas parentales.

La transformación genética es posible en melón y otras cucurbitáceas. Una de sus principales aplicaciones se origina en la necesidad de incorporar resistencias a virus que no existen en el pool genético comúnmente utilizado en la especie. Mediante esta técnica se han obtenido variedades resistentes a CMV (Cucumber Mosaic Virus) que incorporan el gen de la proteína de la cápsida (Valles y Lasa, 1994).

1.2.- Haploides y líneas dihaploides (LDHs)

La obtención de líneas puras es un paso previo e imprescindible a la producción de híbridos comerciales en las especies hortícolas. La generación de estas líneas puede llevarse a cabo por métodos convencionales de mejora genética, por sucesivas autofecundaciones llegando hasta la octava o décima generación de autofecundación (F8-F10), con el inconveniente de que puede existir todavía heterocigosidad residual. Alternativamente, las líneas puras pueden obtenerse a partir de plantas haploides diploidizadas que tiene por ventajas el bajo tiempo de generación necesario para obtener individuos completamente homocigotos, y que no se produce heterocigosis residual (Morrison y Evans, 1988).

En la reproducción sexual, como consecuencia de una meiosis, se produce una reducción a la mitad del número somático de cromosomas. Posteriormente en la fecundación se produce la fusión del gameto masculino y el femenino duplicándose el número de cromosomas. Las plantas haploides se originan a partir de uno de los gametos parentales y por tanto poseen una sola copia de cada cromosoma. Estas plantas pueden generarse de forma espontánea *in vivo* sin producirse fusión entre los gametos de los parentales, quedando la dotación genética reducida a la mitad. El mayor número de haploides espontáneos se producen por partenogénesis o por apogamia, la primera a partir de la ovocélula y la segunda a partir de células diferentes de la ovocélula, como por ejemplo las sinérgidas presentes en el óvulo. La tasa de aparición de estos individuos haploides espontáneos es muy baja y depende de la especie, variando entre 2% en melón (Lotfi *et al*., 2003) y 10-35% en algunas especies de Brassica (Foisset *et al*., 1997). Se pueden encontrar individuos monoploides, originados a partir de especies estrictamente diploides (1 genoma), o poliploides, originados a partir de especies que poseen más de un genoma (Khush y Virmani, 1996). El desarrollo y aplicación de ciertas técnicas englobadas en la biotecnología, como el cultivo *in vitro* de gametos o embriones y el desarrollo de marcadores moleculares codominantes (isoenzimas, RFLPs, SSRs), ha permitido mejorar y acelerar el proceso de selección de plantas haploides en varias especies cultivadas, incrementando la eficiencia del proceso (Khush y Virmani, 1996). La tecnología utilizada para la producción de haploides, cultivo *in vitro* de anteras o granos de polen, óvulos, o embriones partenogénicos, depende de la especie de interés.

La naturaleza homocigótica de estas líneas y su potencial para ser perpetuadas ilimitadamente por autofecundación y obtención de semilla, hacen a las poblaciones de

líneas dihaploides muy útiles para estudios genéticos (Pauls, 1996). En este campo una de las mayores aplicaciones es la generación de mapas genéticos, ya que se dispone de material vegetal idéntico de forma ilimitada y tanto marcadores dominantes como codominantes pueden maparse con la misma precisión (Burr y Burr, 1991), lo que presenta una ventaja frente a otras poblaciones usadas para la generación de mapas como las F_2. Las poblaciones de LDHs se han empleado con éxito en la elaboración de mapas genéticos en distintas especies, como maíz, utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares (Devey *et al.*, 1999; Murigneux *et al.*, 1993).

Otra aplicación de las poblaciones de LDHs es el estudio de caracteres cuantitativos facilitando la localización de genes mayores y QTLs (Quantitative Trait Loci) implicados en la expresión de estos caracteres. Debido a la inmortalidad de las líneas se puede estudiar el mismo genotipo en diferentes localizaciones y por tanto, las interacciones genotipo por ambiente pueden ser estudiadas con mayor detalle (Pauls, 1996).

La utilización de plantas dihaploides también presenta una serie de desventajas como el hecho de que al tratarse de plantas homocigóticas puedan expresarse alelos recesivos que produzcan efectos subletales o letales en algunas líneas, cuyos efectos en heterocigosis se encontrarían enmascarados. Otro de los factores limitantes es el elevado coste de producción de plantas haploides en cantidad suficiente y la necesidad de encontrar o poner a punto un método adecuado para ello, lo que varía de unas especies a otras. El método elegido puede ejercer también una presión de selección no deseada, pudiendo verse afectada la segregación alélica de ciertos genes (Baenziger, 1996).

1.2.1.- Métodos de inducción de haploides

La producción de plantas haploides comprende una serie de procesos, en primer lugar se debe obtener tejidos o plantas haploides a partir de parentales heterocigotos, para ello, la metodología varía en función de la especie con que se trabaja y es necesario tener una técnica que sea eficiente. El siguiente paso es la duplicación cromosómica en tejidos o plantas haploides para obtener plantas dihaploides (Baenziger, 1996). El éxito de la utilización de los haploides en mejora genética depende no solo de la capacidad de producir gran número de individuos haploides sino también de la eficiencia en la duplicación cromosómica para obtener homocigosis, obteniendo a partir de una línea

haploide una línea diplohaploide o dihaploide (LDH) estable genéticamente y fértil lo que permite por autofecundación su perpetuación por semilla (Rao y Suprasanna; 1996).

Las estrategias más utilizadas para la producción de haploides se pueden dividir en tres grupos (Khush y Virmani, 1996):

1 - Partenogénesis y apogamia: La partenogénesis es la producción de un embrión a partir de la ovocélula sin la participación del gameto masculino y la apogamia es la producción de un embrión a partir de un núcleo gametofítico presente en el óvulo, diferente a la ovocélula (por ejemplo, las dos sinérgidas). Estos dos fenómenos ocurren *in vivo* y son la principal fuente de haploides espontáneos. Ambos pueden ser inducidos artificialmente con métodos como la irradiación de los tejidos embrionarios, irradiación del polen antes de polinizar, provocando lesiones en el ovario, o aplicando agentes químicos. El cultivo *in vitro* de embriones patenogénicos inmaduros permite rescatar embriones que serían inviables.

2 - Eliminación cromosómica y reducción somática: Esta estrategia comprende la hibridación interespecífica o intergenérica y la posterior eliminación cromosómica espontánea. Produciéndose una fertilización normal, las investigaciones citológicas han demostrado que los cromosomas de uno de los parentales pueden ser eliminados durante la primera mitosis del embrión. Los embriones resultantes no pueden continuar su completo crecimiento en la planta madre por la falta de albumen y por tanto deben rescatarse por cultivo *in vitro*. Esto es lo que sucede en la hibridación específica de *Hordeum vulgare* con *Hordeum bulbosum* (Devaux, 1987); *Triticum aestium x Hordeum bulbosum* (Hu, 1996); y *Solanum tuberosum x Solanum phureja* (Clulow *et al.,* 1991).

3 – Androgénesis y ginogénesis: Los avances en las técnicas de cultivo *in vitro* han permitido la obtención de haploides por cultivo de óvulos que permiten el desarrollo de plantas haploides a partir del gameto femenino reducido y no fecundado (ginogénesis), y por cultivo de anteras o granos de polen aislados que permiten la formación de embriones y plantas haploides a partir del núcleo del gameto masculino (androgénesis).

Con el fin de determinar el origen de los individuos obtenidos por los métodos previamente citados es importante conocer la ploidía de las plantas regeneradas. Existen diferentes métodos para medir el nivel de ploidía de las plantas obtenidas en los procesos de haploidización, entre ellos cabe destacar el conteo cromosómico (Cuny *et al*., 1993), la citometría de flujo (Fahleson *et al*., 1988) y el tamaño de los estomas (Cramer, 1999).

La duplicación cromosómica en plantas haploides puede producirse de forma espontánea, por endomitosis y endoreplicación, o ser inducida artificialmente. La tasa de duplicación espontánea es muy baja, por ello se debe recurrir a la inducción artificial de la duplicación del número cromosómico. Existen diferentes métodos para inducir la duplicación cromosómica, entre ellos está la inducción de callos seguida de la regeneración a planta, o el tratamiento con agentes físicos o químicos durante la división mitótica celular. A la hora de elegir un método hay que tener en cuenta algunos factores en este proceso de duplicación. Debe tratarse de un método simple y rápido, con el que se pueda manejar gran cantidad de material, que no produzca daño fisiológico, selección genotípica o alteraciones genéticas, y que presente un alto porcentaje de duplicación (Rao y Suprasanna, 1996). Entre todas las técnicas empleadas una de las más ampliamente utilizada es el tratamiento con colchicina. La colchicina es un alcaloide aislado de *Colchium autumnale*, cólchico o cólquico, (perteneciente a la familia de las Liliáceas), es un agente antimitótico, inhibidor del huso acromático que actúa en la división celular, uniéndose a las moléculas de tubulina. La inactivación de esta proteína estructural bloquea la polimerización de microtúbulos y la formación del huso acromático durante la metafase produciendo un fallo en la separación de las cromátidas hermanas. En consecuencia la colchicina detiene los cromosomas en metafase y previene la anafase (Rao y Suprasanna, 1996). Existen también otros agentes antimitóticos que pueden ser utilizados en la duplicación cromosómica como el óxido nitroso, podophylina, oryzalina, trifluralina, etc (Rao y Suprasanna, 1996).

Así mismo, la utilización de marcadores moleculares codominantes (isoenzimas, RFLPs, SSRs) es una herramienta muy útil para identificar las líneas homocigóticas. El desarrollo de estos marcadores facilita la detección de las plantas derivadas de haploides, independientemente de su ploidía. Si se utiliza un marcador que presenta polimorfismo para los parentales, se podrán distinguir los individuos homocigotos (dihaploides o haploides), de los heterocigotos diploides que son originados de un cruzamiento cigótico.

1.2.2.- Antecedentes en la producción de haploides de melón. Metodologías utilizadas y resultados obtenidos

En distintas especies de Cucurbitáceas se han obtenido haploides empleando diferentes métodos. En pepino, sandía y calabacín se han obtenido haploides producidos por ginogénesis (Sari *et al*., 1994; Gémesné Juhász *et al.*, 1997) o por partenogénesis inducida por polen irradiado (Niemirowicz-Szczytt y Dumas de Vaulx, 1989; Sauton, 1989; Przyborowski y Niemirowicz-Szczytt, 1994; Yanmaz *et al*., 1999).

Los primeros haploides en melón fueron obtenidos por Dumas de Vaulx (1979) mediante cruzamientos interespecíficos entre *Cucumis melo* y *C. ficifolius* (pepino silvestre). La frecuencia de obtención de haploides por este método fue muy baja (2,84 $^{0}/_{00}$ plantas). Posteriormente se emplearon otras metodologías, como cultivo de óvulos y anteras, aprovechando los avances de las técnicas de cultivo *in vitro*, que habían sido empleadas con éxito en otras especies de la familia de las cucurbitáceas (Gémesné Juhász *et al*., 1997). En melón sin embargo, no se produjeron plantas haploides por estas técnicas, ya que a pesar de generarse callos la regeneración a plantas no tuvo éxito (Dryanovska y Ilieva, 1983).

El método con el que se han obtenido mejores resultados en *C. melo* ha sido él de partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado descrito por Sauton y Dumas de Vaulx (1987). Estos autores obtuvieron una tasa de 3 haploides por cada 100 semillas abiertas. Posteriormente, usando esta metodología se observó que las condiciones de cultivo o estado fisiológico de las plantas madre (Sauton, 1988a, Sestili y Ficcadenti, 1996), el genotipo (Sauton, 1988b; Cuny *et al*., 1992), la dosis de radiación recibida por el polen (Cuny *et al*., 1992) o las condiciones de cultivo *in vitro* (Sestili y Ficcadenti, 1996) son factores que influyen en la tasa de obtención de embriones haploides.

El método de partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado ha sido empleado con éxito en otras especies dentro de la familia de las cucurbitáceas como pepino (Niemirowicz-Szcytt y Dumas de Vaulx, 1989; Sauton, 1989; Le Deunff y Sauton, 1994; Przyborowski y Niemirowicz-Szczytt, 1994; Çaglar y Abak, 1996; Yanmaz *et al*., 1999). Los resultados medios observados en esta especie fueron de 1,5 embriones por cada 100 semillas abiertas de media (Przyborowski, 1996), no superando los 3.4% embriones obtenidos en el caso del melón (Sauton y Dumas de Vaulx, 1987). El melón presenta un comportamiento relativamente original en el método de partenogénesis

inducida por polinización con polen irradiado, ya que al contrario que en otras especies, en melón la polinización con polen irradiado no induce híbridos con fenotipos anormales o estériles (aneuploides) y bajas dosis de radiación producen un número elevado de embriones partenogénicos. Este comportamiento puede ser debido a una elevada capacidad partenogénica de esta especie (Cuny *et al.*, 1993).

1.3.- Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son polimorfismos heredables de forma mendeliana simple cuya variabilidad puede ser detectada y utilizada en análisis genético. A continuación se describen los marcadores genéticos más comunes y sus aplicaciones en análisis genético.

1.3.1.- Tipos de marcadores

Los primeros marcadores utilizados fueron los marcadores morfológicos, que son caracteres controlados por un único gen cuya expresión es estable en un amplio rango de ambientes (Staub *et al*., 1996). Estos marcadores generalmente están originados por la mutación de un gen que producía un fenotipo marcadamente diferente al fenotipo normal. Los marcadores morfológicos presentan una serie de limitaciones como su bajo número disponible, su herencia suele ser dominante, presentan interacciones con el ambiente y acostumbran a afectar al fenotipo general de la planta y por tanto a interaccionar con otros genes (Tanksley, 1993).

Posteriormente se desarrollaron los marcadores isoenzimáticos. Los isoenzimas son variantes moleculares de una misma proteína (enzima) que presentan diferente carga eléctrica y/o tamaño y pueden diferenciarse por separación electroforética, generalmente en geles de almidón (Hunter y Market, 1975). La visualización de las bandas resultantes se realiza mediante tinción histoquímica, utilizando sustratos y cofactores específicos para cada sistema enzimático. Generalmente son marcadores neutros y codominantes que han sido utilizados en diferentes estudios genéticos y aplicaciones a la mejora (Tanksley y Orton, 1983). Una de las principales limitaciones de este tipo de marcadores es el

reducido número que existe. La variabilidad isoenzimática observada se reduce a determinadas regiones codificantes de ADN cromosómico, mientras que la variabilidad de las secuencias no codificantes (que constituyen la mayor parte del genoma) y mucha de la variabilidad posible en regiones codificantes (cambios silenciosos en terceras bases de los codones o en aminoácidos que no alteran la movilidad electroforética de las proteínas) no puede ser detectada con este tipo de marcadores.

Los avances en las técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos han permitido el desarrollo de un nuevo tipo de marcadores basados en polimorfismos de ADN (variaciones en las secuencias de nucleótidos, delecciones, inserciones, translocaciones, etc.). Estos marcadores moleculares son claramente ventajosos ya que su número es prácticamente ilimitado, se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma y no son dependientes de la expresión génica, por lo que no están influenciados por el ambiente (Tanksley *et al*., 1989).

Dentro de este grupo, uno de los primeros marcadores desarrollados fueron los RFLPs (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) (Bostein *et al*., 1980). Los marcadores RFLPs están basados en las diferencias de longitud de fragmentos de ADN generados a partir de la digestión del genoma con enzimas de restricción que cortan el ADN por determinados puntos o secuencias nucleotídicas específicas. Los fragmentos de ADN así generados pueden ser separados por electroforesis en geles de agarosa. El alto numero de fragmentos generados es transferido a un soporte sólido (Souther, 1975), normalmente una membrana de nitrocelulosa o nylon. Posteriormente se hibrida este ADN inmovilizado con una sonda (pequeño fragmento de ADN genómico o ADNc clonado, de una medida entre 500 y 2000pb) marcada con un isótopo radiactivo (^{32}P) o algún nucleótido modificado (Digoxigenina-11-UTP). En las condiciones adecuadas la sonda hibridará solo con los fragmentos homólogos inmovilizados en la membrana, los cuales serán visualizados mediante exposición fotográfica. El polimorfismo de las bandas detectadas dependerá de la presencia de mutaciones que afecten a la longitud de los fragmentos de restricción (inserciones/ delecciones o mutaciones puntuales en las dianas de restricción) sobre los que se ha hibridado la sonda en cuestión. Los RFLPs suelen segregar como marcadores codominantes. Pueden ser identificados en un numero teóricamente ilimitado y pueden cubrir cualquier región del genoma (Tanskley *et al*.,1989).

La puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR "Polymerase Chain Reaction") para la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN flanqueado por cebadores diseñados permitió desarrollar nuevos marcadores. La reacción PCR consiste en la repetición n veces de un ciclo que comprende la desnaturalización del ADN (94ºC), hibridación de los cebadores (35–60º C según el cebador y el objetivo de la reacción) y síntesis de la cadena complementaria por parte de una polimerasa termoestable (72 º C). Una vez finalizada la reacción, se obtendrá 2^n copias del fragmento delimitado por los dos puntos de hibridación de los cebadores. Los fragmentos amplificados son separados por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida y detectados por tinción de bromuro de etidio, tinción de plata, marcaje radiactivo y exposición fotográfica, electroforesis capilar o utilizando secuenciadores automáticos marcando uno de los cebadores con un fluorocromo.

Hay muchos tipos de marcadores derivados de PCR: RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat), InterSSR y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms). En general todos estos métodos son de fácil aplicación, más o menos económicos y proporcionan un ritmo de obtención de marcadores más alto que los RFLPs.

Los RAPDs se generan por la amplificación de segmentos de ADN genómico a partir de un solo cebador de secuencia corta (generalmente de 10 nucleótidos) y arbitraria. La reacción se realiza en unas condiciones de hibridación poco restrictivas (35 º C) que junto al hecho de que el cebador posee numerosos sitios de unión por complementariedad a lo largo del ADN genómico de la especie en cuestión determina la formación de numerosos (5-10) productos de longitud variada entre 300-2Kb. Normalmente los polimorfismos observados con los RAPDS son debidos a cambios en la secuencia de ADN genómico (mutaciones puntuales, inserciones/delecciones, inversiones, etc.) que hacen desaparecer alguno de los puntos de unión del cebador. Los RAPDs tienden a ser marcadores dominantes y sus polimorfismos son analizados por presencia-ausencia del producto amplificado (Welsh y McClelland, 1990; Willians *et al*., 1990).

Los AFLPs se basan la combinación de la restricción enzimática de ADN genómico y la amplificación por PCR con cebadores específicos. El ADN genómico se digiere con endonucleasas de restricción obteniéndose un gran número de fragmentos que son ligados a adaptadores específicos a los enzimas utilizados. Posteriormente se amplifica

por PCR usando cebadores que contienen secuencias comunes con los adaptadores específicos, añadiéndole 1 nucleótido arbitrario adicional (amplificación preselectiva), amplificando un número todavía elevado de fragmentos. Con el fin de disminuir el número de fragmentos se realiza otra amplificación añadiendo a la secuencia del cebador 2 o 3 nucleótidos selectivos (el número de nucleótidos varía en función de la complejidad del genoma) produciéndose una amplificación selectiva (Lin y Kuo, 1995). La amplificación selectiva de una pequeña parte de fragmentos determina la aparición de un número discreto de bandas (50-100) que pueden ser detectadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida ó secuenciadores automáticos, permitiendo rastrear un alto número de loci.

A partir de una banda de AFLPs o RAPDs se pueden diseñar marcadores específicos basados también en la técnica de PCR como son los SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) que suelen ser dominantes (Paran y Michelmore, 1993) o los CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) que presentan una herencia codominante (Konieczny y Ausubel, 1993).

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem. Esta clase de secuencias simples de ADN se encuentran de forma abundante y uniforme en los genomas de la mayoría de los organismos eucariotas (Garcia-Mas *et al.*, 2001). Generalmente, las repeticiones de dinucleótidos constituyen los microsatélites más comunes, en genomas vegetales el dinucleótido más repetido es el $(AT)_n$. El mecanismo por el que los microsatélites mutan es poco conocido, se han propuesto dos mecanismos no excluyentes: debido al sobrecruzamiento desigual durante la meiosis y por deslizamiento (disociación y reasociación incorrecta) de la cadena que está siendo sintetizada durante la replicación del ADN. Este último se cree que es el que tiene mayor importancia con relación a la hipervariabilidad de los microsatélites (Schlotterer y Tautz, 1995). El número de repeticiones es variable, y el grado de polimorfismo aumenta con la longitud total del microsatélite (número de repeticiones de la unidad repetitiva) (Smulders *et al.*, 1997).

Los marcadores SSR se basan en el diseño de cebadores específicos que flanquean las regiones del genoma que muestran el motivo repetido. Se amplifica mediante PCR la región repetitiva y se visualizan todos los alelos posibles para un locus microsatélite. Se trata de marcadores de tipo codominante y altamente reproducibles y que pueden ser

utilizados en especies próximas a la especie en la que han sido caracterizados. Generalmente, se detecta un solo locus, de modo que los individuos heterocigotos pueden ser fácilmente identificados ya que muestran patrones simples de dos bandas, cada una de ellas heredada por uno de sus progenitores, mientras que los individuos homocigotos mostraran una única banda.

El desarrollo del marcador es la mayor limitación de esta técnica. En primer lugar, se debe localizar en el genoma de la especie estudiada fragmentos de ADN que contengan el microsatélite, se secuencian a continuación las zonas flanqueantes al mismo, después se elaboran cebadores específicos que amplifiquen la región donde éste se encuentre y se comprueba que el microsatélite amplifica y es polimórfico (Garcia-Mas *et al.*, 2001).

Los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) son los polimorfismos más abundantes en la mayoría de los organismos, están originados por variaciones de un solo nucleótido en la secuencia de ADN producido por un cambio de base o pequeñas inserciones o delecciones (Martín, 2002). Muchos de los polimorfismos detectados por otros marcadores tienen su origen en SNPs, es decir, muchos tipos de marcadores son diferentes tecnologías para detectar una mutación puntual o polimorfismo del genoma (Garcia-Mas *et al*., 2001). Existen varios métodos para generar SNPs entre ellos esta la secuenciación directa de un fragmento de ADN a partir de un fragmento aleatorio, de una banda de RAPD o AFLP, a partir de EST (Expressed Sequences Tag) o genes conocidos (Rafalski, 2002). La detección de SNPs se puede realizar por varios métodos, que implican la amplificación de la secuencia diana seguido de la diferenciación de las variaciones en la secuencia de ADN por hibridación con sondas o por endonucleasas de restricción, lo que hace que el método sea extremadamente caro (Landegren *et al.,* 1998).

Entre los métodos de detección de SNPs más comunes se pueden citar: secuenciación, HPLC desnaturalizante, SSCP (Single Strand Configurates Polymorphism), Pyrosequencing, TaqMan, Single-base extension y Sequenom (Landegren *et al*., 1998).

1.3.2.- Aplicaciones de los marcadores moleculares

1.3.2.1.- Identificación varietal y variabilidad genética

Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para facilitar la identificación de variedades o genotipos (Warburton y Bliss, 1996), permitiendo distinguir una variedad de las demás, con lo que se puede hacer una identificación complementaria a la agronómica. Además, esta identificación puede realizarse en un estadio temprano de desarrollo. Los marcadores utilizados para la identificación varietal deben poseer una metodología sencilla, rápida y barata. Se han realizado estudios de identificación varietal con éxito con diferentes tipos de marcadores, como los isoenzimas (Lambody *et al.*, 1996), los RAPD que son de los mas atractivos ya que son rápidos, eficientes, baratos y permiten discernir entre genotipos estrechamente emparentados (Warburton y Bliss, 1996) ó los AFLPs cuya principal ventaja es que pueden analizarse un gran número de loci de ADN en un corto periodo de tiempo (Hill *et al.*, 1996). Así mismo, los microsatélites también son útiles en este tipo de aplicación, sobre todo han sido empleados en especies con bajo grado de polimorfismo como son las especies de propagación vegetativa (Guilford *et al*, 1997). Dos de las aplicaciones directas del empleo de estas técnicas son la defensa de derechos de propiedad de variedades y el control de calidad.

Los marcadores moleculares también pueden ser empleados en estudios de variabilidad genética, evaluando la variabilidad genética relativa entre y dentro de especies y la distancia genética entre especies y ecotipos, lo que tiene gran importancia en el estudio de la distribución de la variabilidad genética en bancos de germoplasma, que permite diseñar estrategias de conservación de recursos genéticos para minimizar la variabilidad perdida en los procesos de domesticación (Kim y Ward, 1997). El nivel de variabilidad detectado depende del tipo de marcadores usados, que pueden ser clasificados de menor a mayor según el grado de variabilidad en proteínas, isoenzimas, RFLPs, RAPDs, AFLPs y microsatélites.

1.3.2.2.- Test de parentesco

Utilizando marcadores moleculares pueden conocerse las relaciones de parentesco entre diferentes variedades, especialmente interesante en especies leñosas. Se puede inferir los parentales a través de una descendencia y viceversa. Este test se puede utilizar además con otras finalidades: Conocer la pureza híbrida, con lo que se pueden distinguir híbridos verdaderos y falsos y en la selección de híbridos verdaderos en un programa de mejora. Para esta aplicación se han empleado con éxito isoenzimas, RAPD y RFLPs (Arús *et al.*, 1982; Gardiner *et al*., 1996).

Otra de las aplicaciones de este test es el reconocimiento de haploides y dihaploides procedentes de cultivo *in vitro*. La utilización de marcadores moleculares permite distinguir si la planta procede de tejido haploide o somático, pero no su nivel de ploidía. Así mismo, se puede estudiar la segregación de marcadores para determinar el efecto de la selección en el proceso de obtención de haploides. La identificación de plantas haploides con la ayuda de marcadores moleculares ha sido utilizada con éxito en maíz (Murigneux *et al*., 1993) y en patata (Rivard *et al*., 1989), en ambos casos los marcadores utilizados han sido de tipo RFLP.

1.3.2.3.- Construcción de mapas genéticos y físicos

El desarrollo de la tecnología de marcadores moleculares y como consecuencia la identificación de muchos loci marcadores ha posibilitado la generación de mapas genéticos de numerosas especies. Un mapa consiste en la medida de la situación relativa de los genes y/o marcadores genéticos en los cromosomas mediante el análisis de ligamiento. La construcción de un mapa genético requiere la elección de la población adecuada para el mapado, establecimiento de los grupos de ligamiento, determinar el orden en el mapa de los marcadores, estima de las distancias genéticas y el cálculo de las frecuencias de recombinación (Staub *et al*., 1996). Los marcadores moleculares permiten realizar mapas completos para cualquier especie con una elevada calidad y costo económico e inversión de tiempo razonables. El orden en el que se colocan los loci en cada cromosoma de un mapa de ligamiento debe ser el mismo en el que están ordenados físicamente en el genoma. Las distancias en los mapas genéticos se basan en la frecuencia de recombinación entre loci y pueden variar según el fragmento del genoma

que se analice, siendo proporcionalmente mayores con respecto a las físicas en zonas de mayor recombinación o más cortas cuando la recombinación esta restringida. La relación entre distancia física/ genética no es igual en todas las regiones cromosómicas. La frecuencia de recombinación puede también variar según el genotipo, el sexo o la especie (Monfort *et al*., 2002).

A partir de los mapas genéticos, pueden generarse mapas físicos que es una serie ordenada de genes y marcadores genéticos localizados en un cromosoma mostrando las distancias físicas relativas expresadas en pares de bases. Un mapa físico implica el fraccionamiento del genoma en miles de trozos que se recolocan ordenadamente en el mismo. El desarrollo de genotecas de grandes fragmentos de ADN, en vectores como YACs ('Yeast Artificial Chromosome', cromosomas artificiales de levadura) (Falco y Botstein, 1983; Zwick *et al*., 1998) o los BACs ('Bacterial Artificial Chromosome' cromosomas artificiales de bacterias) (Tao *et al*., 2001), permitieron la construcción de estos mapas físicos. Son por tanto una formidable herramienta que sirve para la secuenciación del genoma, pero también tienen otras utilidades como la localización de marcadores en zonas concretas del genoma o el clonaje posicional de genes (Monfort *et al*., 2002).

Se han construido mapas genéticos en numerosos cultivos, empleando diferentes tipos de marcadores. Entre otros, se han generado mapas con isoenzimas y RFLPs en tomate, patata y maíz (Burr *et al*., 1988; Tanksley *et al*., 1992), con RFLPs en maíz y pino (Gardiner *et al*., 1993; Devey *et al*., 1999), y microsatélites en arroz (Temnykh *et al*.,2000).

En melón, se han generado mapas genéticos con diferentes tipos de marcadores moleculares a partir de diferentes poblaciones. El primero se realizó a partir de una población F_2/F_3 y fueron analizados 110 marcadores (1 marcador morfológico, 4 marcadores de genes de resistencia a enfermedades, 1 isoenzima, 64 RAPDs y 34 RFLPs) (Baudracco-Arnas y Pitrat, 1996), los marcadores se distribuyeron en 14 grupos de ligamiento y siete marcadores no ligados. El hecho de que no correspondan los cromosomas con el número de grupos de ligamiento indica que no se cubrió el genoma entero. Wang *et al*., (1997) fue el siguiente que realizó un mapa de melón a partir de una población de retrocruzamiento (Backcross o BC), empleando marcadores AFLP. Los marcadores se distribuyeron en 14 grupos de ligamiento mayores y 6 grupos menores, la distancia cubierta del genoma fue de 1942cM con un promedio entre marcadores de 27.5cM. En otros mapas generados en esta especie se emplearon adicionalmente marcadores de tipo SSR, Danin-Poleg *et al*., (2002) construyó un mapa de ligamiento

parcial con 74 marcadores, 22 SSR, 46 RAPDs, 2 ISSR y cuatro caracteres hortícolas a partir de una población F_2/F_3, los marcadores se distribuyeron en 14 grupos de ligamiento. Así mismo se han elaborado mapas genéticos a partir de RILs (Recombinant Inbred Lines) con 668 marcadores la mayoría de tipo dominante, AFLPs e ISSR (Périn *et al*., 2002a), la utilización de marcadores de tipo dominante en su mayoría hace que no sea fácil su transferencia y la comparación con otros mapas.

El mapa con mayor número de marcadores codominantes generado en melón hasta la fecha fue realizado por Oliver *et al.* (2001) a partir de una población F_2 del cruce PI 161375 x T111, para ello utilizaron 411 marcadores (234 RFLPs, 94 AFLPs, 47 RAPDs, 29 SSRs, 5 ISSRs, 2 isoenzimas y 1 características morfológicas) que se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento lo que coincide con el número de cromosomas básico de esta especie, con una distancia media de 3cM/ marcador.

1.3.2.4.- Bulked Segregant Analysis (BSA)

El BSA se emplea en la identificación de marcadores ligados a un gen específico o una región genómica. El método se emplea con caracteres monogénicos en poblaciones segregantes de tipo F_2 o BC e implica la comparación de dos grupos de ADN, cada uno de ellos formado por un conjunto de individuos con diferente expresión del carácter (Michelmore *et al*., 1991). Uno de los usos más comunes de este método es en la identificación de genes implicados en la resistencia a una enfermedad (Bauer *et al*., 1997; Huang *et al*., 2000; Morales *et al*., 2002). En primer lugar, se identificaran los individuos con diferente fenotipo, resistente/ susceptible por ejemplo, se construirán grupos formados por 10-15 individuos con cada una de estas características y se buscara polimorfismo entre los dos grupos de ADN. La presencia de polimorfismo indicará un marcador candidato a estar ligado al gen. Para finalizar, los individuos deben ser analizados para verificar que están ligados a ese gen. Se han empleado en combinación con la estrategia BSA marcadores RAPDs y AFLPs que puedan analizar muchos loci simultáneamente.

1.3.2.5.- Clonación posicional

Conociendo el producto de un gen, éste puede llegar a clonarse, sin embargo, si no se conoce el producto, pero sí su posición cromosómica, la clonación posicional permite la localización de un gen a partir de marcadores situados en su proximidad a uno u otro lado.

Existen dos estrategias para clonar un gen por clonación posicional, el paseo cromosómico y el aterrizaje cromosómico. En el paseo cromosómico se realiza el mapa físico de una región comprendida entre dos marcadores que flanquean el gen que nos interesa, para ello se utilizan bibliotecas genómicas de fragmentos de gran tamaño (YACs o BACs) que contienen el gen. Se realiza un paseo en la región flanqueada por estos dos marcadores con los fragmentos cromosómicos de la genoteca. El solapamiento sucesivo de estos fragmentos permitirá cubrir la distancia física que separa el marcador del gen de interés (Picó y Ruiz, 2000). Esta técnica presenta algunos problemas como el tiempo que tarda en realizar el recorrido entre dos marcadores o la presencia de ADN repetitivo en la zona donde se realiza el paseo cromosómico y clones YAC quiméricos, que pueden llevar a errores en la identificación de fragmentos parcialmente solapados (Monfort *et al*., 2002).

Con el segundo método, aterrizaje cromosómico, algunos de estos problemas pueden ser solucionados. El método consiste en localizar marcadores cercanos al gen de interés por ambos lados de forma que se puedan encontrar en un solo YAC o BAC (Tanksley *et al*., 1995). Una vez identificado el YAC o BAC que contiene el gen se obtiene el cDNA a partir del cual por transformación genética se clonara el gen. Normalmente, estos dos métodos se utilizan combinados, realizando primero un aterrizaje sobre una zona, en la que después se hace el paseo cromosómico. Los marcadores empleados para este método son aquellos con los que se puede analizar un gran número de polimorfismos en poco tiempo (RAPDs y AFLPs).

1.3.2.6.- Análisis de caracteres cuantitativos

La mayoría de caracteres de interés agronómico e implicados en eficacia biológica son caracteres complejos que muestran variación continua, están determinados por muchos genes de pequeños efectos que se encuentran segregando en las poblaciones y presentan interacción con el ambiente (Moreno-González, 2000). El término QTL

(Quantitative Trait Loci) se acuñó para describir una región del cromosoma (normalmente definida por ligamiento a un gen marcador) que tiene efecto significativo en un carácter cuantitativo (Gelderman, 1975). El análisis de QTLs se basa en la búsqueda de asociaciones entre el carácter cuantitativo y los alelos marcadores que segregan en una población (Kearsey y Farquhar, 1998), pudiendo emplearse para detectar y estimar el efecto de un QTL. Así, el QTL se define por el ligamiento con un marcador cuya variación presenta una correlación significativa con la variación del carácter cuantitativo (Tanksley, 1993).

El desarrollo de mapas de ligamiento completos (con marcadores que cubren la mayor parte del genoma) y metodología estadística adecuada ha ayudado a la disección de caracteres cuantitativos en factores mendelianos (QTLs) que explican una parte significativa de la varianza fenotípica (Paterson *et al.*, 1988). El número de QTLs detectados se debe interpretar como el mínimo número de QTLs que segregan en una población, ya que QTLs con efecto pequeño, son difíciles de detectar en poblaciones experimentales.

Existen varios métodos para la detección y análisis de QTLs. Uno de ellos es la comparación de medias de las diferentes clases de marcadores. Este método propone que si un QTL está ligado a un locus marcador, debe de haber diferencias en los valores medios de los individuos con diferente genotipo para ese locus marcador (Soller y Brody, 1976) y consiste en comparar las medias de los valores fenotípicos para cada clase genotípica del marcador. Así, mediante análisis de varianza (ANOVA) o un test t se pueden estudiar si hay diferencias fenotípicas significativas entre clases genotípicas. En caso de existir estas diferencias, nos indicaría la presencia de un QTL ligado al marcador considerado. El principal inconveniente de este método es que no es posible determinar la distancia de ligamiento entre el QTL y el marcador y en consecuencia el efecto del QTL queda subestimado (Tanksley, 1993).

Este inconveniente se resuelve por la estimación de los efectos del QTL mediante mapeo por intervalos (Interval Mapping, IM) que puede hacerse en poblaciones en las que se han elaborado mapas completos. La posición y efecto del QTL se estudia en posiciones comprendidas en el intervalo definido por una pareja de marcadores ligados (Lander y Bostein, 1989). El inconveniente que presenta el IM es que no tiene en cuenta el fondo genético, es decir, otros QTLs en otros cromosomas que puedan afectar el análisis, y que si hay ligamiento entre QTLs, los efectos y la posición estimados son sesgados.

Para mitigar estos inconvenientes se propuso el CIM (Composite Interval Mapping o mapado por intervalos compuestos) usando otros marcadores situados en otros cromosomas y en el cromosoma estudiado definidos previamente como cofactores para controlar el efecto de otros QTLs (Zeng, 1993). El CIM también es adecuado para estudiar interacciones con el ambiente (Zeng, 1994). Sin embargo, no contempla la epistasia, para ello se desarrolló el método de mapado por múltiples intervalos (Multiple Interval Mapping, MIM) (Kao *et al*., 1999) que utiliza múltiples intervalos entre marcadores simultáneamente y presenta ciertas ventajas frente a los anteriores ya que se pueden detectar múltiples componentes de los QTLs, incluyendo epistasia, en los análisis. Esto incrementa el poder estadístico para identificar QTLs menores y complejos y mejora la precisión para estimar la posición de los QTLs. Así mismo, puede ayudar a identificar patrones y elementos individuales de epistasia de los QTLs ayudando a realizar una estimación bastante completa de los efectos individuales del QTL, contribuciones de las varianzas y covarianzas, con lo cual, se mejora la identificación y estimación de parámetros de QTLs. Por todo ello, el MIM es una poderosa herramienta para estimar los valores genotípicos de los individuos que pueden ser usados para selección asistida por marcadores (MAS) (Kao *et al*., 1999; Zeng *et al*., 1999).

La eficiencia de los análisis de QTLs depende así mismo de que las condiciones para el estudio sean lo más favorables posibles, para ello hay algunos factores que deben tenerse en cuenta como: el tamaño de la población que debe ser lo más elevado posible, la densidad del mapa debe ser alta con aproximadamente 15 cM de separación entre marcadores y la toma de datos que tienen que ser detallada y completa realizando varias repeticiones en localidades y/o años.

En los últimos años se han realizado estudios de caracteres cuantitativos en numerosas especies vegetales, detectándose QTLs implicados en la expresión de caracteres agronómicos de gran importancia (Alpert *et al*., 1995; Grandillo *et al*., 1999; Juenger *et al*., 2000). Algunos de estos QTLs han podido ser clonados. Así, en tomate se han clonado QTLs relacionados con la forma del fruto, *fw2.2*. (Frary *et al*., 2000) y ovate (Liu *et al*., 2002), en *Arabidopsis* se ha clonado un QTL, *CRY2*, implicado en el tiempo de floración (El-Assal *et al.*, 2001) y en arroz se han clonado QTLs relacionados con la sensibilidad al fotoperíodo, *Hd1* y *Hd6* (Yano *et al*., 2000; Takahashi *et al.*, 2001). En melón, existen estudios sobre la herencia de muchos caracteres, sobre todo los relacionados con resistencia a enfermedades y características del fruto (Pitrat, 1998), sin embargo, debido a la ausencia hasta hace poco tiempo de mapas completos en esta

especie, la descomposición de los caracteres cuantitativos en factores mendelianos ha estado muy limitada. Existen únicamente publicaciones sobre el análisis de QTLs asociados a la resistencia a CMV (Cucumber Mosaic Virus) (Dogimont *et al*., 2000) y estudios de QTLs asociados a la forma del fruto (Périn *et al*., 2002 b).

1.3.2.7.- Selección asistida por marcadores

La mejora genética suele hacer uso de la variación fenotípica de los caracteres de interés agronómico entre variedades. La expresión de un carácter puede estar influida por el ambiente o solo ser detectado fenotípicamente en fases avanzadas de desarrollo, lo que dificulta y alarga el proceso de selección. Técnicas de genética molecular han permitido ampliar el rango de variabilidad seleccionable mediante el empleo de marcadores moleculares. El uso de marcadores de ADN ligados a un gen o a QTLs, para la identificación de plantas portadoras de características favorables que o bien son difíciles de evaluar o bien son susceptibles a los cambios ambientales, se conoce como selección asistida por marcadores (MAS, 'Marker Assisted Selection').

Las características que debe presentar un marcador para MAS son que sea rápido, barato y no necesite grandes cantidades de ADN, que sean marcadores que permitan reconocer todos los genotipos posibles del gen (codominantes), que sea posible su utilización en un amplio rango del germoplasma de la especie (carácter universal), que esté estrechamente ligado (distancia genética) con el gen de interés y que no presenten interacciones con otros marcadores (Capel *et al*., 2000).

Así, las principales ventajas de la utilización de marcadores para la selección de caracteres de interés son que permite seleccionar individuos que presenten el carácter en estadios tempranos de desarrollo, que pueden analizarse muchos individuos rápidamente, lo que supone un gran ahorro de tiempo y espacio, y que aumente la respuesta a la selección (Moreno- González, 2000).

La selección asistida por marcadores puede emplearse para seleccionar genes interesantes que estén estrechamente ligados a un marcador (Capel *et al*., 2000) como por ejemplo marcadores ligados a genes de resistencia (Zeng *et al*., 1999) o para hacer selección del genoma completo (Whole genome selection) seleccionando todo el genoma de uno de los parentales excepto un gen con alguna característica de interés agronómico que provenga del otro parental, acelerando la recuperación del genoma receptor por

retrocruzamiento (Tanksley *et al.*, 1998). En este último caso la selección asistida por marcadores permite de forma rápida la fijación del genomio de un individuo y es aplicable a cualquier método en el que se llegue a líneas puras como resultado final, por ejemplo Near Isogenic Lines (NILs).

2.- OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

En la realización de esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1.- Generación y evaluación molecular de una población de líneas dihaploides (LDHs) en melón (*Cucumis melo* L.), mediante partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado a partir del cruzamiento de las líneas PI 1613 75 x T111.

2.- Construcción de un mapa genético a partir de la población de LDHs generada, empleando marcadores codominantes y posicionando nuevos marcadores.

3.- Integración de los mapas de la población de LDHs y F2, ya existente obtenida a partir del mismo cruzamiento, para generar un mapa saturado con marcadores codominantes de alta calidad.

4.- Detección de QTLs implicados en caracteres de interés taxonómico (morfología florar y pubescencia de ovario) y agronómico (morfología de fruto y germinación), en melón.

5.- Estudiar la correlación genética entre la morfología de la flor y del fruto en melón.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material vegetal

Para estudiar la respuesta de diferentes cultivares del género *Cucumis* a la partenogénesis inducida *in situ* se analizaron genotipos pertenecientes, según Pitrat *et al*., (2000), a *C. melo* subespecie *melo* y *C. melo* subespecie *agrestis*. El material vegetal utilizado para este ensayo viene descrito en la **Tabla 3.1**. De la subespecie *melo* fueron analizados 12 híbridos F_1 y 2 líneas mejoradas, 3 de los híbridos pertenecientes al grupo varietal *cantalupensis* y 9 al grupo varietal *inodourus*. También se analizaron 2 accesiones de los grupos varietales *chinensis* y *conomon* pertenecientes a la subespecie *agrestis*. Finalmente, se analizó también la capacidad partenogénica del un híbrido F_1 del cruzamiento PI 161375 x T111.

Estas líneas e híbridos fueron utilizadas como parentales femeninos en el protocolo de inducción de partenogénesis. Como donador de polen se eligió la línea pura M40, de tipo Piel de Sapo, dominante para el carácter de monoecia (flores masculinas y femeninas en la misma planta y ausencia de flores hermafroditas) lo que permitiría identificar las plantas provenientes de embriones zigóticos, fruto de la posible existencia de granos de polen no inhabilitados por la irradiación con rayos gamma y que poseyeran capacidad para fecundar el óvulo. Además, para confirmar este hecho se eligieron algunos marcadores de tipo SSR que permitían discernir entre los tres genotipos (PI 161375, T111 y M40).

Se generó una población de líneas dihaploides a partir del híbrido F1 proveniente del cruce PI 161375 x T111 (**Figura 3.1**). Estos parentales fueron elegidos en función de distintas características. La línea mejorada T111 de tipo Pinyonet, Piel de Sapo (cedido por Semillas Fitó), que fue elegido por su valor económico en España, presenta floración andromonoica (flores hermafroditas y masculinas en la misma planta) y frutos no dehiscentes, de forma elíptica, de color verde oscuro con manchas y con escriturado longitudinal suave. La pulpa es blanca y crujiente con un elevado contenido en azúcares y únicamente presenta resistencia a las cepas 0 y 1 de *Fuxarium oxysporum*. El parental femenino PI 161375 ("Sogwhan Charmi") (cedido por la estación experimental La Mayora) elegido por la gran distancia genética que tiene con el T111 (Garcia-Mas *et al*., 2000) y por ser fuente de numerosos genes de resistencia a enfermedades: a CMV (oligogénica recesiva), MNSV (gen recesivo *nsv*), cepas 0 y 1 de *Fuxarium oxysporum* (gen *Fom-2*) y resistencia a la transmisión de virus por *Aphis gossypii* (gen *Vat*). Se trata de una línea

originaria de Corea, perteneciente a la variedad *chinensis*. Esta línea también presenta una floración andromonoica, con frutos no dehiscentes, de forma de pera y de color verde claro con manchas oscuras. La pulpa es de color verde y naranja, de textura suave y con un contenido en azúcares intermedio. La obtención de una población de líneas doble haploides (LDH) se realizó mayoritariamente durante los años 1997 y 1998, con una actividad menor durante dos años más, 2001 y 2002, con el objetivo de alcanzar un número de individuos cercano a las 100 líneas.

Tabla 3.1: Tipos de melón analizados para estudiar la respuesta a la partenogénesis inducida *in situ* con polen irradiado y rescate *in vitro* de embriones.

Tipos de melón [x]	**Híbridos**	**Líneas**
subespecie *melo* var. *inodorus*		
Piel de sapo	-	T111
Piel de sapo	T x L	-
Piel de sapo	L x Z	-
Piel de sapo	6 x T111	-
Piel de sapo	RQ200 x T111	-
Piel de sapo	M75C164	-
Piel de sapo	M75C167	-
Piel de sapo	M75C257	-
Piel de sapo	M81B520	-
Amarillo	-	8
Amarillo	M75CA155	-
subespecie *melo* var. *cantalupensis*		
Cantalupo liso	M91	-
Cantalupo reticulado	M92	-
Galia	M93	-
subspecies *agrestis* var. *conomon* [y]		
Agrestis	-	-
subspecies *agrestis* var. *chinensis*		
Songwham Charmi	-	PI161375
subspecies agrestis var. *chinensis* x subspecies *melo* var. *inodorus*		
-	PI161375 x T111	-

[x] Basado en la clasificación Pitrat *et al*. (2000)

[y] Origen en el este Asiático, propuesto como var. *conomon*.

Figura 3.1: Frutos de los parentales e híbrido F1 del cruzamiento PI 161375 x T111 a partir del cual se generó la población de LDH.

3.2.- Producción de plantas haploides y LDHs

La metodología utilizada para la producción de líneas dihaploides (LDHs), por partenogénesis inducida "*in situ*" mediante polinización con polen irradiado, se puso a punto en el departamento de Genética Vegetal del IRTA (Cabrils), a partir de 1995, adaptando el protocolo publicado por Sauton y Dumas de Vaulx (1987), con algunas modificaciones orientadas a aumentar la eficiencia en nuestras condiciones de trabajo, así como teniendo en cuenta la experiencia adquirida durante el desarrollo de una metodología para la producción de LDHs partenogénicas en clavel, *Dianthus caryphyllus* L. (Dolcet-Sanjuan *et al*., 2001).

El proceso de haploidización consistió en la inducción de la partenogénesis mediante polinización con polen irradiado con rayos gamma, rescate *in vitro* de embriones mediante cultivo en medio E20H8 (**Tabla 3.2**), multiplicación *in vitro* de las plantas rescatadas, estudio del nivel de ploidía de las plantas por citometría de flujo, y diploidización mediante tratamiento *in vitro* con colchicina. El tratamiento con colchicina de las plantas haploides, para su duplicación cromosómica, tiene como resultado la obtención de individuos diplohaploides.

Las plantas que sobrevivieron al tratamiento con colchicina permanecieron *in vitro* hasta que en la primavera siguiente a su rescate, previa aclimatación, fueron transferidas a invernadero, para su posterior autofecundación con el objetivo de obtener semillas para perpetuar las líneas dihaploides. La autofecundación se realizó durante dos años consecutivos.

Tabla 3.2: Medio de cultivo E20H8 utilizado para el rescate *in vitro* de los embriones partenogénicos, el mantenimiento y multiplicación de las plantas haploides hasta su transferencia a invernadero.

Composición medio E20H8	**Concentración**
Sacarosa	20g/l
Macroelementos	
KNO_3	1075mg/l
NH_4NO_3	619mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	206mg/l
$CaCl_2.2H_2O$	1311.5 mg/l
KH_2PO_4	71mg/l
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	25mg/l
$NaH_2PO_4.2H_20$	21.5 mg/l
$(NH_4)_2SO_4$	17 mg/l
KCl	3.5 mg/l
Microelementos	
$MnSO_4.H_2O$	11.065 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$	1.812 mg/l
H_3BO_3	1.575 mg/l
KI	0.348 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.094 mg/l
$CuSO_4.5H_2O$	0.008 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	0.048 mg/l
$FeSO_4.7H_2O$(100%)	28.08 mg/l
EDTA.$Na_2.2H_2O$ (99%)	37.60 mg/l
Vitaminas F+Morel	
m-Inositol	50.30 mg/l
Ácido Nicotínico	0.70 mg/l
Piridoxina	5.50 mg/l
Tiamina	0.60 mg/l
Glicina	0.10 mg/l
Ca-Pantotenato	0.50 mg/l
Biotina	0.005 mg/l

3.2.1.- Irradiación del polen

El método empleado para la obtención de haploides en melón implica la polinización de las plantas con polen irradiado, que ha perdido su capacidad de fecundar la ovocelula pero estimula la formación de fruto. Flores recién abiertas de la línea M40 fueron recogidas a primera hora de la mañana, distribuidas en bolsas de polietileno transparente, refrigeradas, e irradiadas a 250 o 500 Gray con una fuente de rayos gamma emitidos por Co^{60} (Aragogamma S.A., Granollers, Barcelona).

3.2.2. - Polinización de plantas madre

Con el objeto de evitar cruzamientos no deseados antes de la polinización con el polen irradiado, las flores de los parentales femeninos fueron emasculadas y embolsadas 24 horas antes de la apertura de los pétalos y la antesis. A la mañana siguiente del embolsamiento, mientras los estigmas son receptivos, se efectuó la polinización con el polen irradiado y se embolsaron de nuevo las flores polinizadas. Los frutos fueron recogidos entre las 3 y 5 semanas después de la polinización con polen irradiado. En ese momento se encontraban en la fase última de crecimiento pero no habían empezado el proceso de maduración.

3.2.3. - Rescate de embriones por cultivo *in vitro*

Los frutos fueron desinfectados pulverizando su superficie con etanol 96º, y abiertos en las cámaras de flujo para mantener la esterilidad. El material utilizado (cuchillos, pinzas y bisturís) fue esterilizado en autoclave y dentro de la cámara de flujo fue flameado cada vez que era utilizado. Una vez abierto el melón se recogieron las semillas, que fueron abiertas bajo una lupa binocular (20-40 aumentos). El número de semillas abiertas superó siempre las 1000 semillas por genotipo analizado, oscilando en la gran mayoría entre 10 y 50 mil.

Los embriones partenogénicos fueron identificados por su morfología, distinguiéndose por su aspecto cordiforme, su pequeño tamaño, ausencia o asimétrica posición de los cotiledones y otras anormalidades (**Figura 3.2**).

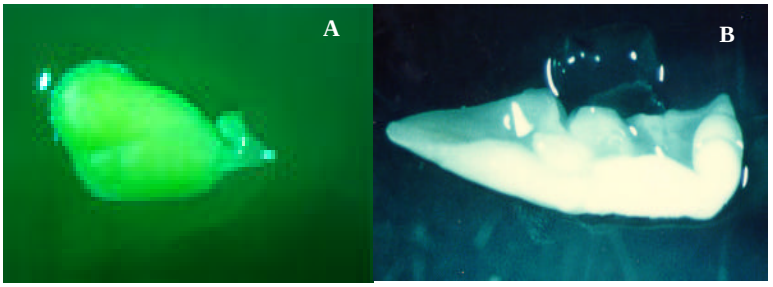


Figura 3.2: Embriones partenogénicos de melón rescatados *in vitro* tres semanas después de la polinización con polen irradiado. Estos embriones presentan características morfológicas que los diferencian de los zigóticos, como su aspecto cordiforme (**A**), ausencia y asimetría (**B**) de los cotiledones.

Los embriones identificados morfológicamente como partenogénicos fueron rescatados y transferidos al medio de cultivo E20H8. Este medio deriva del E20 descrito por Sauton y Dumas de Vaulx (1987), pero enriquecido con calcio, cobalto y hierro. En los primeros subcultivos el medio fue suplementado con 0.06 µM IAA (ácido indolacético) y 15 µM Thiosulfato de plata, para promover el crecimiento de raíces y superar la vitrificación.

Los embriones extraídos de las semillas fueron sembrados en placas petri (6 cm de diámetro) con 10 ml de medio E20H8. Durante las 6 a 8 primeras semanas de su desarrollo, los embriones se transfirieron a medio fresco cada dos semanas, fueron incubados a 28ºC, con un fotoperíodo de 16 horas de luz, e intensidad de 35 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Entre los 14 y 28 días después de la siembra, los embriones desarrollaron la radícula y empezaron a observarse las primeras hojas. Algunos embriones con malformaciones no llegaron a desarrollarse.

3.2.4. - Clonación *in vitro* de las plantas haploides

Una vez aparecidas las primeras hojas verdaderas, los embriones que se desarrollaron a plántulas se transfirieron a tubos y después a botes para favorecer su desarrollo. Los embriones que se desarrollaron y regeneraron fueron cultivados en medio E20H8.

Inicialmente los subcultivos a medio fresco se realizaron cada 2 semanas, con un máximo de 3 subcultivos consecutivos a medio E20H8, donde fueron micropropagados a partir de entrenudos y yemas axilares. Durante la fase de micropropagación las plantas fueron mantenidas en cámaras de cultivo e incubadas a 28ºC, con un fotoperíodo de 16 horas e intensidad de 70 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Posteriormente, las plantas se multiplicaron, dividiéndolas cada tres semanas por los entrenudos, hasta conseguir el volumen de planta necesario para poder determinar el nivel de ploidía de las líneas rescatadas y realizar los tratamientos de duplicación del número cromosómico sobre las líneas haploides.

3.2.5.- Determinación del nivel de ploidía

Los haploides pueden ser fácilmente detectados mediante citometría de flujo, gracias a la fuerte correlación existente entre el nivel de ploidía y la cuantificación del contenido de ADN por núcleo (Cuny *et al.,* 1992; Fahlenson *et al.,* 1988). El método de citometría de flujo descrito en Dolcet-Sanjuan *et al.*, (1997), fue utilizado para determinar el nivel de ploidía de cada línea, durante la clonación *in vitro* de las líneas rescatadas y después del tratamiento con colchicina. Este método consiste en el aislamiento mecánico de los núcleos celulares de tejidos de hojas jóvenes y posterior determinación del contenido de ADN nuclear. La muestra para analizar esta compuesta de tres a cuatro hojas jóvenes con crecimiento activo, cercanas al ápice. Unos 200mg de hojas de plantas, obtenidas por cultivo *in vitro* de embriones, son cortados en trozos muy finos y macerados, a temperatura ambiente, durante 5 minutos en 1 ml de tampón de lisis. LB01 con 2% (v/v) Triton X-100, para liberar los núcleos intactos. El sobrenadante es filtrado a través de una malla de nylon de 56 µm. Los núcleos son marcados con yoduro de propidio, y la fluorescencia roja es analizada usando un filtro a 675nm. Los resultados son presentados en un histograma que expresa la distribución de los núcleos de acuerdo con la intensidad de la fluorescencia roja, la cual es proporcional al contenido de ADN (**Figura 3.3**).

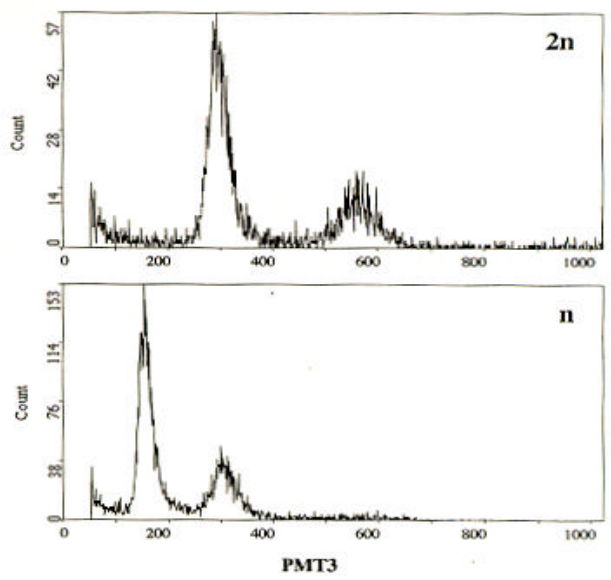


Figura 3.3: Patrón de ploidía tras análisis con citometría de flujo. En la gráfica de arriba se ve la curva entre 200-400 que indica un nivel diploide (2n) y el pico entre 100-200 de la gráfica de abajo indica haploidía (n)

Previo a las lecturas de las muestras, el citómetro de flujo es calibrado con una muestra control (diploide). Todas las muestras analizadas son comparadas con la muestra control y mediante el estudio de los picos de las curvas de ADN se asigna el nivel de ploidía a cada muestra.

3.2.6. - Duplicación del número cromosómico

La duplicación del número cromosómico se realizó con un tratamiento *in vitro* con colchicina. Se trataron de 100 a 200 entrenudos, con una o dos yemas axilares, por línea haploide. Los explantos fueron cultivados en placa petri en medio E20H8 suplementado con una concentración de colchicina de 500µM, disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO). Trascurridas 48 horas, los explantos fueron transferidos a medio E20H8 libre de colchicina.

Entre las 4 y 8 semanas después del tratamiento con colchicina, los nuevos brotes de cada línea fueron transferidos a medio fresco. En los primeros ensayos se analizó la ploidía de las plantas rescatadas para confirmar el efecto diploidizante de la colchicina. En

ensayos posteriores, la determinación del nivel de ploidía se realizó antes y/o después del tratamiento con colchicina. Las líneas dihaploides fueron micropropagadas hasta que fueron aclimatadas y transferidas a invernadero para su autofecundación y autoperpetuación por semilla.

3.2.7. - Mantenimiento *in vitro* de la población dihaploide

Las plantas seleccionadas por citometría de flujo se mantuvieron en cultivo *in vitro* en medio E20H8 hasta el momento de su aclimatación. Fueron transferidas a medio de cultivo fresco cada 3 o 4 semanas para mantenerlas en perfecto estado, multiplicándose para obtener un número de plantas óptimo para su aclimatación. Entre 20 y 30 plantas por línea fueron aclimatadas y pasadas a invernadero, donde fueron autofecundadas durante dos años consecutivos.

3.2.8- Aclimatación

Las plantas con un buen sistema radicular y 4 o 6 hojas normales fueron transferidas a condiciones *in vivo*, en donde el objetivo principal era obtener un elevado índice de supervivencia, resistenciá a condiciones ambientales y recuperación de la capacidad fotosintética. Las plantas fueron transferidas a bandejas alveoladas de 6x4 alvéolos. Como sustrato se utilizó material estéril con alta aireación y al mismo tiempo una buena disponibilidad química. Se utilizó una mezcla de turba y perlita con una proporción 2:1(v/v).

Las prevenciones fitosanitarias adoptadas en la fase más delicada de la aclimatación de la planta consistían en esterilizar el sustrato y lavar las raíces con el objetivo de retirar posibles restos de medio rico en azúcares, que podían inducir el desarrollo de microorganismos. El control de hongos se realizaba mediante un tratamiento con Captan (1g/l), previo a la transferencia de la planta al sustrato.

Otro de los factores importantes fue el control de las condiciones ambientales durante todo el proceso de aclimatación. Inicialmente la humedad relativa de la atmósfera de la planta debía ser elevada. Las plantas permanecieron la primera semana con ambiente saturado mientras que la segunda semana de aclimatación la humedad relativa decrecía

progresivamente. Una vez conseguida la aclimatación y recuperación de las actividades fisiológicas, las plantas fueron transplantadas en los invernaderos con el objetivo de autofecundarlas para la obtención de semillas.

3.2.9. – Autofecundación y obtención de LDHs

Al menos 20 plantas de cada línea dihaploide fueron aclimatadas, cultivadas y transferidas a invernadero para su posterior autofecundación. Partiendo de híbridos y líneas con floración andromonoica, las líneas dihaploides a autofecundar también poseen flores hermafroditas y masculinas sobre la misma planta. Las flores femeninas hermafroditas fueron polinizadas con su propio polen o el de flores masculinas de la misma línea. Se embolsaron las flores para evitar posibles contaminaciones con polen de otras líneas. Los frutos ya maduros, fueron recogidos y se extrajeron las semillas. Líneas con semillas después de la primera autofecundación fueron eliminadas del stock *in vitro*. Un mínimo de 50 semillas fue establecido para considerar una línea dihaploide perpetuada. Después de una segunda autofecundación más de un 80% de las líneas produjeron suficiente semilla. En condiciones adecuadas de almacenamiento (baja humedad relativa y entre 5 y 10º C) se pueden tener las semillas durante al menos 4 años.

3.3.- Determinación de la homocigosis de las LDHs

Una de las características de las plantas haploides y de las líneas dihaploides derivadas de ellas es que se tratan de individuos homocigotos, con una sola forma alélica de cada gen. Marcadores capaces de detectar polimorfismo entre los parentales permitirán seleccionar las líneas homocigotas derivadas de plantas haploides, siendo las líneas heterocigotas desechadas por proceder de un cruzamiento zigótico.

La homocigosis de las líneas dihaploides fue confirmada mediante la utilización de marcadores moleculares de tipo RFLPs y SSRs, tal como se explica en el **apartado 3.4**

3.4. – Marcadores moleculares

3.4.1.- RFLPs

El uso de un marcador RFLP conlleva una serie de pasos previos, en primer lugar se necesita un ADN de gran calidad, éste debe ser digerido con enzimas de restricción, ser transferido a un soporte sólido (membrana de Nylon), para posteriormente hibridarse con las sondas elegidas (Souther, 1975). Todo ello se realizó según el método descrito por Messeguer *et al.,* (1993).

Se analizaron las líneas con 78 sondas que previamente habían mostrado polimorfismo entre los dos parentales (Oliver *et al*., 2001), de forma que quedara cubierto todo el genoma, analizando de 5 a 7 de estos marcadores por cada grupo de ligamiento.

3.4.1.1.- Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de material vegetal de melón eligiendo hojas tiernas jóvenes de todas las LDHs, utilizando el método descrito por Doyle y Doyle (1990) con ligeras modificaciones destinadas a mejorar la calidad de ADN extraído. Se recogieron de 3 a 4 gramos de tejido. El material se mantuvo congelado a – 80ºC hasta su utilización. Como se ha mencionado anteriormente, para el análisis con RFLPs se necesita un ADN de alta calidad, para ello se realizó una purificación por gradiente de cloruro de cesio. La concentración y calidad del ADN se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, con tampón NEB 0.25x (gel de calidad), sometiéndolos a una corriente eléctrica de 80V durante 1 hora (**Figura 3.4**). El ADN de buena calidad aparece como una banda compacta de alto peso molecular sin restos de degradación de menor peso molecular.

El proceso seguido para la extracción de ADN fue el siguiente:

1.- Recoger el material vegetal (3-4 gramos) en tubos de centrífuga de 50ml y triturarlo con N_2 líquido.

2.- Añadir Tampón de extracción ‘CTAB’ (Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromide) en una proporción de 7.5 ml por gramo de tejido.

3.- Incubar los tubos al baño María a 65ºC durante ½ hora, agitándolos cada 5 minutos.

4.- Añadir entre 0.75 y 1 volumen de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar invirtiendo los tubos hasta conseguir una mezcla homogénea.

5.- Centrifugar durante 20 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente.

6.- Recoger la fase acuosa transfiriéndola a un tubo nuevo. Si la fase es muy turbia se puede repetir los pasos 4, 5 y 6.

7.- Añadir 0.66 volúmenes de isopropanol frío (-20ºC) lentamente, teniendo cuidado en que no se mezclen las fases. Dejar reposar unos minutos y mezclar suavemente por inversión hasta que se homogenicen las fases y precipite el ADN. Si no se observa mucho ADN se pueden dejar en el congelador durante una hora para aumentar la cantidad de ADN que precipita.

8.- Recoger el ADN con ayuda de una pipeta Pasteur con la punta doblada y sellada por calor y transferirlo a un tubo de 10 ml con tampón de lavado. Dejar reposar un mínimo de 2 horas o durante toda la noche, en la nevera a 4ºC.

9.- Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.

10.- Eliminar el sobrenadante y secar el ADN (pellet), dejando los tubos invertidos sobre papel absorbente durante 30-45 minutos.

11.- Resuspender el ADN en TE (el volumen variará dependiendo del ADN obtenido, se añadieron entre 0.5-2 ml).

Las soluciones utilizadas son:

Tampón de extracción (CTAB):	CTAB 2% (p/v) NaCl 1.4 M Tris-HCl 100mM, pH 8.0 EDTA 20mM 2- Mercaptoetanol 0.2% (v/v)
Tampón de lavado:	Etanol 76% Acetato amónico 10mM
TE:	Tris 10mM EDTA 1mM Ajustar el pH a 8.0 con HCl

Se realizó así mismo una fase final de limpieza por gradiente de CsCl, destinada a eliminar polisacáridos y proteínas de las muestras extraídas. Para ello se realizaron los siguieron pasos:

1.- Pesar 4.025 g de CsCl en un tubo Falcon de 10 ml.

2.- Añadir en este orden: 100 µl de Bromuro de Etidio (20mg/ml), el ADN disuelto en TE, y TE hasta que el peso final sea de 4.16 g.

3.- Mezclar hasta disolver el CsCl y transferir el contenido a un tubo Quick Seal de ultracentrífuga de 5ml.

4.- Equilibrar el peso de los tubos dos a dos (± 0.005g) y sellarlos con calor.

5.- Centrifugar a 50000rpm, durante un mínimo de 16 horas a 25ºC.

6.- Extraer la banda de ADN con una pipeta Pasteur y transferirla a un tubo Falcon.

7.- Añadir 5ml de TE y 5ml de alcohol isoamílico. Mezclar.

8.- Retirar la fase superior y añadir otros 5 ml de alcohol isoamílico.

Este paso se repite hasta que la fase inferior quede completamente transparente (sin restos de Bromuro de etídio).

9.- Transferir la fase inferior limpia a un tubo de 50 ml y añadir TE hasta un volumen de 15 ml.

10.- Añadir 1.5 ml de acetato sódico 3M, pH 5.3 y 2.5 volúmenes de etanol 96ºC frío (-20ºC).

11.- Mezclar invirtiendo los tubos suavemente hasta observar el precipitado.

12.- Recoger el ADN con ayuda de una pipeta Pasteur con la punta doblada y sellada, secarlo y resuspenderlo en el volumen de TE que se considere conveniente en función de la cantidad de precipitado obtenido.

La calidad de ADN obtenido se estimó visualmente mediante geles de calidad. Para ello se hicieron geles de agarosa al 1% y NEB 0.25x, se cargó en el gel 2 µl de ADN de cada una de las muestras y dos muestras de un estándar de ADN genómico del bacteriófago lambda (λ ADN) de concentración conocida. La electroforesis se realizó aplicando una corriente eléctrica de 80V durante 1 hora. Una vez finalizada, se tiñó el gel con Bromuro de Etídio, se lavó con agua destilada y se visualizo a través de luz UV. Las bandas obtenidas se compararon con el estándar (**Figura 3.4**).

Las soluciones utilizadas para el gel de agarosa fueron:

Tampón NEB 10x:	Tris 1M
	EDTA 10mM
	Acetato sódico 0.12 M
	Ajustar el pH a 8.1 con ácido acético.
Solución azul de bromofenol:	Azul de bromofenol 0.6% (p/v)
	Glicerol 70% (v/v)
	SDS (Sodium dodecil Sulphate) 0.2% (v/v)
	NEB 0.5x
	EDTA 20mM

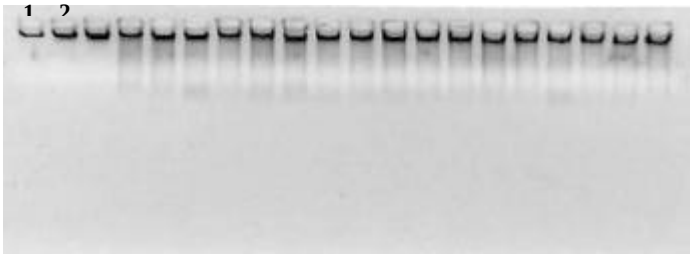


Figura 3.4: Gel de calidad de ADN, extraído a partir de hojas de melón, de diversas muestras para comprobar su concentración. Los 2 primeros carriles por la izquierda, se corresponden con muestras de pesos estándar de referencia (?=100 y 200ng respectivamente).

3.4.1.2.- Digestión de ADN con enzimas de restricción

El ADN extraído fue digerido con tres enzimas de restricción, EcoRI, EcoRV y BstnI (MBI Fermentas) que proporcionaban polimorfismo para las sondas elegidas que se iban a hibridar. Las dianas de restricción de estas tres enzimas son:

EcoRI: 5' G↓AATTC 3'
EcoRV (Eco321): 5' GAT↓ATC 3'
BstnI (Mval): 5' CC↓AGG 3'
5' CC↓TGG

La digestión del ADN genómico con enzimas de restricción se realizó en un volumen de 25µl utilizándose los siguientes reactivos: Tampón 1x (tampón de reacción específico, suministrado juntamente con el enzima, por la misma casa comercial), espermidina 40mM y 3-5 µg de ADN. Se mantuvieron en incubación a 37ºC durante un mínimo de 3 horas (excepto para BstnI que fueron necesarias un mínimo de 6h a esa misma temperatura). Una vez finalizada la digestión, se paró la reacción añadiendo 5µl de Azul de Bromofenol. En caso de no realizar inmediatamente la electroforesis se conservó a –20ºC hasta el momento de su utilización.

3.4.1.3.- Electroforesis

Los fragmentos resultantes de la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0.9 % y NEB 1x. La electroforesis se realizó muy lentamente aplicando una corriente eléctrica de 30V durante 16 horas. En los primeros carriles de los geles se cargaron los parentales y λ ADN digerido EcoRI-Hind III como marcador de peso molecular. Una vez finalizada la electroforesis, para comprobar el resultado de la digestión, se tiñó el gel con Bromuro de Etidio, se lavó con agua destilada y se visualizó a través de luz UV (**Figura3.5**).

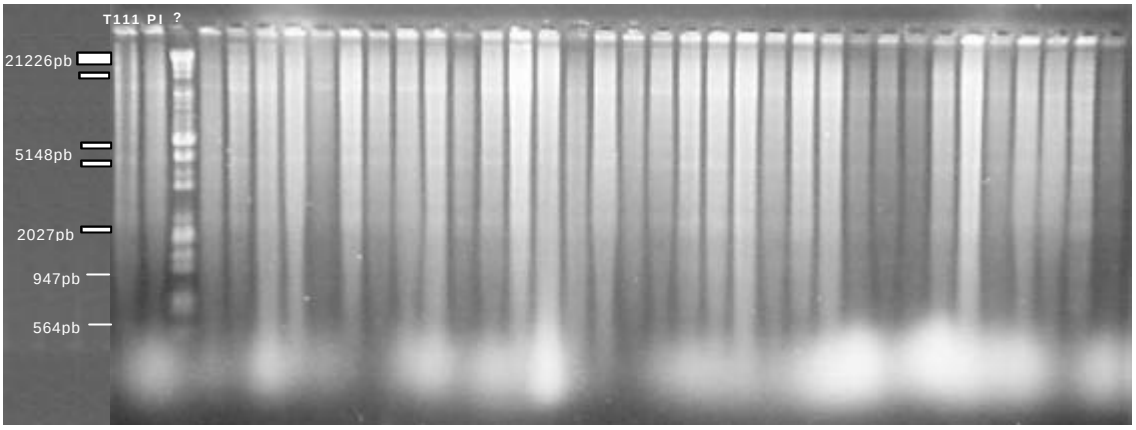


Figura 3.5: Gel de agarosa 0.9% de la digestión con el enzima de restricción EcoRV. Los fragmentos generados son muy numerosos y se apreciaron como una banda continua. En los dos primeros carriles se cargaron los parentales (T111 y PI), en el tercero se cargó el marcador de peso molecular y el resto de carriles fueron de ADN de las LDHs.

3.4.1.4- Transferencia del ADN a soporte sólido

Los fragmentos de restricción separados por electroforesis fueron transferidos desde el gel de agarosa a un soporte sólido (membrana de nylon de tipo Hybond N+) mediante el procedimiento de transferencia alcalina desnaturalizante. Para ello se siguieron los siguientes pasos (Memelink *et al*., 1994):

1.- Lavar el gel en agua destilada durante 20 minutos.

2.- Despurinizar el ADN sumergiendo el gel en HCl 0.25 N durante 10 minutos. Mantener en agitación.

3.- Aclarar el gel con agua destilada y sumergirlo en NaOH 0.4N durante un tiempo no inferior a 10 minutos. Todos los elementos de la transferencia se empaparon en esta solución.

4.- Preparar una bandeja llena de NaOH 0.4N, poner un cristal o metacrilato encima del cual se pone un papel Watman empapado en esta solución de forma que quede siempre en contacto con la solución y vaya subiendo por capilaridad, quedando siempre mojado el papel (**Figura 3.6**).

5.-Colocar sobre el papel, por este orden, los siguientes elementos empapados de NaOH 0.4N: dos piezas de papel Whatman, el gel invertido, la membrana de nylon, y dos piezas más de papel Whatman. Evitar la formación de burbujas entre los diferentes elementos.
6.- Poner una pila de papeles absorbentes secos convenientemente cortados y un peso (0.5-1Kg) encima, que presione homogéneamente todo el conjunto. Asegurarse que el único camino posible de absorción del tampón sea a través del gel y la membrana.
7.- Mantener la transferencia durante 6-12 horas.
8.- Comprobar que la totalidad de ADN se ha transferido, tiñendo de nuevo el gel con Bromuro de Etidio y visualizándolo a través de la luz UV.
9.- Lavar la membrana durante 5 minutos en una solución de 2x SCC.
10.- Fijar el ADN poniendo la membrana en la estufa a 80ºC durante 2 horas.
Una vez fijado el ADN las membranas se pueden conservar en la nevera (4ºC) o a temperatura ambiente; y ser reutilizadas varias veces (10-15 veces).

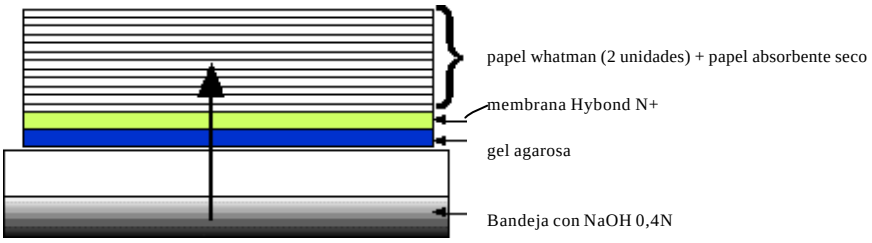


Figura 3.6: Esquema del proceso de transferencia del ADN digerido a un soporte sólido (membrana de nylon), y el orden en que deben ir colocados los distintos elementos. La flecha indica la dirección del NaOH que irá subiendo por capilaridad.

3.4.1.5.- Hibridación de las membranas y detección de las sondas

La hibridación y detección de las sondas se realizó mediante el método de marcaje radiactivo que incluye varias fases: la prehibridación, el marcaje de la sonda, la hibridación, lavados y exposición de las membranas y la eliminación de la sonda.

Las sondas utilizadas procedían de ADN genómico y cDNA en su mayoría (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3: Origen de las sondas utilizadas para los RFLPs

Origen de las sondas	Fuente	Nº de sondas analizadas	Nomenclatura
ADNc de melón	INRA-Avignon (Francia)	12	CM
ADNc de melón (plántula PI 1613759)	IRTA -Cabrils	24	MC (1-60)
ADNc de melón (fruto T111)	IRTA -Cabrils	39	MC(200-392)
Genómica de melón (hojas T111)	IRTA-Cabrils	2	MG
Homólogos de genes de resistencia	IRTA-Cabrils	1	MRGH

A.- Prehibridación:

Calentar el tampón de hibridación (TH) a 65ºC.

Poner al baño María a temperatura de ebullición una solución de ADN de esperma de salmón (ssDNA, 5g/l) durante 10 minutos. Inmediatamente después ponerlo en hielo.

Mezclar el ssDNA con el tampón de hibridación en una relación de 2ml de ssDNA por cada 100 ml de TH.

Poner la mezcla en una bandeja de hibridación (100ml por cada 4 membranas), poner las membranas y tapar bien para evitar la evaporación.

Mantener prehibridándose durante 2-3 horas a 65ºC.

B.- Marcaje de la sonda:

Se utilizó el método de marcaje para la incorporación al azar ('random priming') de nucleótidos radiactivos (αP^{32}-dctp) (Sambrook *et al*., 1989).

Poner en un tubo eppendorf 100-150 ng de sonda (plásmido purificado o sonda amplificada vía PCR y purificada). Volumen final 7µl, si la sonda está muy concentrada se diluye con agua hasta este volumen.

Desnaturalizar la sonda a 100ºC durante 5 minutos.

Poner en hielo 3-4 minutos y recoger el volumen de las paredes del tubo mediante una centrifugación rápida. Mantener en hielo.

Añadir 11 µl de la mezcla LS y 4 unidades del fragmento *Klenow* de ADN polimerasa.

En el laboratorio de radiactividad añadir 2 µl de αP^{32}-dctp (3.000Ci/mol).

Mantener la reacción de marcaje a 37ºC durante 3 horas.

Parar la reacción añadiendo un volumen de NaOH 0,4N. Dejando desnaturalizarse 5-10 minutos a temperatura ambiente.

Utilizando este procedimiento también se marco el marcador de peso molecular (λ ADN EcoRI-Hind III).

C. -. Hibridación, lavados y exposición de membranas:

Añadir todo el volumen de la sonda y 1-2µl de λ ADN EcoRI-Hind III ya marcado y desnaturalizados en la bandeja de prehibridación. Mezclar.

Proteger de la evaporación y mantener en la hibridación a 65ºC durante 24-48 horas.

Retirar las membranas y sumergirlas en la solución de lavados 2x SSC, previamente calentada a 65ºC. Mantener en agitación a esta temperatura durante 15-20 minutos.

Desechar la solución anterior en el bidón de residuos líquidos y se añade una nueva solución de lavado 1x SSC a 65ºC.

Mantener en agitación a 65 ºC durante 15-20 minutos más y desechar la solución como en el paso anterior.

Se puede hacer otro lavado de astringencia con la solución de lavado 0.5x SSC actuando de igual modo que en los dos pasos anteriores.

Escurrir y envolver las membranas en papel de plástico (tipo Glad o similar).

Colocar las membranas dentro de un cassette de autorradiografía junto con una película de rayos X y una pantalla intensificadora. Mantener expuesto a -80ºC.

El tiempo de exposición varia en función de la señal emitida que puede ser medida por un contador Geiger. Las membranas se mantuvieron expuestas una media de una semana.

Las soluciones utilizadas son:

Tampón de hibridación (TH): (1 litro)	10g BSA ('Bovine Serum Albumin') 150ml H_2O bidestilada 500ml tampón fosfato 350 ml SDS 20% (p/v)
Tampón fosfato:	4 volúmenes de Na_2HPO_4 1M 1 volumen de NaH_2PO_4 1M pH 7.12-7.20 (no hace falta ajustar)
Mezcla LS: (conservar a –80ºC)	25 volúmenes HEPES (N-[2-Hydroxyethil] piperazine N'-[2-ethanesulfonic acid] 1M, pH a 6.6 con NaOH 25 volúmenes de la solución DTM 7 volúmenes de solución OL

Solución DTM:	485µl Tris-HCl 1M, pH 8.0
	48.5 µl $MgCl_2$ 1 M
	6.8 µl β-mercaptoetanol
	1.400 µl H_2O
	dATP, dGTP, dTTP 3mM
Solución OL:	50u hexanucleótidos
	560µl TE (estéril y frío)
Solución lavado 2xSSC:	100ml SSC 20x
(1 litro)	5ml SDS 20% (p/v)
Solución lavado 1xSSC:	50 ml SSC 20x
(1 litro)	5ml SDS 20% (p/v)
Solución lavado 0,5xSSC:	25 ml SSC 20x
(1 litro)	5ml SDS 20% (p/v)

3.4.2.- SSRs

En este trabajo se emplearon 86 SSR de diferentes orígenes con cebadores específicos de secuencias de melón (74) y de pepino (12). El desarrollo de los SSRs fue a partir de bibliotecas genómicas de melón (CM y NR) y de pepino (CS), obtenidos en el laboratorio de genética molecular de 'Newe Ya'ar Research Center' (ARO-Ramat Yishay, Israel). La secuencia de algunos de ellos ya ha sido publicada (Katzir *et al*., 1996; Danin-Poleg *et al*., 2000) mientras que los NR pertenecen a un consorcio privado y no han sido publicados. Los microsatélites restantes de pepino (CSW) fueron obtenidos en el Departamento de Horticultura de la Universidad de Wisconsin (USDA-Madison, USA) (Fazio *et al*., 2002) y los TJ fueron desarrollados a partir de ESTs (Expressed-Sequence Tags) de melón en el laboratorio de Genética Vegetal del IRTA de Cabrils en el año 2002. (Monforte y García-Mas, datos no publicados).

La amplificación por PCR se realizó en termocicladores de tipo Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700 y la reacción varió para cada SSR en función de la temperatura de hibridación de los cebadores y de la concentración de $MgCl_2$ (**Tabla 3.4**).

Tabla 3.4: Temperaturas de hibridación (Ta) de los cebadores y concentraciones de $MgCl_2$ para los SSR utilizados. En la tabla se muestra también los tamaños medios esperados de los fragmentos amplificados. Los SSR sombreados fueron detectados por el método radiactivo, el resto se detectaron por el método no radiactivo en el secuenciador automático Li-Cor IR^2.

SSR	Ta	Mgcl2	tamaño medio
CMGA15	51	2	150
CMAT35	51	2	110
CMCT47	51	2	168
CMAG59	45	2	124
CMGA104	45	2	125
CMGA108	51	2	187
CMGA128	51	2	119
CMTA134B	51	2	159
CMAT141	51	2	176
CMCCA145	51	2	142
CMACC146	51	2	152
CMTC160	51	2	215
CMCA165	51	2	97
CMTAA166	51	2	167
CMTC168	51	2	200
CMTA170A	51	2	160
CMGA172	51	2	114
CMCT505	51	2	179
CSGA057	51	2	215
CSAT425B	45	2	93
CSAT425A	51	2	109
CSCCT571	51	2	209
CSWCT01	51	2	242
CSWTA02	51	2	229
CSWCT02	51	2	203
CSWCT10	51	2	183
CSWCT11	51	2	226
CSWCT18B	51	2	182
CSWCT22A	51	2	243
TJ2	57	2	150
TJ3	57	2.5	158
TJ10	57	2.5	117
TJ12	40	2.5	139
TJ21	51	2	195
TJ23	51	2	158
TJ24	59	2.5	165
TJ26	59	2.5	133
TJ27	59	2.5	171
TJ29	59	2.5	137
TJ30	59	2.5	178
TJ31	59	2.5	196
TJ33	59	2.5	196
TJ37	43	2	127
TJ38	51	2	135

SSR	Ta	Mgcl2	tamaño medio
NR1	51	2	155
NR2	51	2	172
NR3	51	2	203
NR4	51	2	126
NR5b	51	3.5	146
NR6	51	2	151
NR7	51	2	130
NR8	57	3.5	164
NR9	51	2	225
NR12	40	2.5	179
NR14	51	2	165
NR18	57	2.5	172
NR19	57	2.5	103
NR21	51	2	135
NR22	51	2	166
NR30	51	2	193
NR33	51	2	122
NR35	51	2	186
NR38	51	2	141
NR39	51	2	158
NR41	40	2.5	129
NR45	57	2.5	100
NR50	57	2.5	134
NR52	51	2	135
NR53	57	3.5	160
NR56	59	3.5	100
NR61	59	2.5	168
NR62	57	2.5	145
NR66	40	3.5	127
NR67	51	2	145
NR68	51	2	190
NR71	51	2	160
NR73	51	2	130
NR75	51	2	157
NR79	51	2	153
NR80	40	2	159
NR89	51	2	138
NR92	51	2	140
NR94	35	2	167
NR100	51	2	175

3.4.2.1.- Métodos de detección de SSR

La amplificación de los loci SSR o microsatélites y la separación y detección de los productos de PCR se realizó utilizado los métodos de marcaje radiactivo y separación en geles de secuenciación descrito por Katzir *et al.*, (1996) o bien por un método de amplificación no radiactivo marcando uno de los cebadores con un fluorocromo y separando y visualizando los fragmentos en un secuenciador automático Li-Cor IR^2.

3.4.2.1.1.- Método Radiactivo

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 15µl conteniendo: tampón lab 1x, $MgCl_2$ 10mM, 0.6 µM de cada uno de los cebadores (forward y reverse), 166 µM de los nucleótidos dATP, dTTP y dGTP, 2 µM de dCTP, 0.1 µl de α^{33} P-dCTP (3000Ci/mmol), 2 unidades de *Taq* polimerasa y 60 ng de ADN molde. La amplificación se llevó a termino en 35 ciclos variando la temperatura de hibridación en función de los cebadores (**Tabla 3.4, sombreados**), precedidos de una desnaturalización inicial a 94ºC durante 1 minuto y una extensión final a 72ºC durante 5 minutos.

Los tiempos de la reacción de PCR fueron los siguientes.

94º C (desnaturalización): 30 segundos

35-65ºC(hibridación de cebadores): 30 segundos

72ºC(síntesis de cadena complementaria):30 segundos

Después de añadir 10µl de Tampón de carga y desnaturalizar (10 minuto a 100ºC), los productos de amplificación se separaron (2-3 µl por pocillo) en geles desnaturalizantes de acrilamida al 6%, Tampón TBE 1x y urea 7.5 M. Para hacer el gel se añade acrilamida (100ml), APS (amonium persulfato)10% (400µl) y TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) (75µl). Los geles se corrieron en el mismo tampón (TBE 1x) a una intensidad constante de 60W (aprox. 2000V) durante 2-3 horas. Después de secarlos los geles fueron expuesto en una película de rayos X hasta el día siguiente.

Las soluciones utilizadas son:

Tampón Lab 10x: $MgCl_2$ 10mM
KCl 500mM
Tris 100mM

Gelatina 0.01%
Ajustar el pH a 8,3 con HCl

Tampón TBE 10 x: Tris-Borat 890 mM
EDTA 10mM, pH 8.0

Tampón de carga: Formamida 95% (v/v)
EDTA 10mM, pH 8.0
Azul de Bromofenol 0.01% (p/v)
Xilencianol 0.01% (p/v).

3.3.2.1.2.- Método no radiactivo

La separación de fragmentos de los SSR se realizó usando el secuenciador automático Li-Cor IR^2, para visualizar los fragmentos en este aparato, uno de los cebadores (forward) se marca con el fluorocromo IRD800 de manera que sea detectado con el láser.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 15 µl conteniendo: tampón SSR 10x, 25mM $MgCl_2$, 0.2 µM de cada uno de los cebadores (forward y reverse), 50 µM de los nucleótidos dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 2 unidades de *Taq* polimerasa y 60 ng de ADN molde. La amplificación se llevó a termino en 35 ciclos variando la temperatura de hibridación en función de los cebadores (**Tabla 3.4, no sombreados**), precedidos de una desnaturalización inicial a 94ºC durante 1 minuto y una extensión final a 72ºC durante 5 minutos.

Los tiempos de la reacción de PCR fueron los siguientes.

94º C (desnaturalización): 30 segundos

35-65º C(hibridación de cebadores): 30 segundos

72º C(síntesis de cadena complementaria): 1 minuto

Después de añadir 5 µl de Tampón de carga y desnaturalizar (10 minutos a 100º C), los productos de amplificación se separaron (0.8 µl por pocillo) en geles desnaturalizantes de acrilamida al 6%, Tampón TBE 1x y urea 7.5 M, para hacer el gel se añade acrilamida (50ml), APS 10% (200µl) y TEMED (40µl). Los geles se corrieron en el mismo tampón

(TBE 1x) y se ajustaron los parámetros del secuenciador Li-Cor para una óptima lectura de los mismos.

Los tampones utilizados son los mismos que los empleados en el método radiactivo a excepción del Tampón SSR 10x que se cita a continuación:

Tampón SSRs 10x: Tris-HCl 750 mM, pH 8.8
$(NH_4)_2SO_4$ 200mM
Tween-20 0.1% v/v.

3.4.1.- Otros marcadores

En el mapa de ligamiento se posicionaron también 2 marcadores morfológicos: número de carpelos (Carp) y resistencia al MNSV, Mosaic Necrotic Spot Virus, (NSV) (Morales *et al*., 2002), 1 marcador de tipo SCAR (X15) y 2 marcadores de tipo CAPS (M29 y M132). El marcador morfológico (Carp) se generó a partir de los datos obtenidos en el estudio de morfología floral (**apartado 3.6.1**), los otros 4 marcadores fueron generados para la realización de una tesis doctoral en el departamento de Genética Vegetal del IRTA de Cabrils por Mónica Morales.

3.5.- Análisis de ligamiento

3.5.1.- Determinación del polimorfismo entre parentales

Todos los RFLPs empleados eran polimórficos con las dos líneas de melón a partir de las cuales se generó la población de LDHs (PI 161375 y T111), ya que se habían hecho estudios previos para la generación del mapa de la F_2 a partir de estos mismos parentales (Oliver *et al*., 2001). Así mismo, se conocía que eran polimórficos los microsatélites desarrollados a partir de bibliotecas genómicas de melón y pepino (Danin-Poleg *et al*., 2001) y 10 microsatélites desarrollados en el Departamento de Horticultura de la Universidad de Wisconsin (USDA-Madison, USA) a partir de ADN genómico de pepino (Fazio *et al*., 2002).

Del resto de los microsatélites, 89 SSRs desarrollados en el laboratorio de genética molecular de 'Newe Ya'ar Research Center' y 37 desarrollados a partir de ESTs (Expressed-Sequence Tags) de melón en el laboratorio de Genética Vegetal del IRTA de Cabrils en el año 2002 (Monforte, A J y García-Mas, J; datos no publicados), se estudió el grado de polimorfismo. Los SSRs fueron detectados por PCR según el método radiactivo descrito en el **apartado 2.4.2.1** de este trabajo. Las características de estos microsatélites aparecen en el **Anexo1.**

3.5.2.- Construcción de un mapa genético

De las 95 LDHs que se obtuvieron por la técnica de partenogénesis inducida *in situ*, 7 fueron eliminadas durante el 2º año de autofecundaciones ya que presentaron un patrón de bandas tras el análisis con RFLPs que las identificó como heterocigotas (5 LDHs de las 7 eliminadas), o por no llegar al mínimo número de semillas que se necesitaba para que la línea se considerase fijada (2 LDHs de las 7 eliminadas). De esta manera, quedaron 88 LDHs para la generación de un mapa de ligamiento. Dentro de estas 88, 11 corresponden a las LDHs del año 2000-01 y como no se poseían datos para muchos de los marcadores analizados (sobre todo de los del tipo RFLPs), se eliminaron para que la falta de datos no distorsionara las distancias entre marcadores en el mapa. Así, únicamente se emplearon 77 líneas en la generación de un mapa genético de la población de líneas dihaploides.

El mapa genético se construyó con el programa MAPMAKER v. 3.0 (Lander *et al*., 1987). Los marcadores se asociaron utilizando el comando "group" con un LOD = 3. Para convertir las unidades de recombinación a distancias genéticas se utilizó la función de Kosambi. Una vez establecidos los grupos se realizó para cada uno de ellos el análisis "three point" y mediante el comando "order" se seleccionó la secuencia más probable. Los loci de esta secuencia, fueron considerados el esqueleto o estructura básica de cada grupo de ligamiento. El resto de loci se añadieron en la posición más probable, empleando el comando "place". Finalmente, se determinó la distancia entre loci mediante el comando "map".

La representación gráfica del mapa se realizó con el programa MapChart (Voorrips, 2002) a partir de los datos obtenidos con el programa MAPMAKER.

3.5.3.- Integración de mapas

Se realizó la integración de dos mapas genéticos generados a partir de dos poblaciones diferentes partiendo de los mismos parentales, la F_2 del cruce PI 161375 x T111 (Oliver *et al*., 2001) y la población de LDHs generada a partir de la F_1 de este mismo cruce con el programa JOINMAP ®3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001), empleando el comando 'Combine Groups for Map Integration'.

Se generaron así, dos mapas uno de ellos con todos los marcadores tanto dominantes como codominantes y otro mapa para el que se utilizaron únicamente los marcadores codominantes de alta calidad.

En la generación del mapa con todos los marcadores, se emplearon además de los marcadores ya mencionados en apartados anteriores (**Apartado 3.4.1.5** y **Apartado 3.4.2**), isoenzimas: ACO (del sistema enzimático aconitasa) y PDG (del sistema enzimático de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa), RAPDs que fueron identificados con un prefijo (OP), una letra (de la A a la Y correspondiente al Kit a partir del que se generaron los cebadores), el número de cebador (del 1 al 20) y la medida (en Kb), AFLPs que se identificaron con la combinación de los nucleótidos selectivos MseI+3/ EcoRI+3 de los cebadores utilizados para detectarlos y su medida correspondiente en pares de bases e Inter-SSR cuya nomenclatura son las cuatro bases repetidas que los constituyen. Así mismo, en el mapa de la F_2 existía un número adicional de marcadores codominantes que no se habían empleado en el mapa de la población de LDHs. Algunos de ellos mantuvieron la nomenclatura tal como aparece en las **Tablas 3.3 y 3.4**, para los RFLPs y. SSR respectivamente, mientras que otros que corresponden a genes homólogos putativos de ESTs de *Arabidopsis* poseen diferente nomenclatura (Oliver *et al*., 2001).

3.5.4.- Estudio de la segregación alélica

Se realizó la determinación del genotipo de cada individuo de la población de LDHs para todos los marcadores analizados. Los análisis de ajuste de la segregación observada a la esperada 1:1 se realizó con el test χ^2 utilizando los datos obtenidos en el programa JOINMAP ®3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001), considerándose significativos valores con $p<0.001$, eligiéndose este valor de significación para evitar la aparición de falsos positivos.

Para estimar la distribución global en la población de los alelos, se eligieron marcadores en intervalos de 15-20cM para que la densidad de los marcadores analizados por grupo de ligamiento fuera homogénea. Además, se estudió la distribución de las frecuencias alélicas para cada grupo de ligamiento, en este caso se emplearon los datos de todos los marcadores utilizados para la generación del mapa. Si en algún grupo de ligamiento, un único marcador dio valor significativo no fue tomado en cuenta, ya que se asumió que era un error del marcador.

3.6.- Análisis de QTLs

En la población de LDHs generada en este trabajo (**Apartado 4.1**) segregaron diversos caracteres relacionados con la morfología floral, morfología de fruto y la germinación que fueron analizados.

3.6.1.- Material Vegetal

En el año 2001 se sembraron 85 LDHs, 2 plantas por línea, en contenedor de 30cm de diámetro en un sustrato a base de turba, corteza de pino y arena (1:1:1, v:v:v). El ensayo se realizó en invernadero de cristal, disponiendo las plantas ordenadas según su número de código. Durante este año se analizaron una media de 10 flores por línea, recogiendo las flores en el momento de su apertura.

En el año 2002, se sembraron 91 líneas, 3 plantas por línea, en un diseño completamente aleatorio. La siembra se realizó directamente en tierra en suelo arenoso en invernadero de plástico. Este año las líneas se sembraron con el objetivo de ser autofecundadas, aprovechando para analizar los caracteres de morfología floral, por lo cual no se obtuvieron flores de todas las líneas dando prioridad a la obtención de fruto. Las flores fueron autofecundadas manualmente, recolectándose los frutos cuando maduraron. Una vez cuajado el fruto, el resto de flores fueron analizadas. Esto se vio reflejado en el menor número de flores que pudieron ser analizadas, con una media de 5 flores por línea, y que las flores fueron recogidas en un estado más avanzado del desarrollo.

En ambos años las plantas fueron regadas por goteo, con abono.

3.6.2.- Caracteres de morfología floral

Se estudiaron 11 caracteres florales los años 2001-02 y 3 (número y densidad de estambres y exerción del pistilo) únicamente el año 2002. Los caracteres estudiados fueron:

a) Diámetro de corola (Dcor): Longitud del diámetro máximo de la corola extendida. Se midió en mm.

b) Número de pétalos (Npet).

c) Número de sépalos (Nsep).

d) Longitud de pelo en el ovario (LogPel), considerándose tres posibles clases fenotípicas: 1- pelos cortos, como PI 161375, 2- pelos de tamaño intermedio y 3- pelos largos, como T111.

e) Pubescencia del ovario (Pbov). Se consideraron 5 clases: 1.- pocos pelos (menor que PI161375), 2.- aspecto lampiño (como el PI161375), 3- intermedio entre los dos parentales, 4.- aspecto lanoso (como el parental T111) y 5.- mas pelos que el T111 (**Figura 3.7**).

Figura 3.7: Diferencias en la pubescencia del ovario entre las LDHs. En la figura **A** se ven de izquierda a derecha, fenotipo 4 (pelos compactos), fenotipo 3 (intermedio entre los dos parentales) y fenotipo 2 (pelos dispersos). En la figura **B** se representan los dos fenotipos extremos, a la izquierda el fenotipo 1 (pocos pelos) y a la derecha el fenotipo 5 (mayor densidad que el T111).

f) Densidad de pelos del ovario (Dnspel): Se contó el número de pelos del ovario con una lupa binocular de 40 aumentos, en una distancia de 0.2mm, haciendo 4 medidas en diferentes partes de la flor y haciéndose la media de los valores obtenidos.

g) Longitud del ovario (Lgov), expresado en mm.

h) Diámetro de ovario (Dov), expresado en mm.

i) Relación longitud/ diámetro del ovario (L/dov), esta relación da información sobre la forma del ovario.

j) Peso de la flor (Pflor), expresado en gramos.

k) Número de carpelos (Ncarp).

l) Número de estambres (Nestb).

m) Densidad de estambres (Dnsestb). Se definieron tres clases: (1) estambres unidos, (2) estambres agrupados en ramilletes, y (3) estambres muy separados.

n) Exerción del pistilo (Expist). Se clasificaron tres clases fenotípicas: (1) Los estambres se sitúan envolviendo el pistilo, (2) los estambres están situados a la misma altura que el pistilo, pero no lo envuelven y (3) el pistilo sobresale entre los estambres (**Figura 3.8**).

Figura 3.8: Diferencias en la posición de los estambres en relación con el pistilo presentadas por las líneas de la población de LDHs. En la imagen **A**, se observan estambres unidos y que envuelven el ovario, en la imagen **B** se observan estambres en ramillete que están a la misma altura que es pistilo pero sin envolverlo y en la imagen **C** se aprecia estambres separados menores que el pistilo que sobresale.

3.6.3.- Caracteres de morfología de fruto:

Los frutos obtenidos en el año 2002 se analizaron tomando datos de los siguientes caracteres:

a) Longitud de fruto (Lgft), expresado en cm.

b) Diámetro de fruto (Dft), midiendo el diámetro máximo del fruto, expresado en cm.

c) Relación longitud/ diámetro de fruto (L/dft), esta relación da información sobre la forma del fruto.

e) Peso del fruto (Pfrut), expresado en gramos.

3.6.4.- Caracteres relacionados con la germinación de las LDHs

Se estudiaron caracteres relacionados con la germinación de las LDHs, durante tres años consecutivos. Se sembraron 25 semillas de cada línea en bandejas cubiertas con papel absorbente para mantener la humedad.

En el año 2000 las semillas se germinaron en cámara de germinación a 35º C y con iluminación. Se hicieron 2 siembras este año (2000a y 2000b) y únicamente se calculó el porcentaje de germinación total de las líneas.

En el año 2001 el ensayo se llevó a cabo en la misma localización, en cámara de germinación, a 35ºC e iluminación. Se midió el porcentaje de germinación total de las líneas y tomaron datos del número de semillas germinadas al día, durante 10 días, a partir de los cuales de calcularon: porcentaje de germinación en la mitad del experimento (**D50**=% germinación el 5º día), el porcentaje de germinación transcurridas las ¾ partes del tiempo que duró el ensayo (**D75**=% germinación el 8º día), el número de semillas germinadas el 5º día del ensayo por el número de semillas germinadas total en cada familia al final del ensayo (**R50**) y el número de semillas germinadas el día 8 / número de semillas germinadas total en cada familia al final del ensayo (**R75**).

En el año 2002 el ensayo se llevó a cabo en diferente localización, la germinación se realizó en estufa a 35ºC y en oscuridad. Se midieron el porcentaje de germinación total, D50, D75, R50 y R75.

3.6.5.- Análisis estadístico

Se calcularon para cada año individualmente los estadísticos: media, varianza, covarianza y coeficiente de correlación, entre años y entre caracteres dentro de cada año, empleando el programa estadístico SYSTAT 5.0.

La localización de los QTLs se llevó a cabo utilizando el método de Composite Interval Maping (CIM) (Zeng, 1993, 1994) con el programa Windows QTL Cartographer 2.0 (Basten *et al*., 1994; Basten *et al*., 2002), haciendo el estudio cada 2cM del mapa. Para este análisis se empleó el modelo 6 que emplea, tras un análisis previo, los marcadores más importantes para control del fondo genético y establece una ventana, para realizar el análisis, delimitando una región del genoma a ambos lados de los marcadores flanqueantes de la zona estudiada. Los valores empleados para este modelo fueron de 5 marcadores y un tamaño de ventana de 10cM.

Se calculó el umbral del estadístico LOD para una significación a= 0.1 en cada carácter mediante 300 permutaciones (Churchill y Doerge, 1994). Se estableció un intervalo de confianza de la posición del QTL delimitado por un LOD (Logarithm of Odds)=2. Con este programa se estimó el efecto aditivo y la varianza fenotípica explicada por cada QTL.

Los QTLs identificados se consideraron significativos sí: se detectó uno de los dos años, en que se realizaron los experimentos, con un LOD mayor que el umbral calculado por permutaciones o si se detectó los dos años con un LOD intermedio entre el umbral y LOD=2. Los QTLs que aparecieron los dos años se consideraron el mismo QTL si se solapaban con un intervalo de confianza de 2-LOD y el efecto aditivo era en la misma dirección.

Los QTLs que aparecieron en un solo año con valores entre el umbral y LOD=2 se indicaron como posibles QTLs.

El único efecto que pudo determinarse en la población de líneas dihaploides fue el efecto aditivo, ya que no existe dominancia debido a la homocigosis de las líneas. Un efecto aditivo positivo indicó que PI 161375 aumentaba el carácter y un efecto aditivo negativo que lo disminuía, es decir, que T111 aumentaba el carácter.

4.- RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1.- Generación y evaluación molecular de una población de líneas dihaploides (LDHs) en melón (*Cucumis melo* L.), mediante partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado

En la obtención de plantas haploides, uno de los puntos limitantes es la puesta a punto de un método que sea eficiente, lo que depende en gran medida de la especie objeto de estudio. Además, la eficiencia del método elegido también varía en función del genotipo. Así mismo, es importante poder seleccionar las plantas homocigotas haploides o diploides en una fase temprana de su obtención. La utilización de marcadores moleculares para identificar estas plantas puede acelerar este proceso de selección.

En este capítulo se estudió: (1) la respuesta de diferentes variedades de melón a la partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado; (2) generación de una población de líneas dihaploides (LDHs) a partir del híbrido F_1 (PI 161375 x T111). En este proceso se estudió el nivel de ploidía de las líneas obtenidas por citometría de flujo y la homocigosis utilizando marcadores moleculares de tipo RFLPs y microsatélites.

4.1.1. - Respuesta de diferentes variedades de melón a la partenogénesis

La respuesta de todos los genotipos a la partenogénesis se resume en la **Tabla 4.1**. En las variedades pertenecientes a la *subespecie melo* se obtuvieron embriones probablemente partenogénicos (embriones cultivados *in vitro* o EC) de prácticamente todas las líneas a excepción del híbrido M75CA155, de la var. *inodorus* (de tipo Amarillo). El bajo número ó la ausencia de embriones observado en algunos casos está relacionado con el reducido número de frutos abiertos de estas variedades.

Dentro de esta subespecie se puede dividir los resultados en función del tipo varietal, *inodorus* o *cantalupensis*, en la que se encuadran los genotipos. Entre los genotipos pertenecientes al tipo varietal *inodorus*, tres híbridos de tipo Piel de Sapo (PS) mostraron mejor respuesta a la partenogénesis: 6x T111, RQ200 x T111 y M75C257. Dos de ellos tuvieron como parental masculino la línea T111, línea elegida como parental para generar la población de LDHs de la que se obtuvieron 1.58 embriones por 500 semillas abiertas.

Se observó una mejor respuesta en la obtención de embriones en los híbridos de tipo PS con una media de 1.71 embriones por cada 500 semillas abiertas, frente a los tipo Amarillo, que presentaron una media de 0.32 embriones por cada 500 semillas.

La supervivencia de estos embriones en el proceso de rescate por cultivo *in vitro* (embriones rescatados, ER) presentó variación entre genotipos independientemente del número de embriones obtenido (EC). Por ejemplo, los tres híbridos de los que se habían obtenido más embriones presentaron diferente comportamiento. Así, en el híbrido M75C257 el número de ER se redujo al 38% de los EC (ver ER / EC), mientras que en los híbridos 6x T111 y RQ200 x T111 la supervivencia de embriones fue más alta con un 83 y un 79% respectivamente. La mayor tasa de supervivencia de embriones se obtuvo en el híbrido LxZ, hasta el 90% de los embriones cultivados. Un 64% de los embriones de la línea T111 sobrevivieron a la fase de cultivo *in vitro*. Del resto de híbridos se perdieron más de la mitad de los embriones. Los embriones que sobrevivieron se desarrollaron a planta haploide que fueron diploidizadas y se aclimataron para su autofecundación.

El número de líneas obtenidas con semillas (LDHs) fue variable en función del genotipo. En prácticamente todos los casos el número de LDHs con semilla disminuyó a la mitad de los ER *in vitro* (ver LDHs / ER). La producción de LDHs fue del 100% de los ER para los genotipos en que menos embriones se había obtenido, en los que la supervivencia fue del 100%. Sólo un 33% de los embriones rescatados para el híbrido 6xT111 y un 37% para el híbrido RQ200xT111, se desarrollaron a plantas dihaploides con semilla. En la línea T111, un 43% de los embriones obtenidos se convirtieron en líneas dihaploides el resto se perdieron en el proceso de aclimatación y autofecundación. Considerando el número de semillas abiertas (ver LDHs / 500S), se obtuvieron una proporción de 0.43 LDHs por cada 500 semillas abiertas de la línea T111.

El segundo grupo dentro de la subespecie *melo* comprende los melones pertenecientes a la var. *cantalupensis*, entre los que también se apreciaron diferencias en la respuesta a la partenogénesis. El mayor número de EC / 500S se obtuvo en los híbridos M91 y M92, de tipo cantaloupe, observándose una gran diferencia con el otro híbrido (M93) de tipo galia. El número de embriones que se desarrollaron a planta haploide de los cultivados *in vitro* (ver ER / EC) quedo reducido a menos de la mitad en los híbridos M91 y M92, sin rescatarse ninguno del M93. Prácticamente todos los embriones que sobrevivieron a esta fase de la producción de haploides fueron aclimatados y autofecundados. La proporción de LDHs obtenidas por cada 500 semillas abiertas fue de 0.82 y 0.62 respectivamente.

También se apreciaron diferencias de comportamiento entre las dos variedades *conomon* y *chinensis*, pertenecientes a la subespecie *agrestis*. Para el genotipo *Agrestis* se obtuvieron 2.07 EC / 500S, de los cuales la mitad fueron rescatados *in vitro* (ver ER / EC) y un 33% se perpetuaron como LDH con semilla. En esta variedad se obtuvo un 0.35 LDHs / 500S abiertas. Para el genotipo PI 161375, de la variedad *chinensis*, se obtuvieron 1.99 embriones/500 semillas, de los cuales sobrevivieron *in vitro* un 24% (ver ER / EC), y se desarrollaron a LDHs con semilla un 60% de los ER. En esta variedad se obtuvieron 0.28 LDHs / 500S abiertas

En la **Tabla 4.1** también se muestra la respuesta del híbrido PI 161375 x T111, del que se ha producido la población de LDHs. Con este híbrido se han obtenido 1.31 EC/500S, un valor inferior al obtenido con cualquiera de los dos parentales. El 60% de los embriones del híbrido fueron rescatados *in vitro* (ver ER/EC), valor similar al obtenido con el parental T111. El 30% de los embriones rescatados *in vitro* consiguieron desarrollarse a planta haploide diploidizada y perpetuada por autofecundación (ver LDHs/ER). Este parámetro, al igual que el de 0.24 LDHs/500S, es inferior al obtenido para cualquiera de los dos parentales del híbrido.

Tabla 4.1: Respuesta de diferentes variedades de melón (*Cucumis melo L.*) a la partenogénesis inducida in situ con polen irradiado. Los datos se muestran separados por subespecies, sub *melo* y sub *agrestis*, y dentro de cada una de ellas por variedades. (EC = embriones cultivados; ER = embriones rescatados)

					Embriones partenogénicos						
				Semilllas	EC		ER		Líneas Dihaploides (LDHs)		
Tipo de melón[x]	Híbridos	Líneas	Frutos	abiertas	Total	EC/500S	Total	ER/EC	Total	LDHs/ER	LDHs/500S
subspecies *melo* var. *inodorus*											
Piel de sapo	-	T111	6	3480	11	1.58	7	0.64	3	0.43	0.43
Piel de sapo	T x L	-	48	10999	12	0.55	5	0.42	2	0.40	0.09
Piel de sapo	L x Z	-	33	18049	49	1.36	44	0.90	23	0.52	0.64
Piel de sapo	6 x T111	-	66	30756	167	2.71	138	0.83	45	0.33	0.73
Piel de sapo	RQ200 x T111	-	99	47136	219	2.32	172	0.79	64	0.37	0.68
Piel de sapo	M75C164	-	3	1365	1	0.37	0	-	-	-	0
Piel de sapo	M75C167	-	3	2256	9	1.99	2	0.22	2	1.00	0.44
Piel de sapo	M75C257	-	3	1354	8	2.95	3	0.38	3	1.00	1.11
Piel de sapo	M81B520	-	5	4125	13	1.58	5	0.38	5	1.00	0.61
Amarillo	-	8	3	1551	2	0.64	2	1.00	0	-	0
Amarillo	M75CA155	-	2	1057	0	-	-	-	-	-	0
subspecies *melo* var. *cantalupensis*											
Cantalupe liso	M91	-	8	6133	26	2.12	11	0.42	10	0.91	0.82
Cantalupe reticulado	M92	-	6	3242	18	2.78	4	0.22	4	1.00	0.62
Galia	M93	-	6	3345	1	0.15	0	-	-	-	0
subspecies *agrestis* var. *conomon*[y]											
Agrestis	-	-	3	1446	6	2.07	3	0.50	1	0.33	0.35
subspecies *agrestis* var. *chinensis*											
Songwham Charmi	-	PI161375	8	5279	21	1.99	5	0.24	3	0.60	0.28
subspecies agrestis var. *chinensis* x subspecies *melo* var. *inodorus*											
-	PI161375 x T111	-	250	201450	527	1.31	316	0.60	96	0.30	0.24

[x]Basado en la clasificación de Pitrat et al. (2000)

[y]Origen en el este asiático, propuesto como var.*conomon*.

A continuación aparecen representados gráficamente (**Figura 4.1**) los resultados obtenidos con los diferentes híbridos y líneas del género *Cucumis melo*, en las diferentes fases del proceso de obtención de plantas haploides y su comportamiento en cada una de ellas.

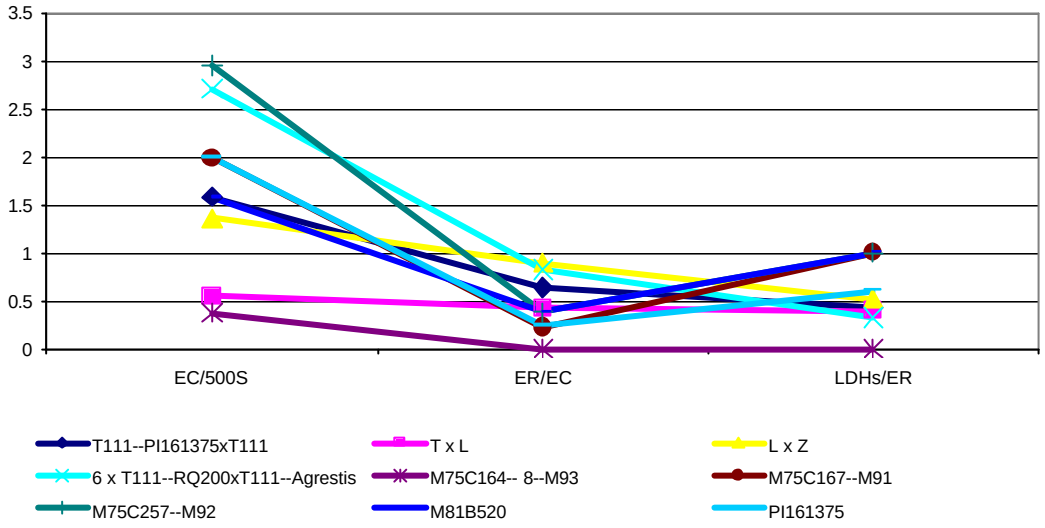


Figura 4.1: Respuesta a la partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado de los diferentes híbridos y líneas del género *Cucumis melo* L., en los diferentes pasos del proceso de obtención de plantas haploides.

En esta gráfica se puede apreciar que a pesar de que existe una tendencia general, el paso limitante en la producción de haploides varía con el genotipo. Así, para algunos genotipos se partía de un bajo número de embriones (EC/500S) por lo que el paso limitante fue la obtención de embriones, pero luego la supervivencia en el proceso de cultivo *in vitro* y la obtención de LDHs era bueno (ej:T x L). Otros genotipos presentaron como paso limitante la supervivencia de embriones en cultivo in vitro (ER/EC), como por ejemplo los híbridos M81B520, M75C167 y M91, y en otros el paso limitante fue la obtención de LDHs con semilla viable (PI161375). Algunos genotipos presentaron una baja respuesta para todos los pasos del proceso (MC75C167, 8 y M93).

4.1.2. - Generación de una población de LDHs

Se generó una población de LDHs a partir del híbrido PI 161375 x T111, siguiendo el método descrito por Sauton y Dumas de Vaulx (1987), tal como se describe en los apartados siguientes. Los resultados aparecen representados en la **Tabla 4.2**.

4.1.2.1. - Rescate *in vitro* de embriones partenogénicos

Para la generación de las líneas dihaploides, en una primera etapa se seleccionaron los embriones según su morfología. Algunos embriones que presentaron morfología dudosa se mantuvieron hasta determinar su origen tras los estudios de la ploidía y homocigosis. En el año 1997-98 se seleccionaron 60 embriones, de los cuales 58 fueron clasificados como partenogénicos basándose en sus características morfológicas. Dos de los embriones rescatados, que posteriormente dieron lugar a las líneas 31 y 37, se etiquetaron como de posible origen zigótico.

En el siguiente año, 1998-99, se rescataron 52 embriones, 9 de los cuales fueron sospechosos de tener origen zigótico proviniendo además del mismo fruto. Los 43 restantes fueron clasificados como embriones partenogénicos.

En el año 2001-02 se rescataron 11 embriones, todos ellos fueron identificados morfológicamente como partenogénicos. En el último año, 2002-03, se seleccionaron 19 embriones, que fueron clasificados como de origen partenogénico.

En total, se rescataron 142 embriones, de los cuales 11 se identificaron morfológicamente como de origen zigótico. Para determinar el origen partenogénico o zigótico de las líneas, se analizó su ploidía y homocigosis.

Tabla 4.2: Identificación y origen de las LDHs generadas a partir del híbrido "PI161375 x T111" por partenogénesis inducida *in situ*.

	Ploidía por citometría de flujo										
	Líneas haploides		Líneas diploides (sin fase n)							LDHs perpetuadas por semilla	
				Morfología zigótica		Homocigotos tras analisis con marcadores moleculares		Heterocigotos tras análisis con marcadores moleculares			
Año	Total	Código	Total	Número	Código	Número	Código	Número	Código	Total	Código
97-98	37	3,11,14,17,19,23, 24,26,29,39,44,45, 46,52,63,72,74,75 83,84,85,92,93,98, 101,104,107,108, 109,114,117,128, 135,139,140,142, 143,	23	2	31,37	21	6,7,10,15,22, 40,41,62,69, 76,78,82,89, 90,106,112, 125,127,129, 136,138,	2	31,37	51	3,6,7,10,11,14, 15,17,19, 22, 23, 24, 26, 29, 40, 41, 44, 45, 46, 52, 62, 63, 69, 72, 75, 76, 78, 82, 84, 85, 89, 90, 92, 93, 98, 101, 104, 106, 108, 109, 114, 117, 125, 127, 128, 135, 136, 138, 139, 140, 142,
98-99	41	1004, 1007, 1009, 1010, 1014, 1017, 1019, 1020, 1024, 1027, 1029, 1030, 1031, 1037, 1040, 1044, 1046, 1051, 1055, 1080, 1081, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1100, 1101, 1107, 1116, 1117, 1118, 1122, 1123, 1127, 1128, 1129, 1144, 1152, 1154, 1156	11	9	1061,1062, 1064, 1066 1067, 1068 1069, 1070, 1077,	1	1131,	10	1061,1062, 1064, 1066 1067, 1068 1069, 1070, 1077, 1022	38	1004, 1007, 1009, 1010, 1014, 1017, 1019, 1020, 1024, 1027, 1029, 1030, 1031, 1040, 1044, 1046, 1051, 1080, 1081, 1083, 1084, 1086, 1087, 1100, 1101, 1107, 1116, 1117, 1122, 1123, 1127, 1128, 1129, 1131, 1144, 1152, 1154, 1156
2001-02	10	2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2009, 2011, 2012 2013	1	0		1	2007	0		6	2001, 2002, 2005, 2006, 2007,2012
2002-03	19	3001, 3002, 3003, 3004, 3005, 3006, 3009, 3010, 3011, 3012, 3013, 3014, 3015, 3016, 3022, 3023, 3024, 3025, 3040	0	0		0		0			
Total	**107**		**35**	**11**		**23**		**12**		**95**	

4.1.2.2. - Estudio del nivel de ploidía por citometría de flujo

La ploidía de las líneas se estudió por el método de citometría de flujo. Los resultados aparecen representados en la **Tabla 4.2**.

En el año 1997-98 se realizó el análisis de ploidía después del proceso de duplicación cromosómica. De las 60 líneas obtenidas, se observaron 23 con solo fase diploide (2n), entre las que se encontraban las líneas 31 y 37 etiquetadas morfológicamente como zigóticas. Las 37 restantes presentaron fase haploide (n) además de la diploide.

El año 1998-99 la citometría de flujo se realizó antes del tratamiento con colchicina y únicamente 11 líneas dieron fase diploide sin fase haploide, entre ellas se encontraban las 9 que provenían de embriones identificados morfológicamente como zigóticos (1061, 1062, 1064, 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1077). Se rescataron 41 líneas con fase haploide.

En el año 2001-02 se realizó el análisis de ploidía de las líneas antes y después del tratamiento de duplicación cromosómica. Del total de 11 líneas, 10 presentaron fase n, excepto la línea 2007 que presentaba únicamente fase 2n. Esta línea no había sido identificada morfológicamente como zigótica. El análisis de su homocigosis con marcadores moleculares confirmó su origen partenogénico. Los resultados de los análisis antes y después del tratamiento con colchicina coincidieron.

Todas las líneas del último año, 2002-03, analizadas presentaron fase haploide en el análisis de citometría de flujo realizado antes del tratamiento con colchicina. Estas líneas están en fase de autofecundación.

Las plantas que presentaron un nivel de ploidía 2n, sin fase n visible, no fueron eliminadas. Aunque eran sospechosas de tener origen zigótico, se mantuvieron hasta verificar su origen con marcadores moleculares ya que podrían derivar de la duplicación espontánea de un embrión haploide partenogénico.

4.1.2.3.- Determinación de las homocigosis de las LDHs por marcadores moleculares

Para verificar la homocigosis de las LDHs se utilizaron marcadores moleculares de tipo RFLP y SSR. La mayoría de las LDHs analizadas con marcadores moleculares presentaron una única banda perteneciente a uno de los alelos parentales. Las líneas que presentaron las dos bandas de los alelos parentales se clasificaron como heterocigóticas (**Figura 4.2**). Se consideró que una línea era heterocigota cuando lo era para un gran número de marcadores y la intensidad de las bandas era igual para los dos alelos. Otra situación, como la aparición de líneas que presentaron

las dos bandas de los alelos parentales al utilizar para la extracción de ADN material que provenía de semilla podría indicar contaminación de tejido o de ADN. Se comprobó si era una contaminación de ADN, debido a un error en la recogida de material para la extracción, o de mezcla de semillas, en este último caso las líneas se eliminaron, ya que resulta imposible diferenciar las semillas de cada línea. Las líneas obtenidas en el último año (2002-03) no fueron analizadas por este método, ya que todavía no se había finalizado el proceso de diploidización y autofecundación. En los otros tres años, todas las líneas que habían sido clasificadas como haploides por la técnica de citometría de flujo resultaron homocigotas tras el análisis con los dos tipos de marcadores moleculares, confirmándose su origen partenogénico. Estas líneas fueron autofecundadas para la obtención de semillas de forma que quedaran perpetuadas.

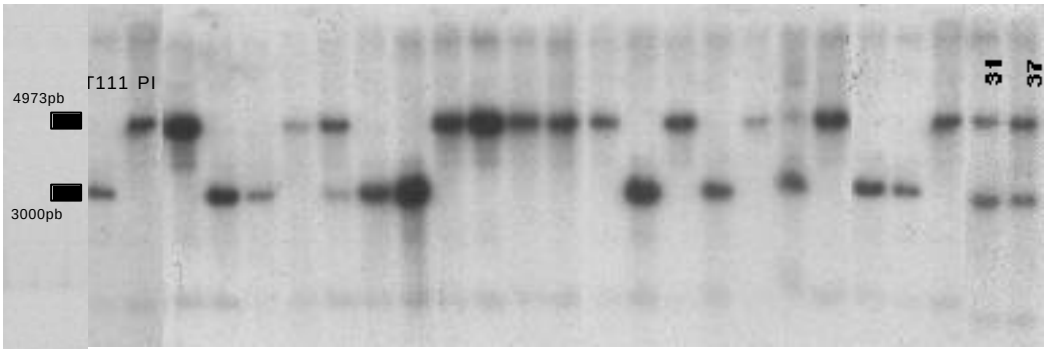


Figura 4.2: Patrón de bandas presentado por una serie de LDHs tras el análisis con el marcador de tipo RFLP(MC127). En primer lugar se cargaron los dos parentales (T111 y PI 161375 (PI)) y en los dos últimos carriles se muestra el patrón de dos de los individuos heterocigotos.

En el año 1997-98, 23 líneas fueron clasificadas por citometría como diploides, sin fase haploide (**Tabla 4.2**). Tras el análisis con marcadores moleculares únicamente 2 de ellas (31 y 37) fueron identificadas como heterocigotas. Estas 2 líneas eran sospechosas de tener un origen zigótico por la morfología del embrión. Las 21 líneas restantes demostraron ser homocigotas a pesar de haber sido identificadas como diploides por citometría. Esto se explica por que el análisis de ploidía se realizó después del tratamiento de duplicación cromosómica, y como consecuencia las 21 plantas diploides procedían de líneas haploides diploidizadas.

Únicamente 11 líneas de las obtenidas el siguiente año, 1998-99, fueron diploides sin fase haploide (**Tabla 4.2**). En este grupo se tenía sospechas del origen zigótico de 9 de ellas, lo que fue confirmado tras el análisis con marcadores moleculares. Estas 9 líneas (1061, 1062, 1064, 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1077) fueron eliminadas. La otra línea que había dado un nivel de

ploidía 2n (1022) también resultó ser heterocigota, aunque inicialmente esta línea no había sido clasificada por morfología como zigótica y podría derivar de una contaminación en los procesos posteriores a la haploidización, como consecuencia de errores durante el proceso de cultivo *in vitro* o a cruzamientos en el proceso de autofecundación. La línea 1131, que había dado un nivel de ploidía 2n sin fase n en el análisis de citometría de flujo, fue homocigota para todos los marcadores, pudiendo tratarse de un caso de duplicación espontánea del número cromosómico. Esto podría explicar así mismo el resultado obtenido en el año 2001-02, con la línea 2007, cuya morfología era partenogénica, que había presentado un nivel de ploidía 2n en los análisis realizados antes y después del tratamiento con colchicina y que tras ser analizada por marcadores moleculares resultó homocigota.

Las 12 líneas heterocigotas, tras el análisis con marcadores moleculares, fueron eliminadas. Estas líneas no mostraron ninguna banda diferente de la de los alelos parentales, descartando la contaminación con polen de otro origen. Tampoco los alelos del donante de polen, M40, fueron detectados (**Figura 4.3**). Estos resultados se ratifican por el hecho de que ninguna de la LDHs fue monoica, carácter dominante presente en la línea pura M40 donante del polen irradiado.

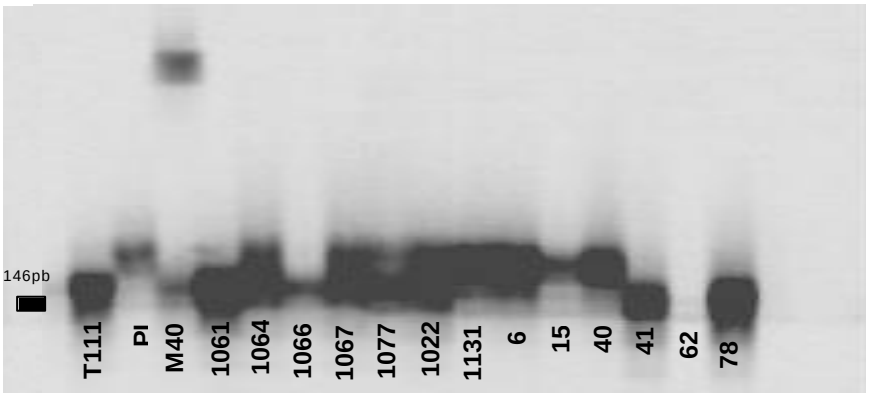


Figura 4.3: Patrón presentado por diferentes LDHs analizadas con un marcador de tipo microsatélite (NR5b) que presentaba un alelo diferente para el donante de polen (M40). No se apreció este alelo en ninguna de las líneas heterocigotas.

4.1.2.4.- Fertilidad de las líneas haploides diploidizadas

La fertilidad de las líneas haploides diploidizadas seleccionadas y transferidas a invernadero se resume en la **Tabla 4.2**. Estos datos se refieren a las plantas que después de todos los análisis habían sido confirmadas como dihaploides, descartando las heterocigotas.

En el año 1997-98 se transplantaron 58 LDHs de las cuales 51 produjeron semilla viable tras dos años consecutivos de autofecundación, obteniéndose un porcentaje de fertilidad del 87.9%. En el siguiente año, 1998-99, se transfirieron a invernadero 42 líneas, 38 de ellas produjeron semilla tras dos años consecutivos de autofecundación (90,5% del total). En el 2001-02, se consiguió semilla tras una primera autofecundación en 6 de las 11 líneas, dando una fertilidad del 54.5%. En estas líneas se hará una segunda autofecundación, por lo que este porcentaje puede aumentar. Del año 2002-03 no se tienen datos de la fertilidad porque el proceso se encuentra todavía en los pasos previos a la autofecundación. Estas líneas serán aclimatadas esta primavera y se analizaran con marcadores y las homocigotas serán autofecundadas.

Algunas de estas líneas (44, 75, 93, 108, 1014, 1020, 1027, 1029, 1080, 1081) se eliminaron después de los procesos de autofecundación por ser heterocigotas, a pesar de que no lo habían sido en los primeros análisis con marcadores moleculares, posiblemente debido a errores en el proceso de autofecundación.

Tras la selección por citometría de flujo y marcadores moleculares, el número final de LDHs obtenidas entre todos los experimentos es de 110 (sin tener en cuenta las del último año por no haber concluido los ensayos) de las cuales 95 fueron perpetuadas por autofecundación y obtención de suficiente semilla. El porcentaje de fertilidad total de las líneas dihaploides producidas fue del 86.3%. Con las líneas obtenidas en el año 2002-2003 se espera llegar a obtener una población de LDHs con al menos 100 líneas

4.2.- Construcción de un mapa genético de melón en base a la población de líneas dihaploides, empleando marcadores moleculares RFLPs y SSRs

En esta parte del trabajo se construyó un mapa genético a partir de la población de líneas dihaploides generada anteriormente, se estudió la segregación alélica de los marcadores en la población y se integraron el mapa obtenido con las LDHs y un mapa a partir de la F_2 de los mismos parentales.

4.2.1.- Polimorfismo entre parentales con marcadores de tipo SSR

De los 121 nuevos microsatélites analizados, 54 presentaron polimorfismo para las dos líneas de melón estudiadas (44.63%), lo que permitió detectar 56 loci, ya que dos de ellos presentaron 2 alelos (NR66 y TJ12) (**Anexo 1**). De los 32 microsatélites obtenidos a partir de EST, 15 fueron polimórficos, siendo el grado de polimorfismo observado del 46.9%. En los microsatélites NR, 39 de los 89 presentaron polimorfismo (43.8%).

4.2.2.- Análisis de ligamiento

Se posicionaron en el mapa 169 marcadores entre los que se incluyen 113 marcadores de los que ya se conocía su posición (Oliver *et al*., 2001; Morales M, datos no publicados) y 56 nuevos SSR que presentaron polimorfismo, descritos en el apartado anterior. Los 169 marcadores (2 marcadores morfológicos, 78 marcadores de tipo RFLP, 86 marcadores SSR, 1 marcador SCAR y 2 marcadores CAPS) se distribuyeron en 12 grandes grupos de ligamiento (G1-G12) y dos pequeños grupos constituidos por dos y tres marcadores respectivamente con un LOD $\geq$3. Al disminuir el LOD se consiguió que estos dos pequeños grupos se unieran, quedando los marcadores distribuidos en los 12 grupos de ligamiento. El número medio de marcadores por grupo de ligamiento fue de 14, siendo el G6, con 18 marcadores, en el que mayor número de marcadores se localizaron y el G7 con 9 marcadores en el que menos. El orden de los marcadores fue similar al descrito en la población F_2 originada a partir de los mismos parentales (Oliver *et al*., 2001).

El mapa elaborado (**Figura 4.4**) cubrió una distancia genética de 1289.6cM. Los marcadores se distribuyeron de forma aleatoria a intervalos que variaron dependiendo del grupo de ligamiento

entre 45.5 y 1.4cM, algunos de los marcadores cosegregaron. La densidad media del mapa fue de 7.6cM por marcador.

En el G1, se localizaron 14 marcadores, de dos de los cuales no se pudo determinar exactamente su posición. La distancia de genoma que cubre es de 104.5cM, con 7.46cM/marcador. Los intervalos entre marcadores oscilan entre 17.6 cM y 1.9cM. Entre los diferentes tipos de marcadores presentes en este grupo de ligamiento se encontraron 7 de tipo RFLP, de uno de ellos (MC 301) no se pudo determinar su posición exacta y 7 marcadores de tipo SSR. Entre los microsatélites que se posicionaron en este grupo de ligamiento, 3 de ellos pertenecían a los nuevos SSRs estudiados (NR56, TJ2 y TJ3).

En el G2, se localizaron 15 marcadores, pudiéndose determinar la posición exacta de 13 de ellos. La distancia cubierta por este grupo de ligamiento fue de 86.3 cM, con una densidad de 5.75 cM/ marcador oscilando los intervalos entre marcadores entre 24.8 y 4.6cM. A este cromosoma se ligaron 6 RFLPs y 9 marcadores de tipo microsatélite. Los nuevos microsatélites que se ligaron a este grupo fueron 6 (NR5, NR66a, TJ10,TJ12b, TJ30 y TJ31) de 1 de ellos, no se pudo determinar su posición exacta.

El G3 cubrió una distancia de 101.6cM, localizándose 12 marcadores de los cuales todos excepto el MC44 se posicionaron en el mapa de ligamiento. Los marcadores se distribuyeron de forma aleatoria con una media de 8.46cM/marcador y con unos intervalos que oscilaron entre 31.7 y 1.4 cM. Los tipos de marcadores ligados en este grupo fueron 6 de tipo RFLP y 6 marcadores de tipo microsatélite, de los cuales 4 fueron de los nuevos SSR estudiados (NR21, NR30, NR75 y TJ38).

En el G4, se localizaron 15 marcadores ligados, de ellos se consiguió posicionar 14. Estos marcadores se distribuyeron cubriendo una distancia de 106.4cM, la densidad fue de 7.09cM/marcador siendo la distancia máxima entre dos marcadores de 13.6cM y la mínima de 1.6. En este grupo se localizaron 4 RFLPs y 11 SSRs. De estos últimos, 8 corresponden a los nuevos microsatélites estudiados (NR2, NR3, NR9, NR35, NR52, NR61, NR100, TJ37).

En el G5, se posicionaron 15 marcadores, de ellos, 4 quedaron ligados al grupo sin poder determinarse su posición exacta. Los marcadores cubrieron 79.2cM del genoma, con 5.13cM/marcador, situándose a intervalos de entre 25.1 cM y 1.6 cM. De los diferentes tipos de marcadores analizados en este trabajo, en este cromosoma se localizaron 7 de tipo RFLP y 8 de tipo SSR. A este último tipo de marcadores pertenecen 7 de los nuevos microsatélites localizados en el mapa (NR12, NR62, NR45, TJ23 y TJ33).

En el G6, se localizaron 18 marcadores que se distribuyeron a lo largo del grupo de ligamiento ocupando una distancia de 165.5 cM. La densidad de marcadores es de 9,73cM/marcador siendo la máxima distancia observada entre marcadores fue de 45.5 y la menor de 1.4cM. Los

marcadores fueron 8 RFLPs y 10 microsatélites, de los cuales 7 pertenecían a los nuevos marcadores estudiados (NR4, NR53, NR92, TJ21, TJ26 y TJ27).

El G7 fue en el que menor número de marcadores aparecieron ligados, únicamente 9, extendiéndose hasta 121.9cM, las distancia entre marcadores oscilaron entre los 36.2cM y 5.2cM y la densidad fue de 13.5cM/marcador. Los 9 marcadores pertenecientes a este grupo (5 RFLPs y 4 SSRs) se localizaron en su posición exacta. En este grupo se posicionaron 3 nuevos marcadores (NR1, NR7 y NR22).

En el G8 aparecieron ligados 13 marcadores cubriendo una distancia de 86.2 cM, con una media de 6.6cM /marcador en intervalos que van desde 22.2 cM y 1.4cM. Los marcadores mapados fueron: 9 de tipo RFLPs y 4 de tipo microsatélite, 3 de ellos (NR39, NR68 y TJ24) pertenecientes a los nuevos microsatélites estudiados en este trabajo. Los RFLPs, MC332, MC376 y MC252, aparecieron ligados en este grupo pero sólo se conoce su localización aproximada.

En el G9 se incluyeron 15 marcadores que ocuparon una distancia de 88.3cM, con una media de 5.8cM /marcador. Los intervalos en los que se situaron los marcadores oscilaron entre los 24.3cM y los 3.4cM en el caso del menor intervalo entre marcadores. No se pudo determinar la posición exacta de 5 marcadores. Se localizaron 6 marcadores de tipo RFLPs y 9 marcadores de tipo microsatélite, 6 de estos, pertenecientes al grupo de nuevos microsatélites localizados en el mapa (NR8, NR19, NR67 y NR71).

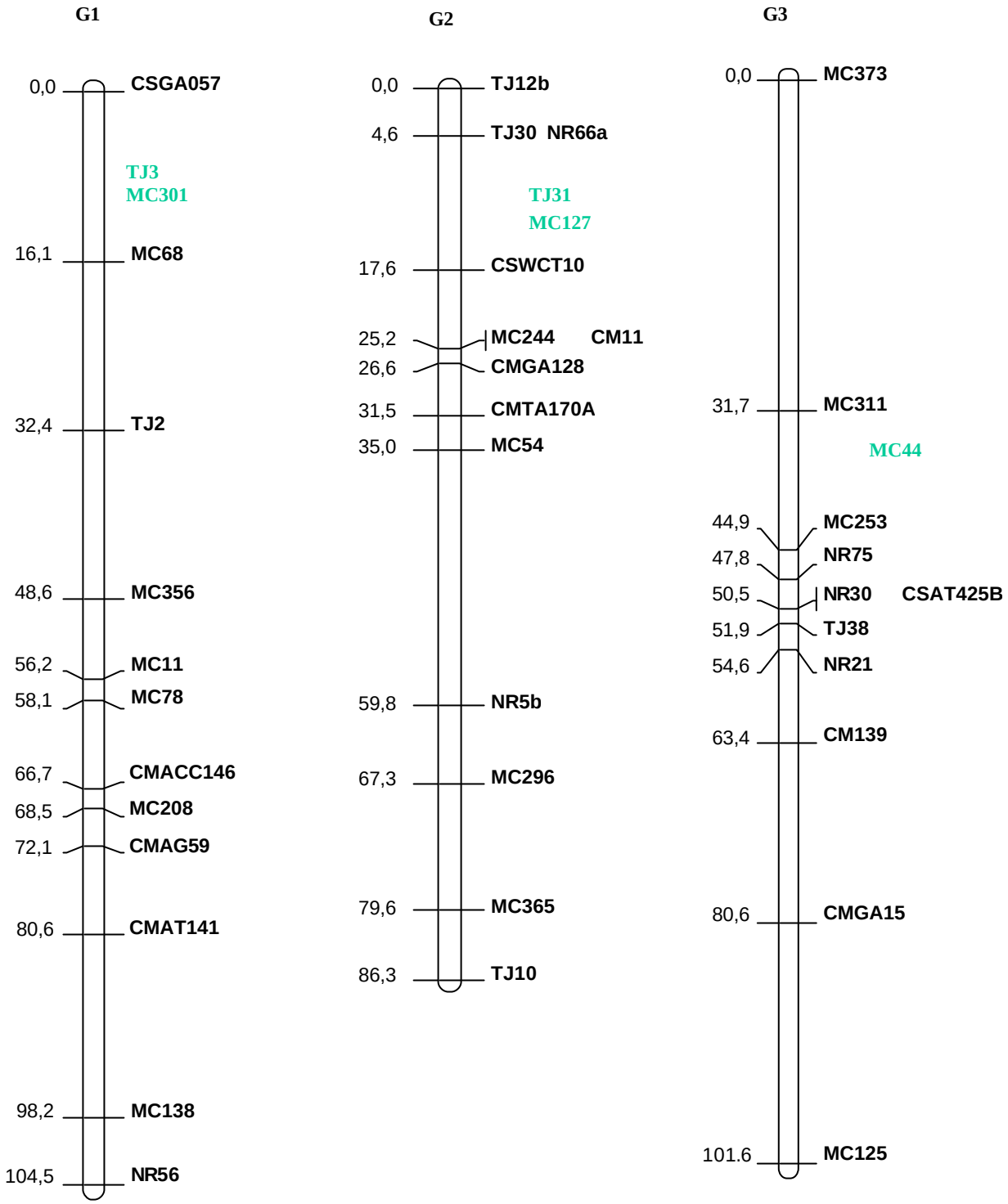
En el G10 aparecieron ligados 16 marcadores, ocupando una distancia de 140.8 cM. Los 16 marcadores estaban localizados con una media de 8.8cM /marcador siendo la mayor distancia entre ellos de 25.8 cM y 2.0cM la menor. Los marcadores que se localizaron en este grupo de ligamiento fueron 10 de tipo RFLP y 6 de tipo SSR, en este ultimo grupo aparecen 4 de los nuevos microsatélites (NR6, NR73, NR79 y TJ12a).

En el G11 se localizaron 14 marcadores, sumando una distancia de 99.2cM con una media de 6.61cM/marcador, el intervalo mayor fue de 26.4cM y el menor de 5.0cM. Se localizaron en este cromosoma 2 marcadores morfológicos (Carp y NSV), 4 marcadores de tipo RFLPs, 5 marcadores de tipo microsatélite, 1 marcador SCAR y 2 marcadores de tipo CAPS. Los nuevos microsatélites localizados en este grupo fueron: NR14, NR33, NR80 y TJ29.

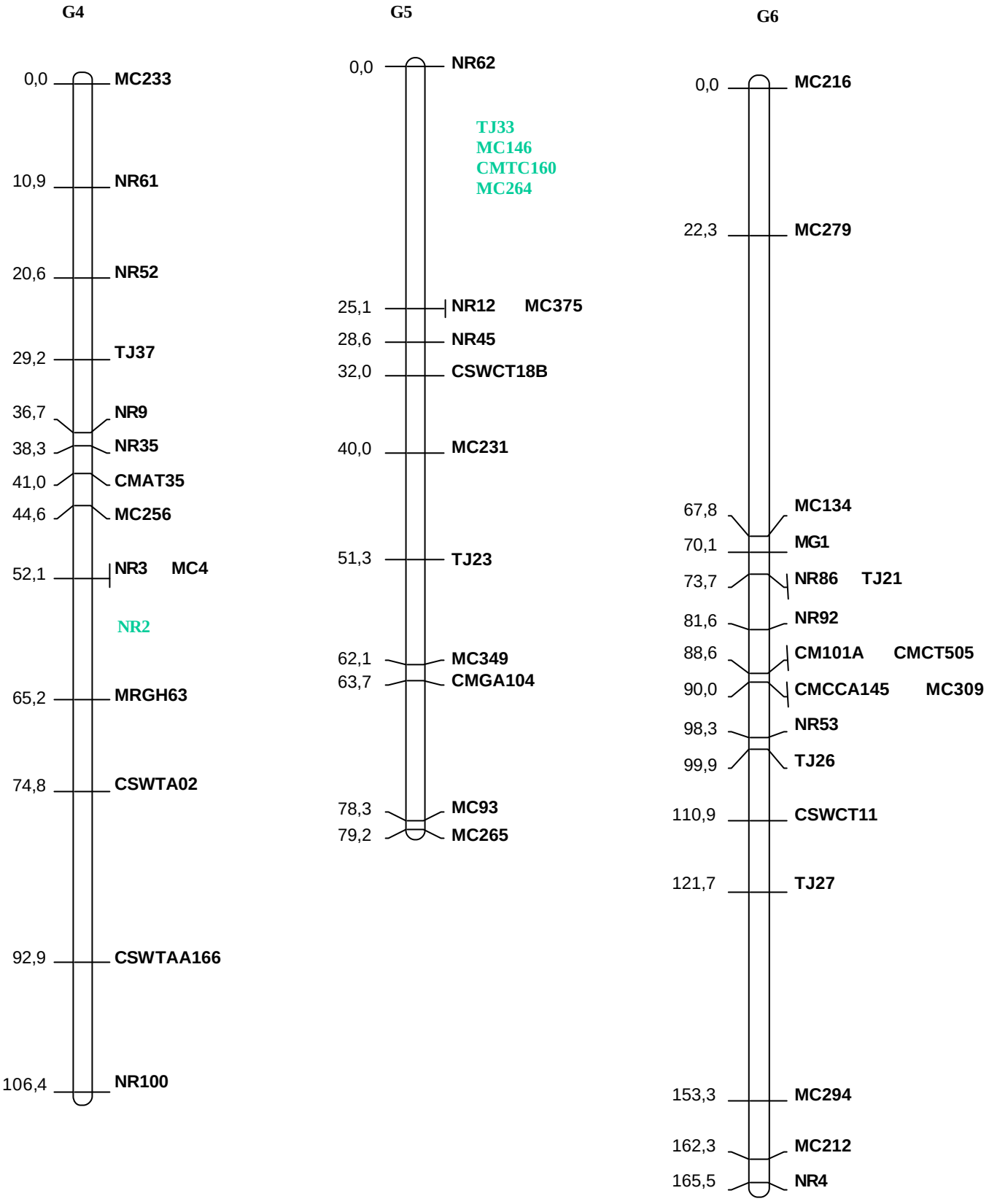
Por último, en el G12 se localizaron 13 marcadores moleculares que cubrieron una distancia de 109.7cM, con una media de 8.44cM por marcador, oscilando entre la distancia mayor de 38.9cM y la menor de 4.7cM. De los trece marcadores ligados en este grupo 6 fueron de tipo RFLPs y 7 de tipo microsatélite, todos ellos de los nuevos SSRs estudiados para la generación de este mapa (NR18, NR38, NR41, NR50, NR66b y NR94).

Los nuevos marcadores posicionados en el mapa se distribuyeron de forma aleatoria por el genoma repartiéndose entre los doce grupos de ligamiento. El grupo en el que mayor número de nuevos microsatélites se localizaron fue el G4 con 8, mientras que en los grupos de ligamiento G1, G7 y G8 únicamente se posicionaron tres de estos microsatélites.

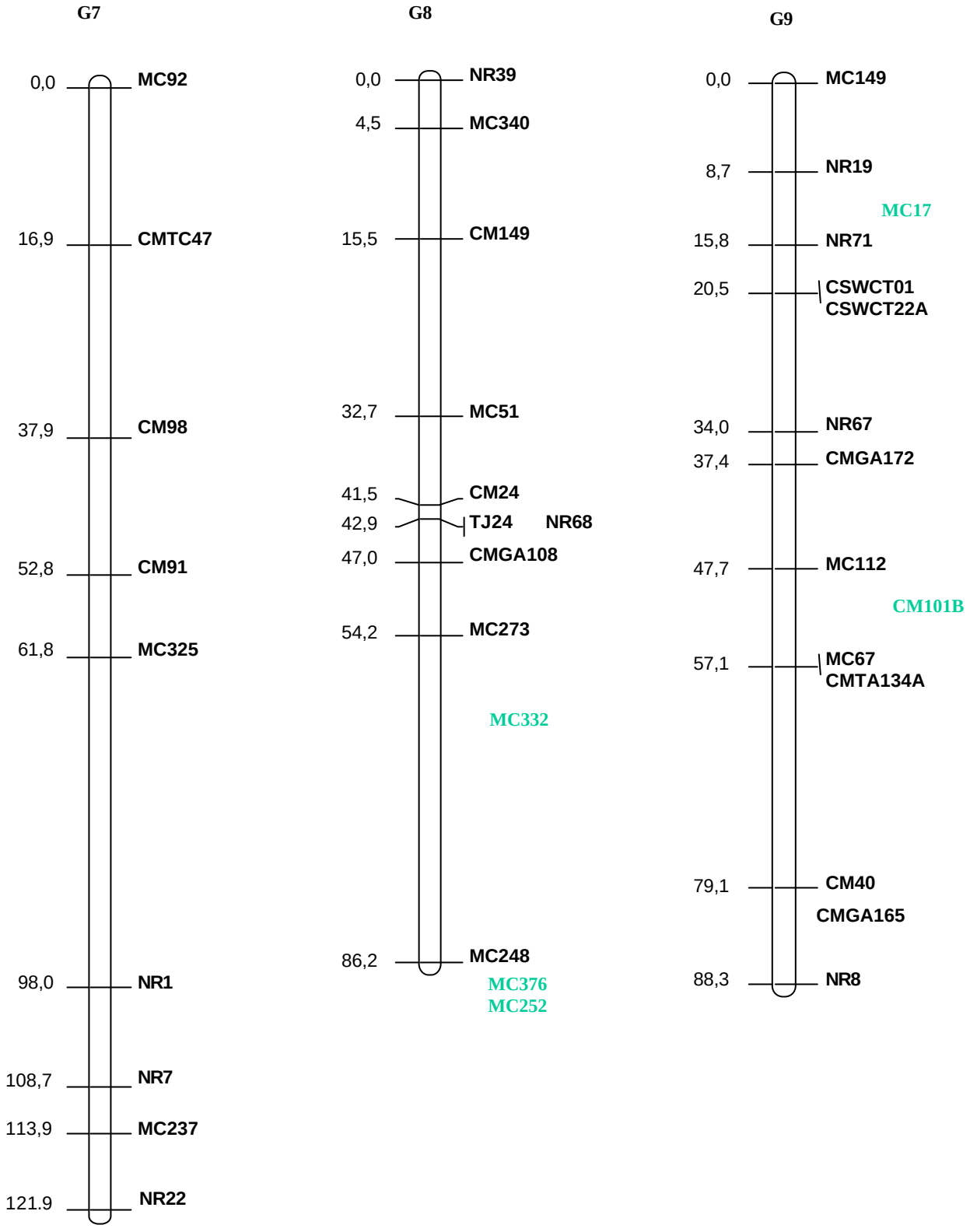
Figura 4.4: Mapa genético generado a partir de la población de líneas dihaploides de melón. Los grupos de ligamiento están representados por líneas verticales y designados como G1-G12. A la izquierda aparecen las distancias de recombinación en cM y a la derechas los marcadores moleculares localizados en el mapa. Los marcadores de los que no se conoce su posición exacta aparecen en otro color.



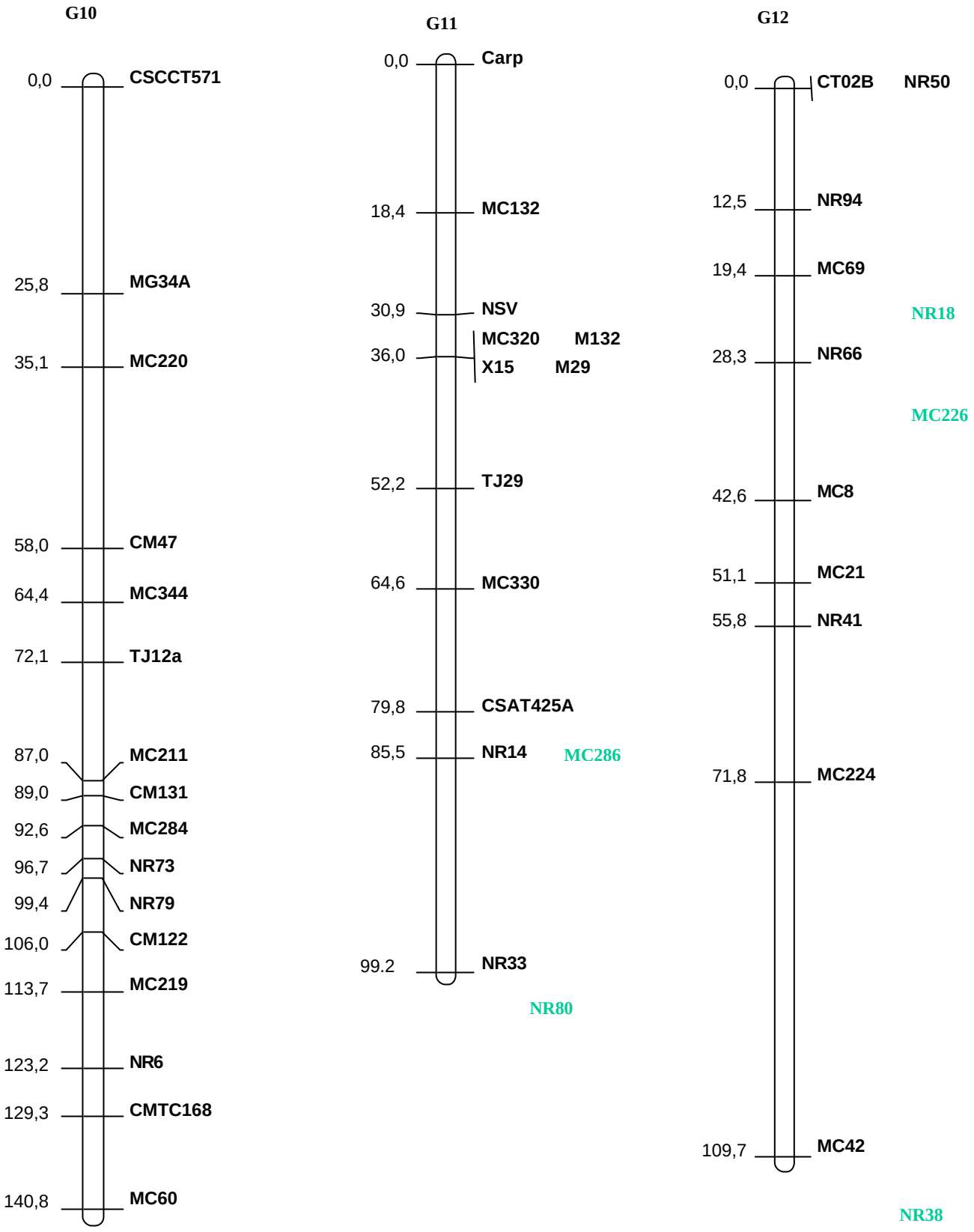
(Fig.:4.4)


G4
0,0 MC233
10,9 NR61
20,6 NR52
29,2 TJ37
36,7 NR9
38,3 NR35
41,0 CMAT35
44,6 MC256
52,1 NR3 MC4
NR2
65,2 MRGH63
74,8 CSWTA02
92,9 CSWTAA166
106,4 NR100
G5
0,0 NR62
TJ33
MC146
CMTC160
MC264
25,1 NR12 MC375
28,6 NR45
32,0 CSWCT18B
40,0 MC231
51,3 TJ23
62,1 MC349
63,7 CMGA104
78,3 MC93
79,2 MC265
G6
0,0 MC216
22,3 MC279
67,8 MC134
70,1 MG1
73,7 NR86 TJ21
81,6 NR92
88,6 CM101A CMCT505
90,0 CMCCA145 MC309
98,3 NR53
99,9 TJ26
110,9 CSWCT11
121,7 TJ27
153,3 MC294
162,3 MC212
165,5 NR4

(Fig.:4.4)


G7
0,0 MC92
16,9 CMTC47
37,9 CM98
52,8 CM91
61,8 MC325
98,0 NR1
108,7 NR7
113,9 MC237
121.9 NR22
G8
0,0 NR39
4,5 MC340
15,5 CM149
32,7 MC51
41,5 CM24
42,9 TJ24 NR68
47,0 CMGA108
54,2 MC273
MC332
86,2 MC248
MC376
MC252
G9
0,0 MC149
8,7 NR19
MC17
15,8 NR71
20,5 CSWCT01
CSWCT22A
34,0 NR67
37,4 CMGA172
47,7 MC112
CM101B
57,1 MC67
CMTA134A
79,1 CM40
CMGA165
88,3 NR8

(Fig.:4.4)


G10
0,0 CSCCT571
25,8 MG34A
35,1 MC220
58,0 CM47
64,4 MC344
72,1 TJ12a
87,0 MC211
89,0 CM131
92,6 MC284
96,7 NR73
99,4 NR79
106,0 CM122
113,7 MC219
123,2 NR6
129,3 CMTC168
140,8 MC60
G11
0,0 Carp
18,4 MC132
30,9 NSV
36,0 MC320 M132
X15 M29
52,2 TJ29
64,6 MC330
79,8 CSAT425A
85,5 NR14 MC286
99.2 NR33
NR80
G12
0,0 CT02B NR50
12,5 NR94
19,4 MC69
NR18
28,3 NR66
MC226
42,6 MC8
51,1 MC21
55,8 NR41
71,8 MC224
109,7 MC42
NR38

4.2.3.- Integración de mapas

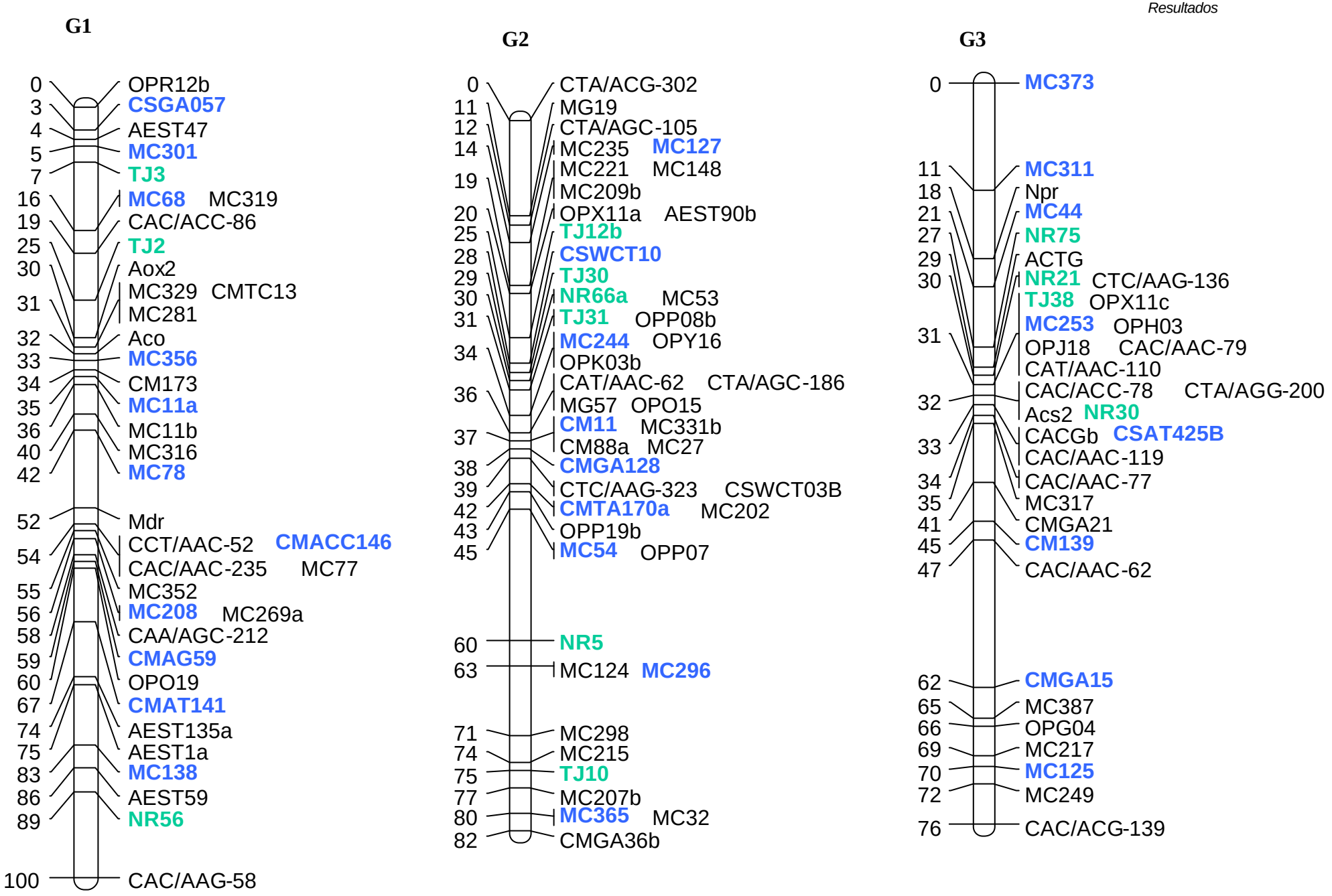
El orden de los marcadores empleados en la generación del mapa genético de la población de LDHs se mantuvo en relación con el mapa ya existente de una población F_2 generada a partir del cruce PI 161375 X T111 (Oliver *et al*., 2001). Esta colinearidad de los marcadores permitió la integración de los dos mapas.

4.2.3.1.- Mapa con marcadores dominantes y codominantes

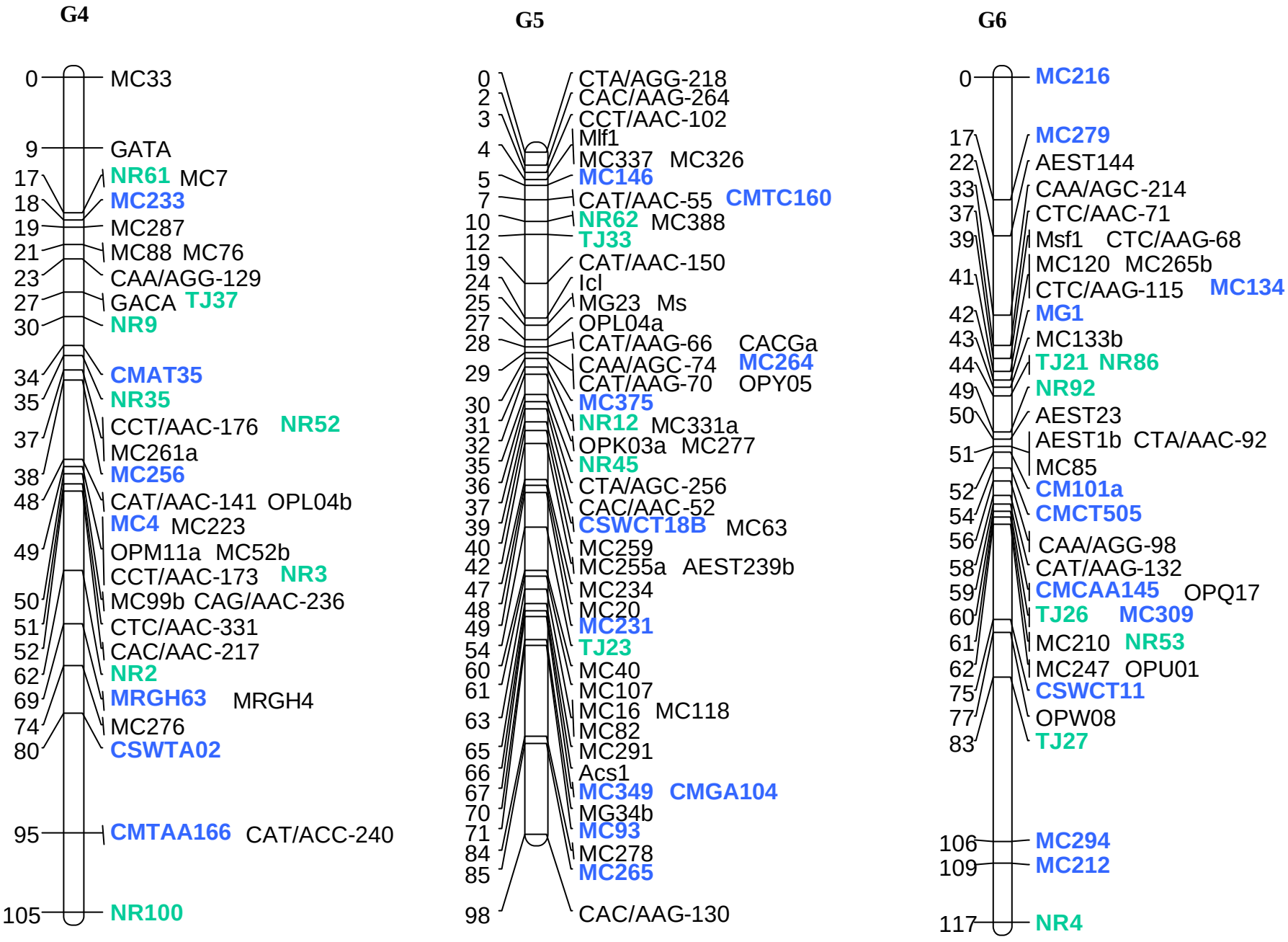
En primer lugar se realizó la integración del mapa obtenido en la F_2 del cruce PI 161375 x T111 con el mapa obtenido con la población de LDHs (obtenida a partir del mismo cruzamiento), empleando todos los marcadores, tanto dominantes como codominantes. La integración de los dos mapas dio lugar a la localización en el mapa de 463 marcadores (2 caracteres morfológicos, 2 isoenzimas, 42 RAPDs, 236 RFLPs, 80 AFLPs, 93 SSRs, 5 ISSR, 1 SCAR y 2CAPS). Estos marcadores se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento (G1-G12). El mapa elaborado (**Figura 4.5**) cubrió una distancia genética de 1099cM, con un número medio de marcadores por grupo de 38.5, variando desde los 54 del G5 a los 27 marcadores del G11. La densidad media del mapa fue de 2.38cM por marcador. La densidad de los grupos de ligamiento varió desde los 3.16cM/ marcador del grupo 6 a los 1.78cM/marcador del grupo 2. Los marcadores se distribuyeron de forma aleatoria a intervalos que variaron dependiendo del grupo de ligamiento entre 29 y 1 cM, algunos de los marcadores fueron cosegregantes, es decir, se localizaron en la misma posición en el mapa.

Tras la localización de los nuevos microsatélites en el mapa de ligamiento se aumento la densidad del mapa, de los 3cM/marcador del mapa generado con la población F_2 a 2.38cM/marcador. Algunos grupos de ligamiento se expandieron con el posicionamiento de los nuevos marcadores, como es el caso de los grupos G4, G6, G9, G11 y G12. Así mismo algunos de estos marcadores se localizaron en zonas poco saturadas del mapa disminuyendo la distancia entre marcadores (G7 y G11).

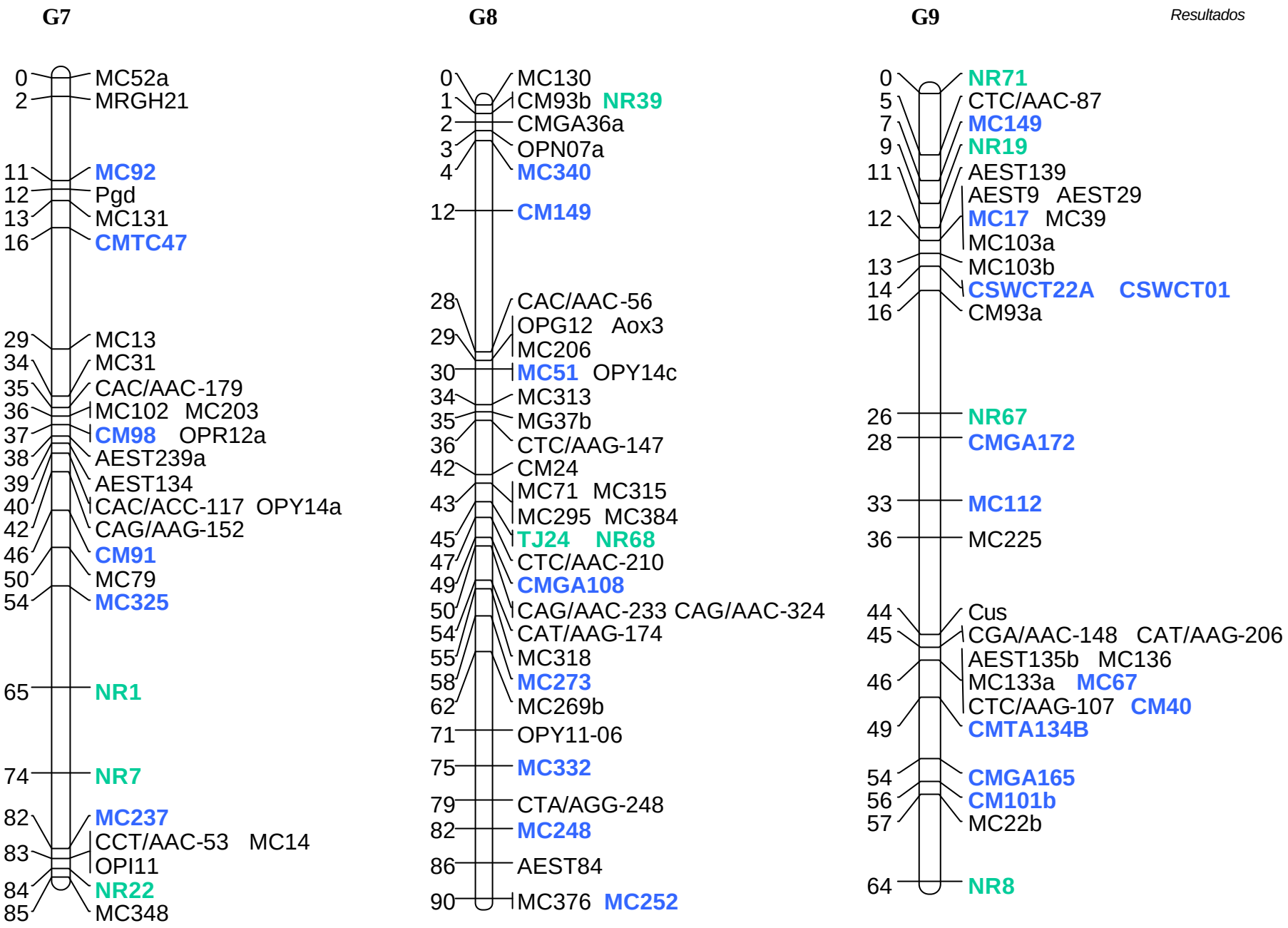
Los nuevos microsatélites se localizaron en las mismas posiciones que en el mapa de la población LDHs, sirviendo en algunos casos de unión de los grupos de ligamiento y posicionándose en zonas en las que no existían marcadores de tipo codominante.


G1
0 OPR12b
3 CSGA057
4 AEST47
5 MC301
7 TJ3
16 MC68 MC319
19 CAC/ACC-86
25 TJ2
30 Aox2
31 MC329 CMTC13
MC281
32 Aco
33 MC356
34 CM173
35 MC11a
36 MC11b
40 MC316
42 MC78
52 Mdr
54 CCT/AAC-52 CMACC146
CAC/AAC-235 MC77
55 MC352
56 MC208 MC269a
58 CAA/AGC-212
59 CMAG59
60 OPO19
67 CMAT141
74 AEST135a
75 AEST1a
83 MC138
86 AEST59
89 NR56
100 CAC/AAG-58
G2
0 CTA/ACG-302
11 MG19
12 CTA/AGC-105
14 MC235 MC127
19 MC221 MC148
MC209b
20 OPX11a AEST90b
25 TJ12b
28 CSWCT10
29 TJ30
30 NR66a MC53
31 TJ31 OPP08b
MC244 OPY16
34 OPK03b
CAT/AAC-62 CTA/AGC-186
36 MG57 OPO15
CM11 MC331b
37 CM88a MC27
38 CMGA128
39 CTC/AAG-323 CSWCT03B
42 CMTA170a MC202
43 OPP19b
45 MC54 OPP07
60 NR5
63 MC124 MC296
71 MC298
74 MC215
75 TJ10
77 MC207b
80 MC365 MC32
82 CMGA36b
G3
0 MC373
11 MC311
18 Npr
21 MC44
27 NR75
29 ACTG
30 NR21 CTC/AAG-136
TJ38 OPX11c
MC253 OPH03
31 OPJ18 CAC/AAC-79
CAT/AAC-110
CAC/ACC-78 CTA/AGG-200
32 Acs2 NR30
CACGb CSAT425B
33 CAC/AAC-119
34 CAC/AAC-77
35 MC317
41 CMGA21
45 CM139
47 CAC/AAC-62
62 CMGA15
65 MC387
66 OPG04
69 MC217
70 MC125
72 MC249
76 CAC/ACG-139

(Fig 4.5)


G4
0 MC33
9 GATA
17 NR61 MC7
18 MC233
19 MC287
21 MC88 MC76
23 CAA/AGG-129
27 GACA TJ37
30 NR9
34 CMAT35
35 NR35
37 CCT/AAC-176 NR52
MC261a
38 MC256
48 CAT/AAC-141 OPL04b
MC4 MC223
49 OPM11a MC52b
CCT/AAC-173 NR3
50 MC99b CAG/AAC-236
51 CTC/AAC-331
52 CAC/AAC-217
62 NR2
69 MRGH63 MRGH4
74 MC276
80 CSWTA02
95 CMTAA166 CAT/ACC-240
105 NR100
G5
0 CTA/AGG-218
2 CAC/AAG-264
3 CCT/AAC-102
4 Mlf1
MC337 MC326
5 MC146
7 CAT/AAC-55 CMTC160
10 NR62 MC388
12 TJ33
19 CAT/AAC-150
24 Icl
25 MG23 Ms
27 OPL04a
28 CAT/AAG-66 CACGa
29 CAA/AGC-74 MC264
CAT/AAG-70 OPY05
30 MC375
31 NR12 MC331a
32 OPK03a MC277
35 NR45
36 CTA/AGC-256
37 CAC/AAC-52
39 CSWCT18B MC63
40 MC259
42 MC255a AEST239b
47 MC234
48 MC20
49 MC231
54 TJ23
60 MC40
61 MC107
63 MC16 MC118
MC82
65 MC291
66 Acs1
67 MC349 CMGA104
70 MG34b
71 MC93
84 MC278
85 MC265
98 CAC/AAG-130
G6
0 MC216
17 MC279
22 AEST144
33 CAA/AGC-214
37 CTC/AAC-71
39 Msf1 CTC/AAG-68
MC120 MC265b
41 CTC/AAG-115 MC134
42 MG1
43 MC133b
44 TJ21 NR86
49 NR92
50 AEST23
AEST1b CTA/AAC-92
51 MC85
52 CM101a
54 CMCT505
56 CAA/AGG-98
58 CAT/AAG-132
59 CMCAA145 OPQ17
60 TJ26 MC309
61 MC210 NR53
62 MC247 OPU01
75 CSWCT11
77 OPW08
83 TJ27
106 MC294
109 MC212
117 NR4

(Fig 4.5)


G7
0 MC52a
2 MRGH21
11 MC92
12 Pgd
13 MC131
16 CMTC47
29 MC13
34 MC31
35 CAC/AAC-179
36 MC102 MC203
37 CM98 OPR12a
38 AEST239a
39 AEST134
40 CAC/ACC-117 OPY14a
42 CAG/AAG-152
46 CM91
50 MC79
54 MC325
65 NR1
74 NR7
82 MC237
83 CCT/AAC-53 MC14
OPI11
84 NR22
85 MC348
G8
0 MC130
1 CM93b NR39
2 CMGA36a
3 OPN07a
4 MC340
12 CM149
28 CAC/AAC-56
29 OPG12 Aox3
MC206
30 MC51 OPY14c
34 MC313
35 MG37b
36 CTC/AAG-147
42 CM24
43 MC71 MC315
MC295 MC384
45 TJ24 NR68
47 CTC/AAC-210
49 CMGA108
50 CAG/AAC-233 CAG/AAC-324
54 CAT/AAG-174
55 MC318
58 MC273
62 MC269b
71 OPY11-06
75 MC332
79 CTA/AGG-248
82 MC248
86 AEST84
90 MC376 MC252
G9
0 NR71
5 CTC/AAC-87
7 MC149
9 NR19
11 AEST139
AEST9 AEST29
12 MC17 MC39
MC103a
13 MC103b
14 CSWCT22A CSWCT01
16 CM93a
26 NR67
28 CMGA172
33 MC112
36 MC225
44 Cus
45 CGA/AAC-148 CAT/AAG-206
AEST135b MC136
46 MC133a MC67
CTC/AAG-107 CM40
49 CMTA134B
54 CMGA165
56 CM101b
57 MC22b
64 NR8

(Fig 4.5)

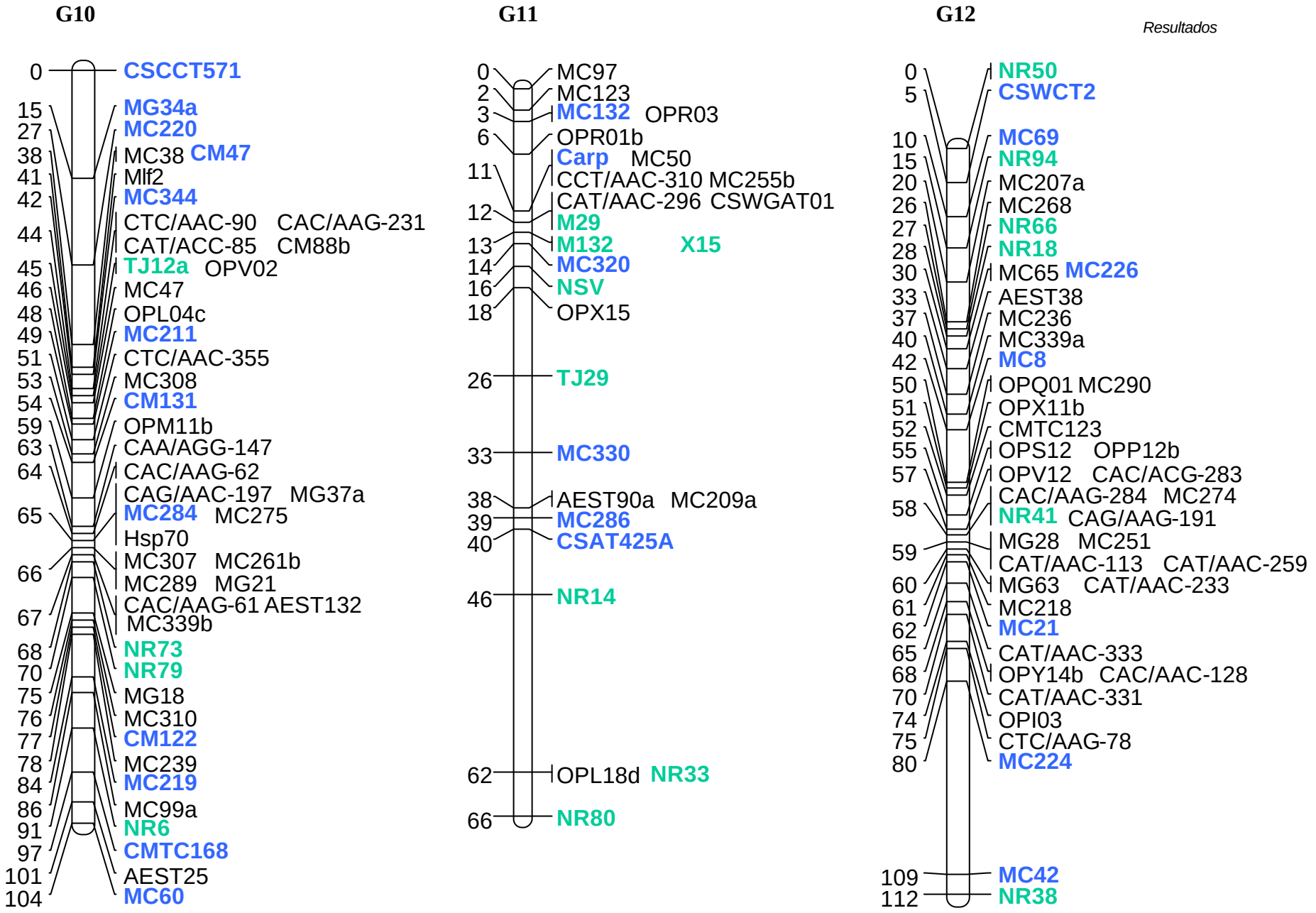
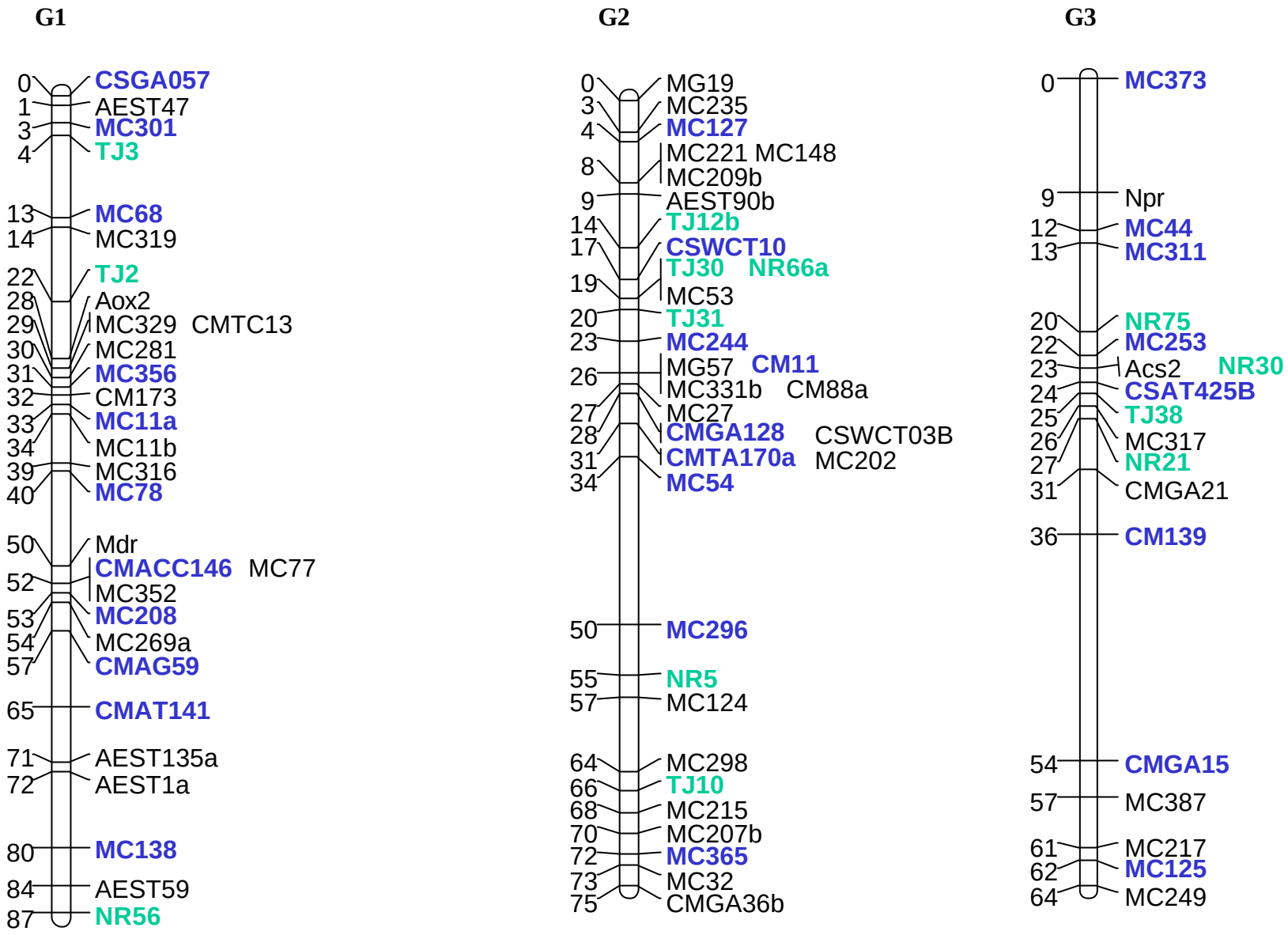


Figura 4.5: Mapa integrado de una población de LDHs y una F_2 obtenidas a partir del cruzamiento PI 161375 x T111 con marcadores dominantes y codominantes. Los grupos de ligamiento están representados por barras verticales (G1-G12), a la izquierda de las cuales se encuentran situados los loci y a la derecha aparecen las distancias de recombinación (cM) aditivas. En color verde aparecen marcados los nuevos microsatélites localizados en el mapa, y en color azul los marcadores comunes para los dos mapas.

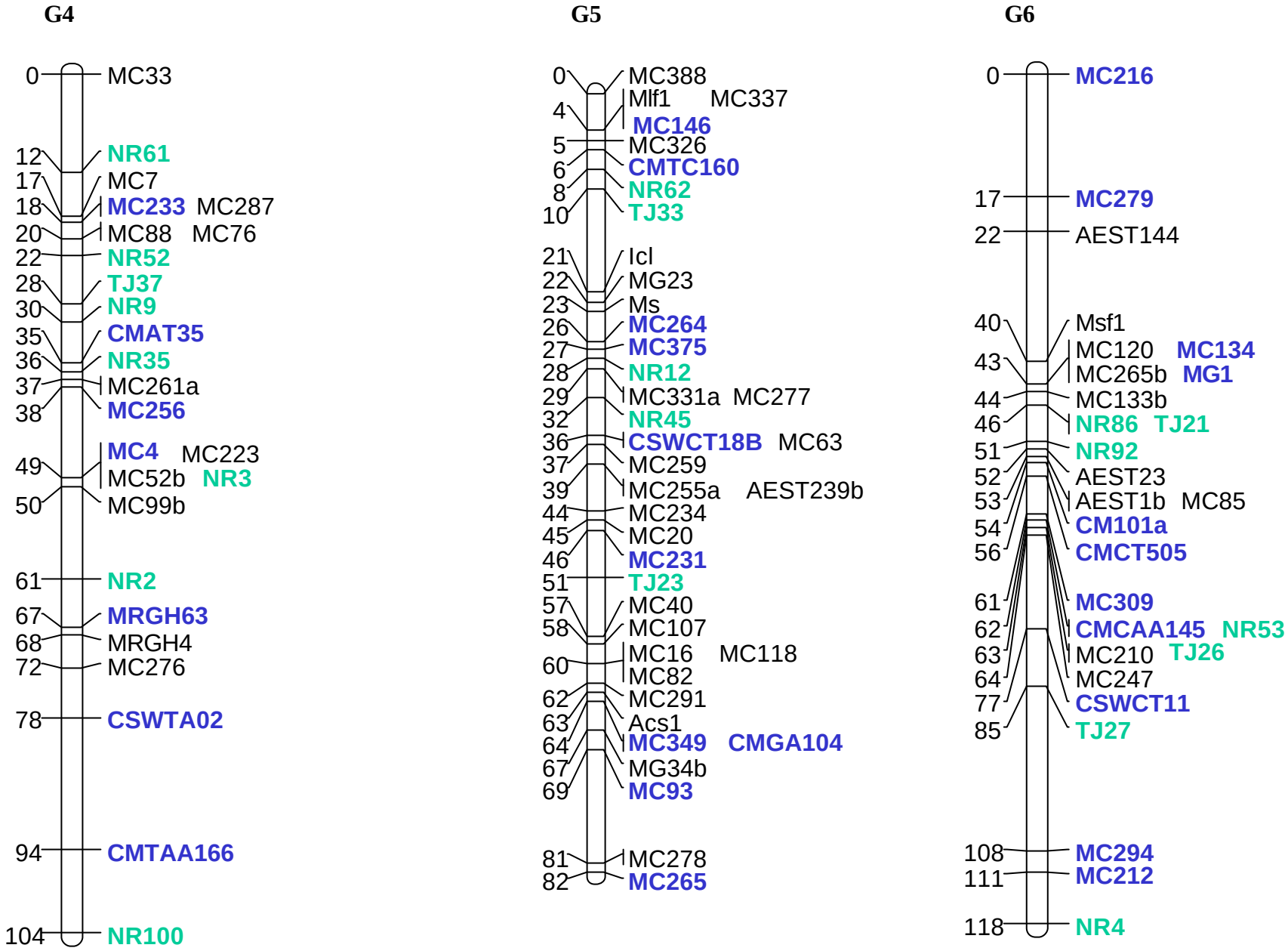
4.2.3.2.- Mapa con marcadores codominantes de alta calidad

A partir de estas dos mismas poblaciones (LDHs y F_2) se procedió a la integración de mapas únicamente con marcadores codominantes, es decir, RFLPs, SSRs y CAPS. La importancia de utilizar este tipo de marcadores es que pueden ser detectados en todo tipo de poblaciones y usados en otros cruzamientos, pudiéndose utilizar el mapa generado en este apartado como mapa de referencia.

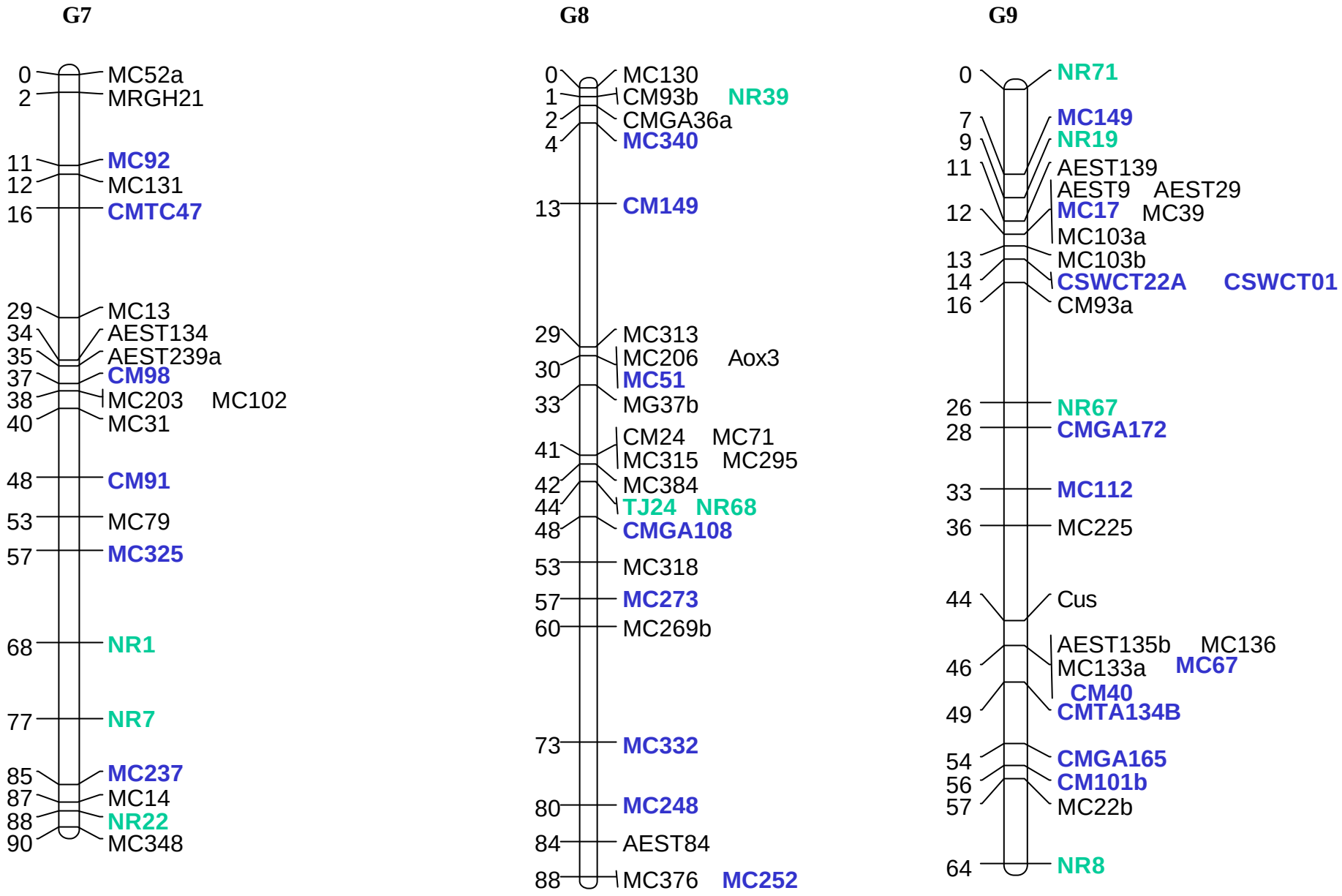
Se generó un mapa de ligamiento en el cual se posicionaron 331 marcadores, 236 de tipo RFLPs, 93 de tipo microsatélite donde están incluidos los 57 nuevos y 2 marcadores de tipo CAPS, que se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento (G1-G12). El mapa elaborado (**Figura 4.6**) cubrió una distancia genética de 1061cM. Los marcadores se distribuyeron de forma aleatoria en intervalos que variaron en función del grupo de ligamiento entre 30cM a 1cM, algunos de los marcadores fueron cosegregantes. La densidad media del mapa fue de 3.02cM/marcador. El número medio de marcadores por grupo fue de 27.6 que varió desde los 39 marcadores del G5 a los 18 del G11.


G1
0 CSGA057
1 AEST47
3 MC301
4 TJ3
13 MC68
14 MC319
22 TJ2
28 Aox2
29 MC329 CMTC13
30 MC281
31 MC356
32 CM173
33 MC11a
34 MC11b
39 MC316
40 MC78
50 Mdr
52 CMACC146 MC77
MC352
53 MC208
54 MC269a
57 CMAG59
65 CMAT141
71 AEST135a
72 AEST1a
80 MC138
84 AEST59
87 NR56
G2
0 MG19
3 MC235
4 MC127
8 MC221 MC148
MC209b
9 AEST90b
14 TJ12b
17 CSWCT10
19 TJ30 NR66a
MC53
20 TJ31
23 MC244
26 MG57 CM11
MC331b CM88a
27 MC27
28 CMGA128 CSWCT03B
31 CMTA170a MC202
34 MC54
50 MC296
55 NR5
57 MC124
64 MC298
66 TJ10
68 MC215
70 MC207b
72 MC365
73 MC32
75 CMGA36b
G3
0 MC373
9 Npr
12 MC44
13 MC311
20 NR75
22 MC253
23 Acs2 NR30
24 CSAT425B
25 TJ38
26 MC317
27 NR21
31 CMGA21
36 CM139
54 CMGA15
57 MC387
61 MC217
62 MC125
64 MC249

(Fig 4.6)


G4
0 MC33
12 NR61
17 MC7
18 MC233 MC287
20 MC88 MC76
22 NR52
28 TJ37
30 NR9
35 CMAT35
36 NR35
37 MC261a
38 MC256
49 MC4 MC223
MC52b NR3
50 MC99b
61 NR2
67 MRGH63
68 MRGH4
72 MC276
78 CSWTA02
94 CMTAA166
104 NR100
G5
0 MC388
Mlf1 MC337
4 MC146
5 MC326
6 CMTC160
8 NR62
10 TJ33
21 Icl
22 MG23
23 Ms
26 MC264
27 MC375
28 NR12
29 MC331a MC277
32 NR45
36 CSWCT18B MC63
37 MC259
39 MC255a AEST239b
44 MC234
45 MC20
46 MC231
51 TJ23
57 MC40
58 MC107
60 MC16 MC118
MC82
62 MC291
63 Acs1
64 MC349 CMGA104
67 MG34b
69 MC93
81 MC278
82 MC265
G6
0 MC216
17 MC279
22 AEST144
40 Msf1
43 MC120 MC134
MC265b MG1
44 MC133b
46 NR86 TJ21
51 NR92
52 AEST23
53 AEST1b MC85
54 CM101a
56 CMCT505
61 MC309
62 CMCAA145 NR53
63 MC210 TJ26
64 MC247
77 CSWCT11
85 TJ27
108 MC294
111 MC212
118 NR4

(Fig 4.6)


G7
0 MC52a
2 MRGH21
11 MC92
12 MC131
16 CMTC47
29 MC13
34 AEST134
35 AEST239a
37 CM98
38 MC203 MC102
40 MC31
48 CM91
53 MC79
57 MC325
68 NR1
77 NR7
85 MC237
87 MC14
88 NR22
90 MC348
G8
0 MC130
1 CM93b NR39
2 CMGA36a
4 MC340
13 CM149
29 MC313
30 MC206 Aox3
MC51
33 MG37b
41 CM24 MC71
MC315 MC295
42 MC384
44 TJ24 NR68
48 CMGA108
53 MC318
57 MC273
60 MC269b
73 MC332
80 MC248
84 AEST84
88 MC376 MC252
G9
0 NR71
7 MC149
9 NR19
11 AEST139
AEST9 AEST29
12 MC17 MC39
MC103a
13 MC103b
14 CSWCT22A CSWCT01
16 CM93a
26 NR67
28 CMGA172
33 MC112
36 MC225
44 Cus
AEST135b MC136
46 MC133a MC67
CM40
49 CMTA134B
54 CMGA165
56 CM101b
57 MC22b
64 NR8

(Fig 4.6)

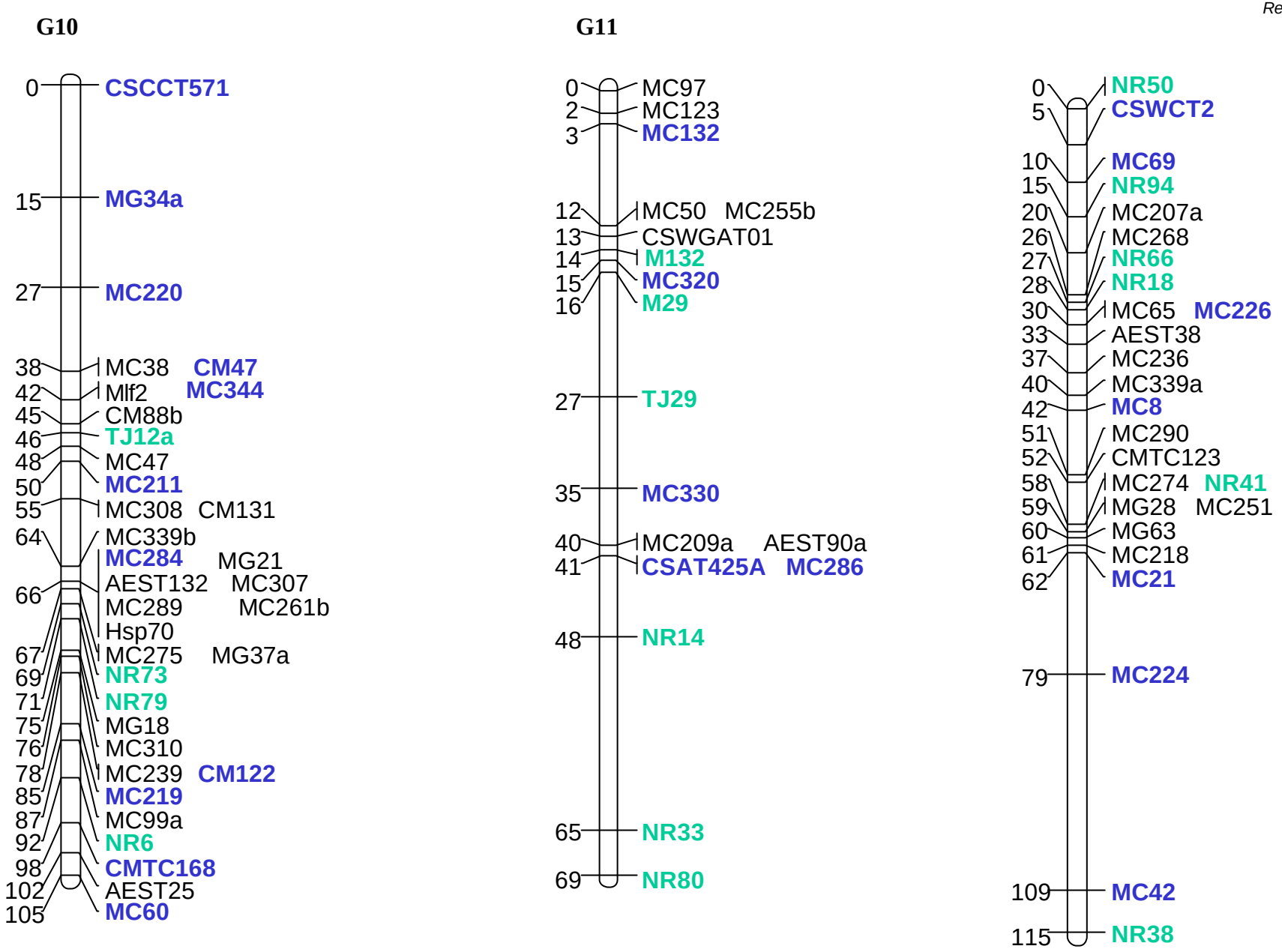


Figura 4.6: Mapa integrado de una población de LDHs y una F_2 obtenidas a partir del cruzamiento PI 161375 x T111 con marcadores codominantes. Los grupos de ligamiento están representados por barras verticales (G1-G12), a la izquierda de las cuales se encuentran situados los loci y a la derecha aparecen las distancias de recombinación (cM) aditivas. En color verde aparecen marcados los nuevos microsatélites localizados en el mapa, y en color azul los marcadores comunes para los dos mapas.

4.2.4.- Segregación de las frecuencias alélicas

Se escogieron para el estudio de la segregación alélica general marcadores situados a intervalos de 15-20cM de forma que el número de marcadores por cromosoma fuera similar y que la densidad de los marcadores analizados por grupo de ligamiento fuera homogénea. La distribución alélica general observada de la población de las LDHs (32.5: 34.5) no fue significativamente diferente a la esperada 1:1 (**Figura 4.7)**.

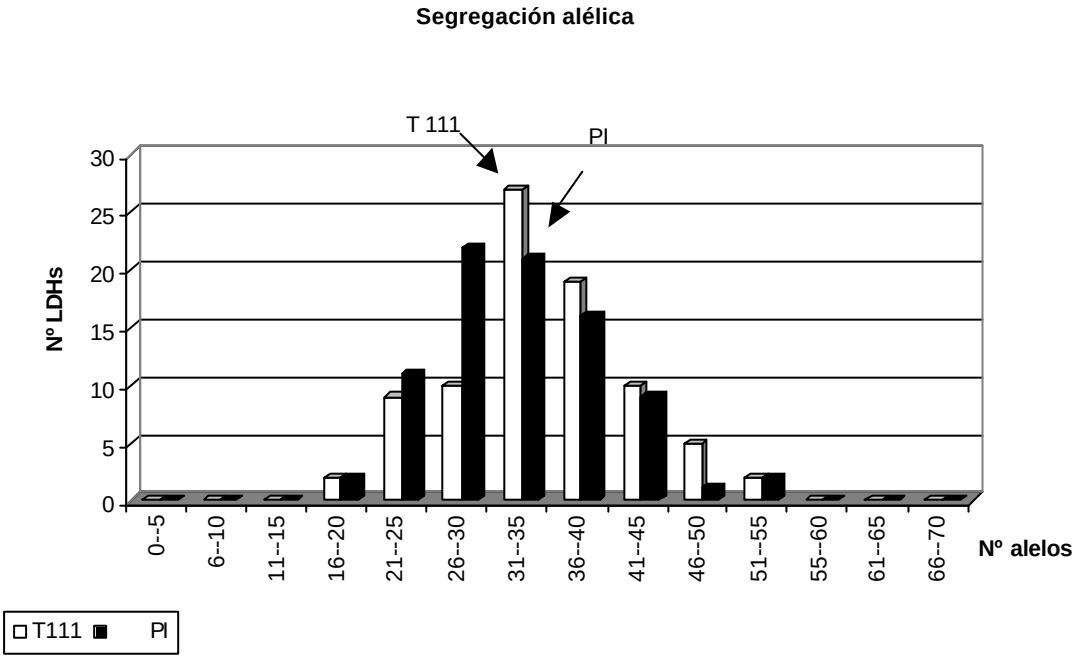
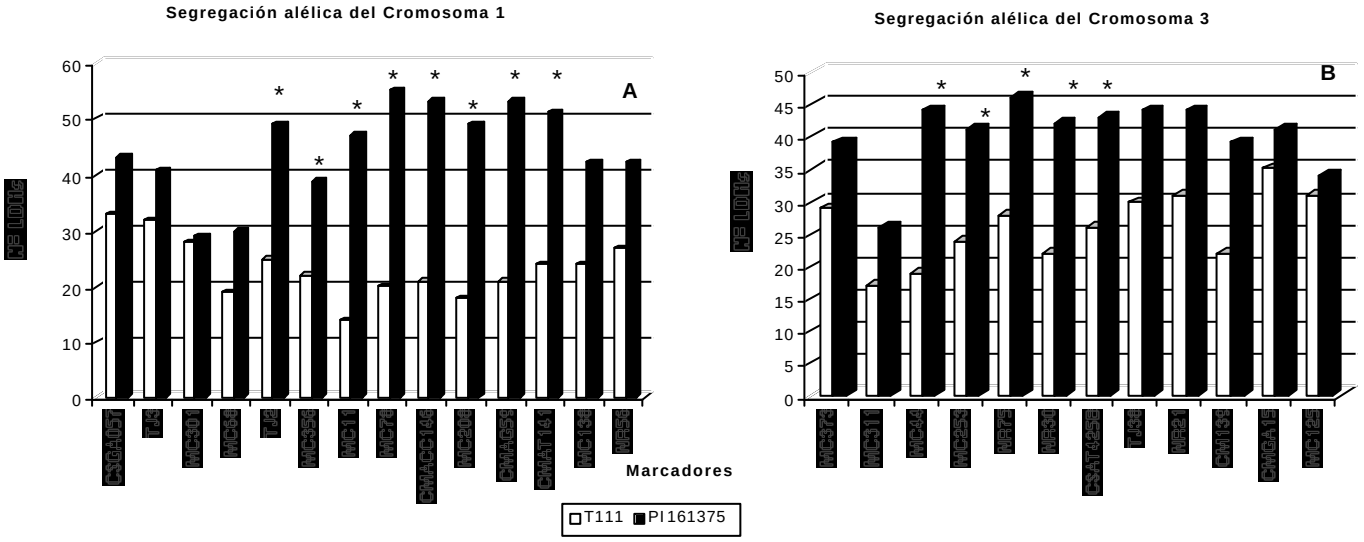


Figura 4.7: Distribución de las frecuencias alélicas de los loci elegidos, separados por una distancia entre 15-20 cM. Las medias de las frecuencias de los alelos pertenecientes a cada parental aparecen señalados con una flecha.

En la mayoría de los grupos de ligamiento la proporción de alelos siguió la distribución esperada 1:1. Sin embargo, tras el estudio individual de cada grupo de ligamiento analizando todos los marcadores localizados en el mapa, en 6 zonas del genoma se apreció la distorsión de las frecuencias alélicas. En total, 30 marcadores (13 RFLP y 17 SSR), representando el 17.75%

de los 169 marcadores analizados, presentaron una desviación significativa ($p<0.001$) de las segregaciones esperadas (**Figura 4.8**).

En el cromosoma 1 (**Figura 4.8 A**) apareció la región de 48.2cM entre los marcadores TJ2 y CMAT141 que comprende 8 marcadores que presentaron distorsión con mayor frecuencia del alelo del parental PI 161375. En el cromosoma 3 (**Figura 4.8 B**) también se observó una distorsión de las frecuencias alélicas favorable a PI 161375, cubriendo 11.1cM del grupo de ligamiento, en la zona comprendida entre los marcadores MC44 y CSAT425B. En el cromosoma 5 (**Figura 4.8 C**) 4 loci presentaron una desviación de las frecuencias esperadas cubriendo 9.9 cM del grupo de ligamiento, entre los marcadores TJ33 y CMTC160, observándose una mayor frecuencia en el alelo del parental T111. En el cromosoma 6 (**Figura 4.8 D**) se apreció una distorsión favorable a los alelos del parental T111, entre los marcadores TJ21 y CM101a (15.1 cM). En el cromosoma 8 (**Figura 4.8 E**) se observaron segregaciones de las frecuencias alélicas distorsionadas favorables al alelo del T111 en 6 loci, entre los marcadores MC51 y MC273 (21.5cM). Por último, en el cromosoma 12 (**Figura 4.8 F**) se observó también una distorsión favorable al alelo del T111, entre los marcadores NR66 y MC8 (26.5cM).



(Fig 4.8)

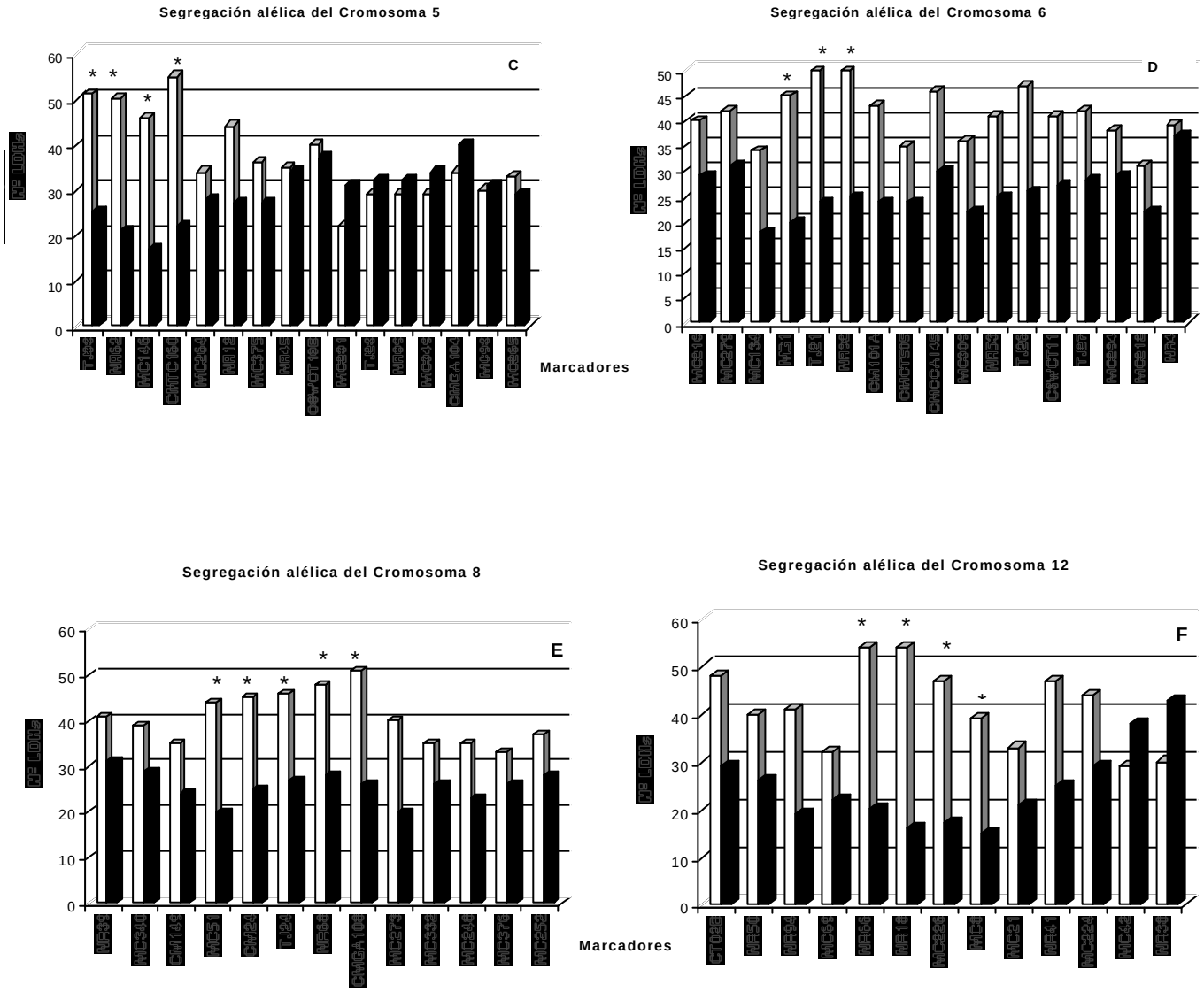


Figura 4.8: Distorsión de las frecuencias alélicas presentadas por algunos loci, la posición de los marcadores no está a escala del mapa. La gráfica (**A**) representa la distorsión de las frecuencias alélicas del cromosoma 1, la (**B**) corresponde al cromosoma 3, la (**C**) al cromosoma 5, la (**D**) al cromosoma 6, la (**E**) al cromosoma 8 y la (**F**) al cromosoma 12. Marcados con '*' aparecen los loci que presentan distorsión significativa ($p < 0.001$).

4.3.- Estudio de las características de morfología floral, morfología de fruto y germinación de las LDHs y localización de QTLs implicados en estos caracteres en el mapa genético de melón

4.3.1.- Distribución de los caracteres cuantitativos

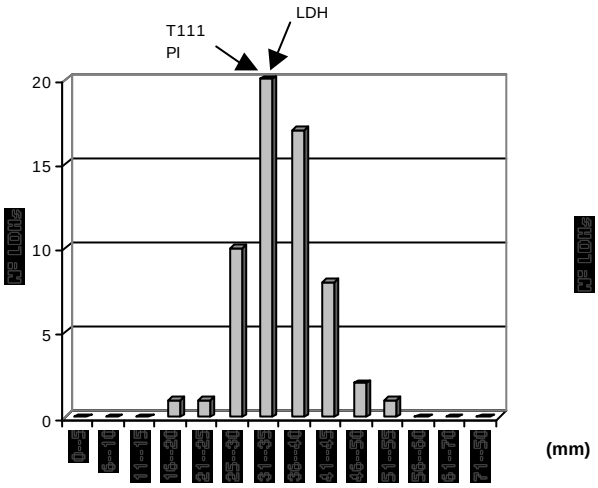
4.3.1.1.- Características de morfología floral

Las líneas PI 161375 y T111 presentaron diferencias en 7 de los caracteres de morfología floral analizados, para los otros 6 caracteres (diámetro de corola, número de pétalos, número de sépalos, relación longitud /diámetro de ovario, densidad de estambres y exerción del pistilo) no se apreciaron diferencias. Donde mayores diferencias se observaron fue para los caracteres de longitud, pubescencia y densidad de pelo en el ovario y número de estambres. Así, la flor de PI 161375 presenta un aspecto lampiño debido a los pelos cortos y la densidad de pelo es de 11 pelos / 0.2 mm y 5 estambres. La flor de T111 presenta un ovario de aspecto lanoso producido por pelos largos, la densidad de pelos es de 7 pelos / 0.2 mm y 3 estambres.

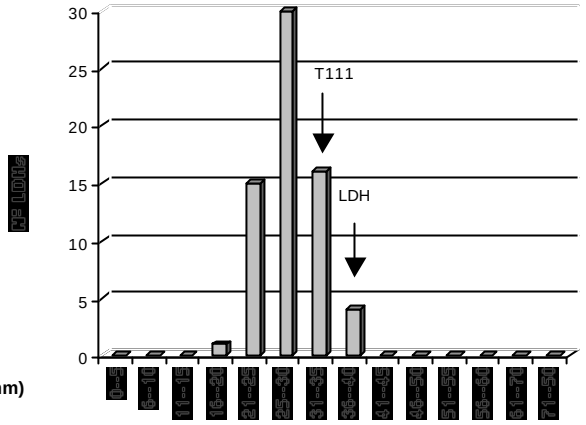
Los caracteres de morfología floral analizados, a excepción del número de pétalos y número de sépalos, presentaron una distribución continua característica de la herencia poligénica (**Figura 4.9**). Los caracteres: Diámetro de corola, longitud de pelo del ovario, pubescencia, densidad de pelo, longitud y diámetro de ovario, relación longitud/ diámetro, peso flor, número y densidad de estambres y exerción del pistilo, presentaron una variación de tipo transgresivo, donde algunas de las líneas de la población exhibieron fenotipos más extremos que los parentales.

En la **Tabla 4.3** se presentan los valores de la media, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para todos los caracteres de morfología floral analizados.

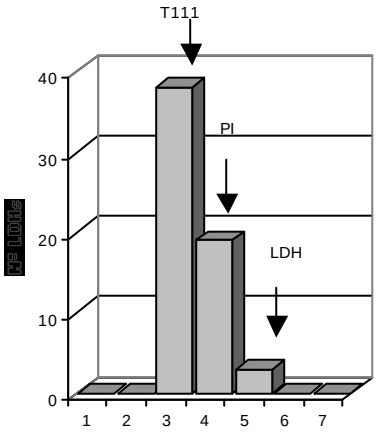
La media del diámetro del ovario (2001) en las LDHs fue más próxima a los valores de PI 161375. Para otros caracteres, longitud de pelo (2001-02), longitud de ovario (2002) y peso flor (2002), la media de la población de líneas dihaploides fue más próxima a T111. En el resto de los caracteres estudiados, aunque los valores de los dos parentales fueron similares, se observó variación en la distribución de los caracteres en las LDHs.



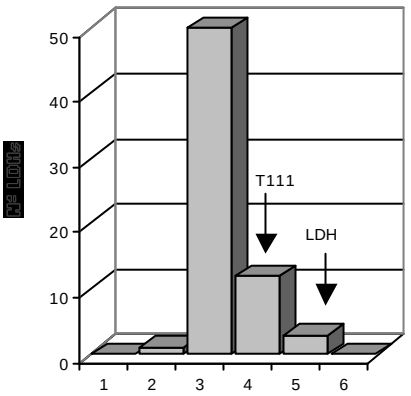
Diámetro de corola (2001)



Diámetro de corola (2002)

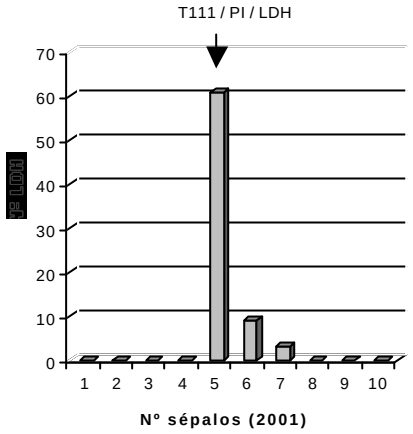


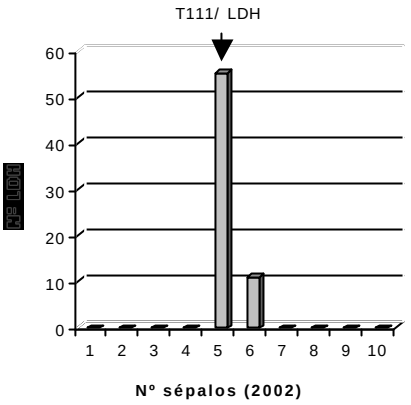
Nº pétalos (2001)

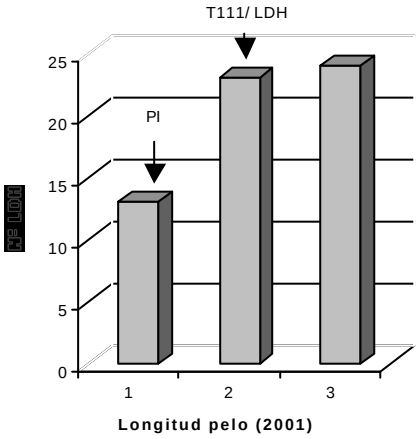


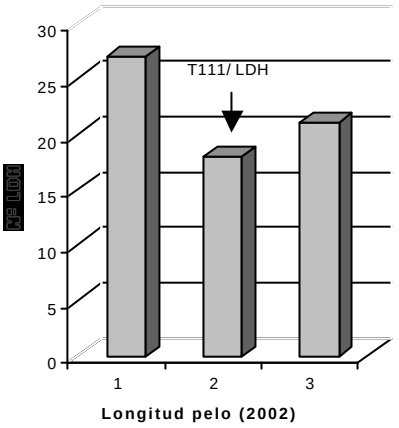
Nº petalos (2002)

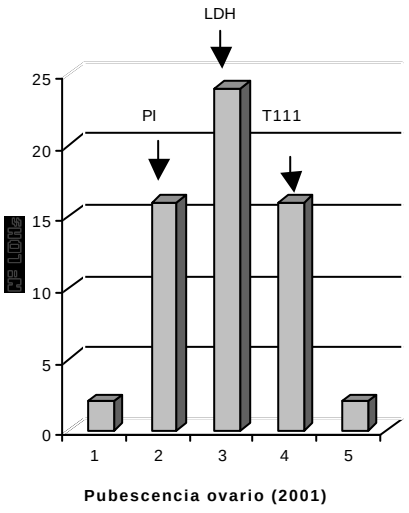
(Fig 4.9)

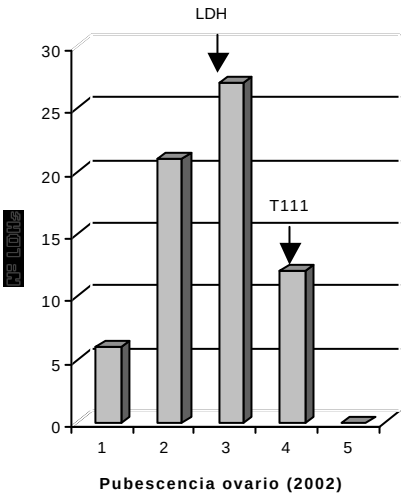

T111 / PI / LDH
Nº sépalos (2001)


T111/ LDH
Nº sépalos (2002)

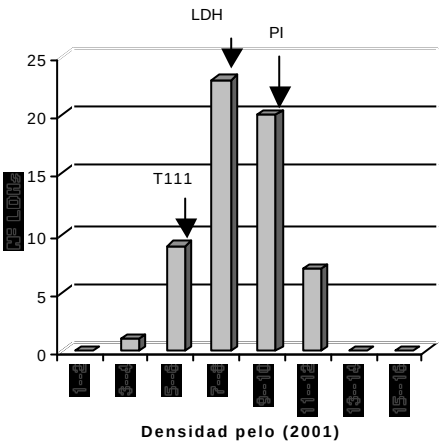

T111/ LDH
PI
Longitud pelo (2001)

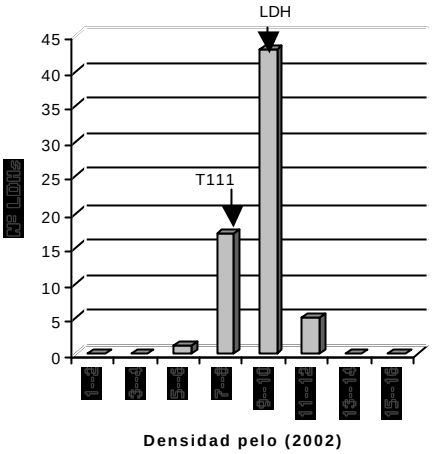

T111/ LDH
Longitud pelo (2002)

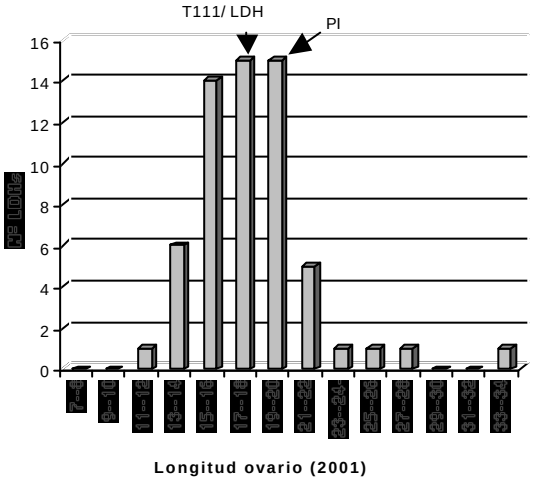

LDH
PI
T111
Pubescencia ovario (2001)

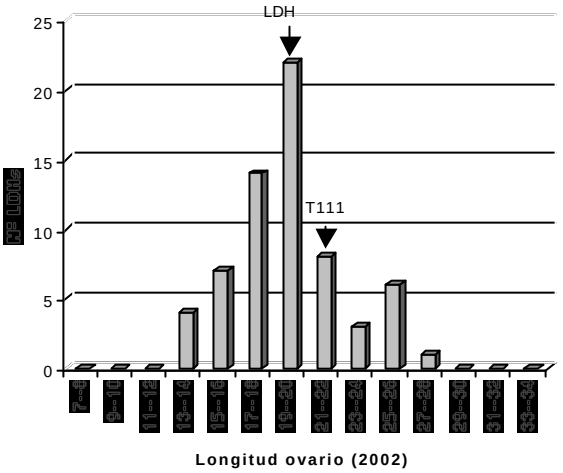

LDH
T111
Pubescencia ovario (2002)

(Fig 4.9)

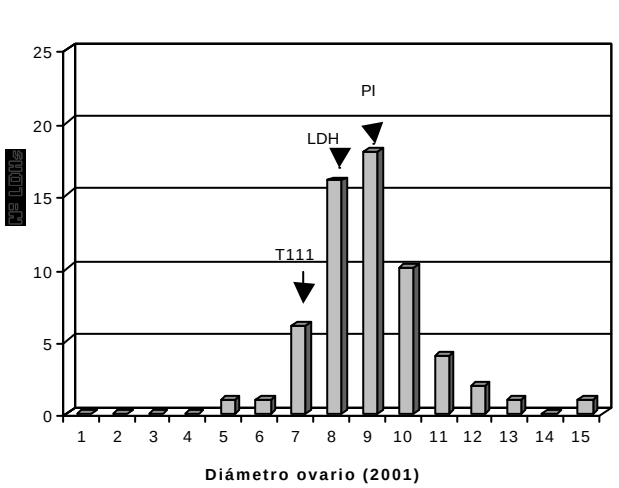

LDH
PI
T111
Nº Lotis
Densidad pelo (2001)

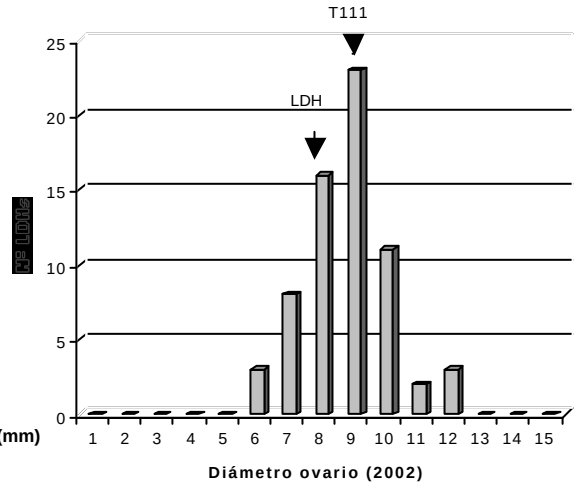

LDH
T111
Nº Lotis
Densidad pelo (2002)


T111/ LDH
PI
Nº Lotis
Longitud ovario (2001)


LDH
T111
Nº Lotis
Longitud ovario (2002)

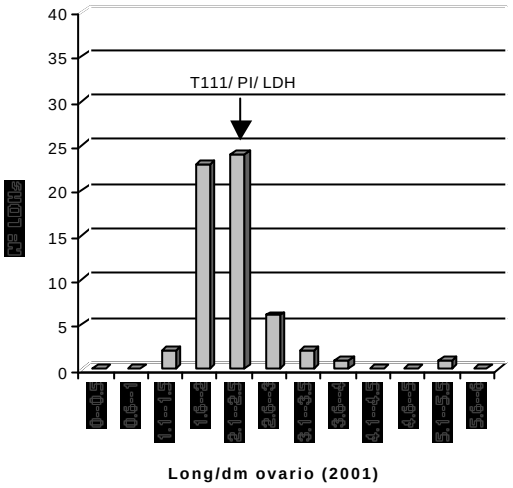
(mm)

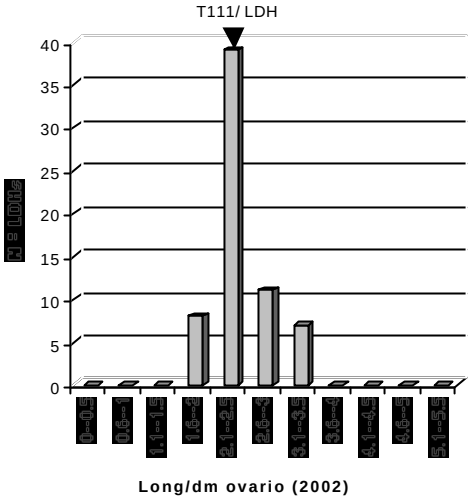

PI
LDH
T111
Nº Lotis
Diámetro ovario (2001)

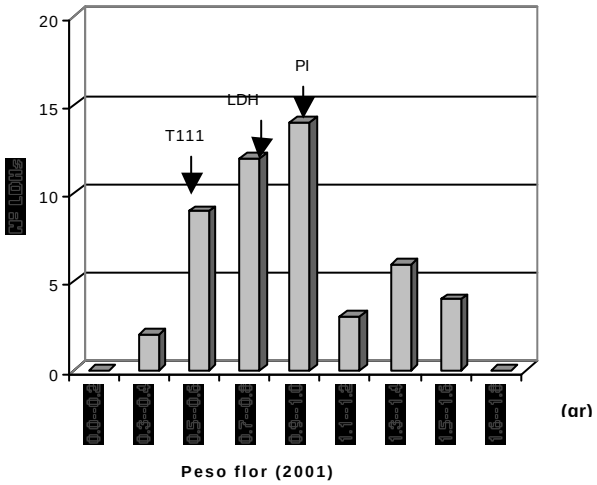

T111
LDH
Nº Lotis
Diámetro ovario (2002)

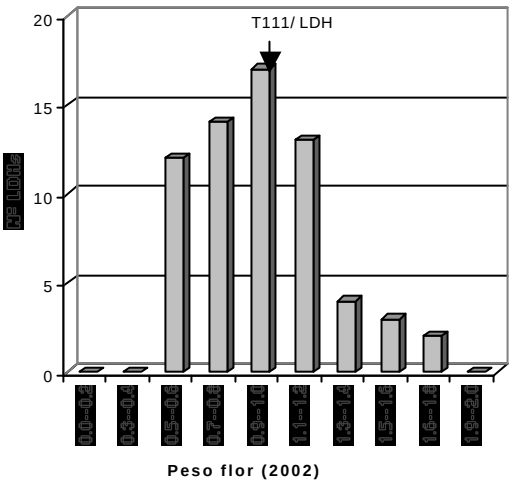
(mm)

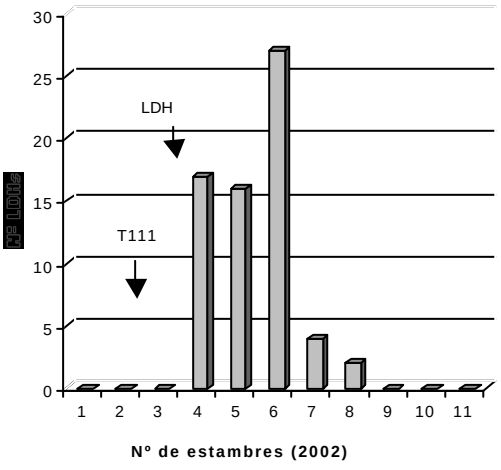
(Fig 4.9)

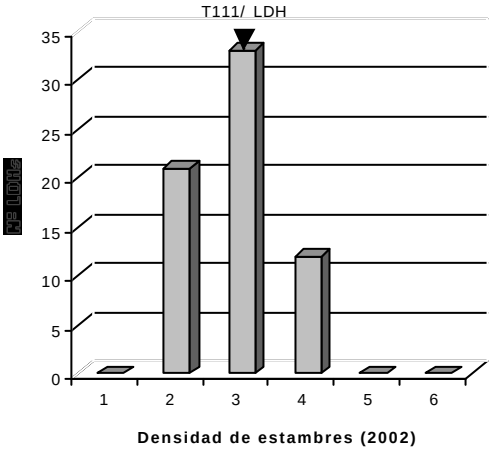

T111/ PI/ LDH
Nº Lóculos
Long/dm ovario (2001)


T111/ LDH
Nº Lóculos
Long/dm ovario (2002)


PI
LDH
T111
Nº Lóculos
Peso flor (2001)


T111/ LDH
Nº Lóculos
Peso flor (2002)


LDH
T111
Nº Lóculos
Nº de estambres (2002)


T111/ LDH
Nº Lóculos
Densidad de estambres (2002)

(Fig 4.9)

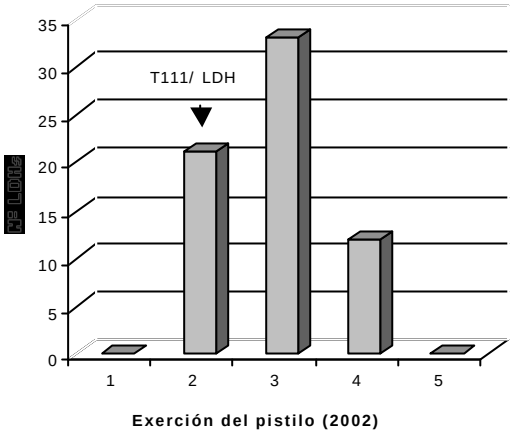


Figura 4.9: Histogramas de frecuencias de los caracteres de morfología floral analizados durante los años 2001-02 en la población de LDHs, para cada carácter se indica con una flecha la media de los dos parentales PI161375 (PI), T111 y de la población de LDHs (LDH).

Tabla 4.3: Descripción de las distribuciones observadas para los caracteres de morfología floral.

			PI161375	T111	LDHs						
Carácter	**Abrev.**	**Año**	**Media**	**Media**	**N[1]**	**Media**	**Varianza**	**SD[2]**	**CV[3]**	**Mínimo**	**Máximo**
Diámetro de corola	**Dcor**	2001	32,65	31,25	60	34,86	36,01	6,001	0,172	18,7	50,714
		2002	[4] -	32,26	66	28,07	14,72	3,836	0,137	18,307	35,78
Nº de pétalos	**Npet**	2001	6	5	60	5,417	0,349	0,591	0,109	5	7
		2002	-	5	66	5,258	0,317	0,563	0,107	4	7
Nº de sépalos	**Nsep**	2001	5	5	60	5,205	0,249	0,499	0,096	5	7
		2002	-	5	66	5,167	0,141	0,376	0,073	5	6
Longitud de pelo	**LogPel**	2001	1	3	60	2,183	0,596	0,77	0,353	1	3
		2002	-	3	66	1,909	0,73	0,854	0,448	1	3
Pubescencia ovario	**Pbov**	2001	2	4	60	3	0,814	0,902	0,301	1	5
		2002	-	4	66	2,682	0,774	0,88	0,328	1	4
Densidad pelo	**Dnpel**	2001	10,38	6,85	60	7,927	3,064	1,75	0,221	3,583	11,3
		2002	-	7,54	66	8,755	1,075	1,037	0,118	6	11
Longitud ovario	**lgov**	2001	18,76	16,27	60	17,635	13,211	3,635	0,206	10,4	33,7
		2002	-	20,13	66	19,119	11,09	3,33	0,174	13,43	30,125
Diámetro ovario	**dov**	2001	9,09	7,7	60	8,432	2,657	1,63	0,195	4,4	14,4
		2002	-	9,26	66	8,241	1,855	1,362	0,165	5,42	11,866
Relación longitud/ diámetro ovario	**L/d ov**	2001	2,07	2,13	60	2,179	0,32	0,566	0,26	1,458	5,054
		2002	-	2,18	66	2,368	0,15	0,387	0,164	1,558	3,458
Peso flor	**Pflor**	2001	1,067	0,62	60	0,861	0,132	0,363	0,422	0,234	2,505
		2002	-	1,02	66	0,932	0,111	0,333	0,357	0,407	2,125
Nº estambres	**Nestb**	2002	-	3	66	4,364	1,066	1,032	0,237	3	7
Densidad estambres	**Dnsestb**	2002	-	3	66	2,47	0,376	0,613	0,248	1	3
Exerción pistilo	**Expist**	2002	-	2	66	1,864	0,489	0,699	0,375	1	3

[1] Nº de líneas analizadas
[2] Desviación estándar
[3] Coeficiente de variación
[4] No se pudieron realizar los analisis por no haber número suficiente de flores de PI161375

4.3.1.2.- Características de morfología del fruto

Las líneas PI 161375 y T111 presentaron diferencias en los caracteres de longitud, diámetro y peso del fruto. PI 161375 presenta un fruto redondeado mientras que el fruto de T111 es más alargado. La relación longitud/ diámetro de fruto fue similar para ambos. En la **Tabla 4.4** se presentan los valores de la media, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para todos los caracteres de fruto analizados. Todos los caracteres de fruto analizados presentaron una distribución continua característica de la herencia poligénica (**Figura 4.10**). La distribución de los caracteres en las LDHs fue de tipo transgresivo, observándose líneas que exhibieron fenotipos extremos.

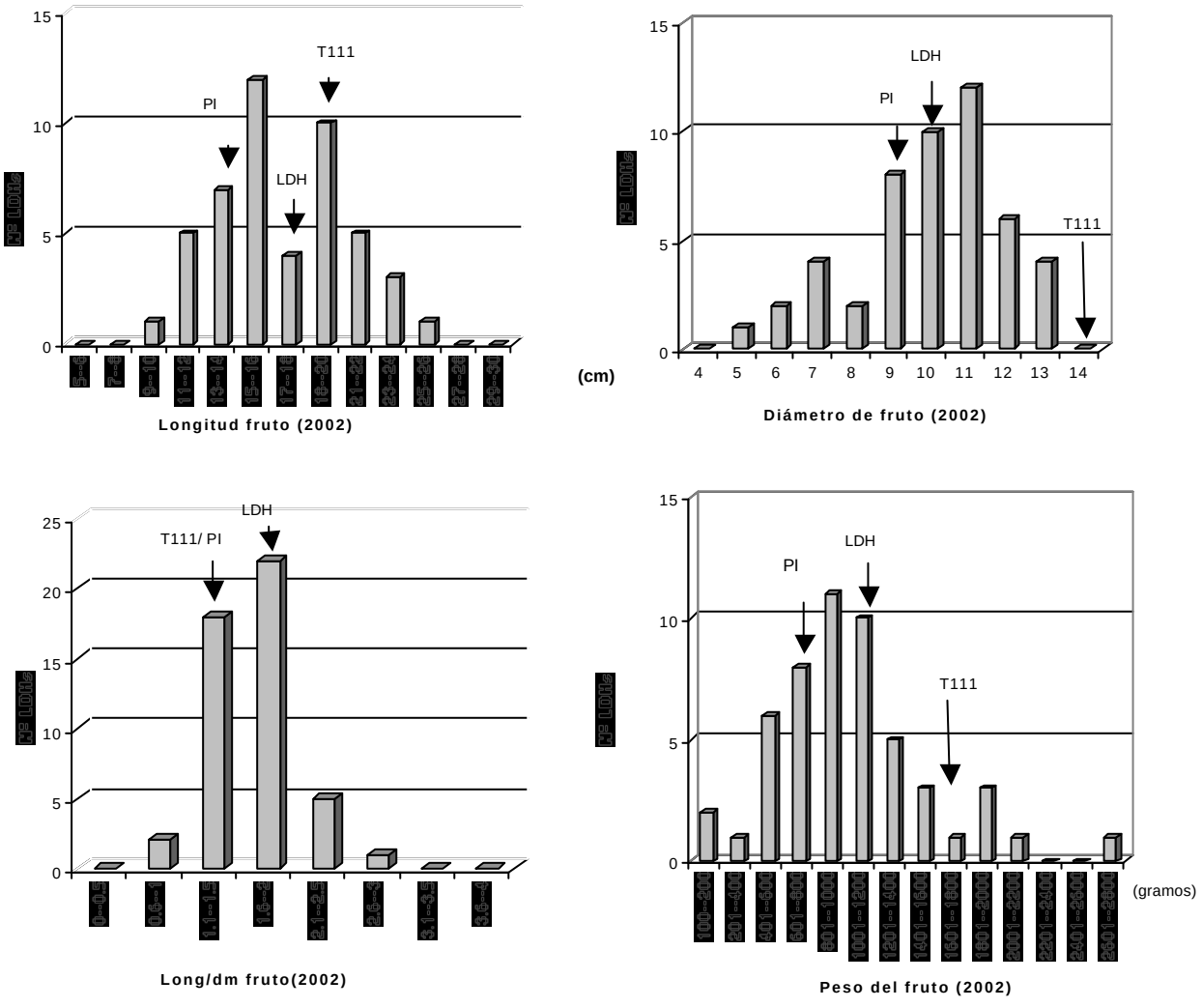


Figura 4.10: Histogramas de frecuencias de los caracteres de morfología de fruto analizados durante el año 2002 en la población de LDHs, para cada carácter se indica con una flecha la media de los dos parentales PI 161375 (PI), T111 y de la población de LDHs (LDH).

Tabla 4.4: Descripción de las distribuciones observadas para los caracteres de morfología de fruto.

			PI161375	T111	LDHs						
Carácter	**Abrev.**	**Año**	**Media**	**Media**	**N[1]**	**Media**	**Varianza**	**SD[2]**	**CV[3]**	**Mínimo**	**Máximo**
Longitud fruto	**Lgfrut**	2002	14	18,7	49	16,626	14,873	3,856	0,232	8,07	25
Diametro fruto	**Dmfrut**	2002	9	14,33	49	10,336	3,343	1,828	0,177	5,5	13,5
Relación longitud/ diámetro fruto	**L/d frut**	2002	1,55	1,4	48	1,645	0,153	0,391	0,238	0,92	2,67
Peso fruto	**Pfrut**	2002	660	1767	52	1009,03	225954	457,35	0,471	106	2676

[1] Nº de líneas analizadas

[2] Desviación estándar

[3] Coeficiente de variación

4.3.1.3.- Características de germinación de las LDHs

Las líneas PI 161375 y T111 presentaron diferente comportamiento en el proceso de germinación. PI 161375 presentó valores menores de germinación en los primeros días del ensayo (D50 = porcentaje de germinación el 5º día, D75= porcentaje de germinación el 8º día, y R50= número de semillas germinadas el 5º día/ total semillas germinadas) germinando sólo el 75% de las semillas al final del ensayo. La mayoría de las semillas de T111 germinaron en los 3 primeros días, lo que se traduce en valores muy altos de los parámetros D50, D75, R50 y R75 (**Figura 4.11**). Así mismo, se observó un comportamiento entre años mucho más regular en la germinación de T111 que nos indicaría que es menos influenciable por el ambiente. La diferencia en los resultados obtenidos entre años probablemente sea debido a que en el año 2001 la germinación se realizó con luz, mientras que en el 2002 el ensayo se llevó a cabo en oscuridad.

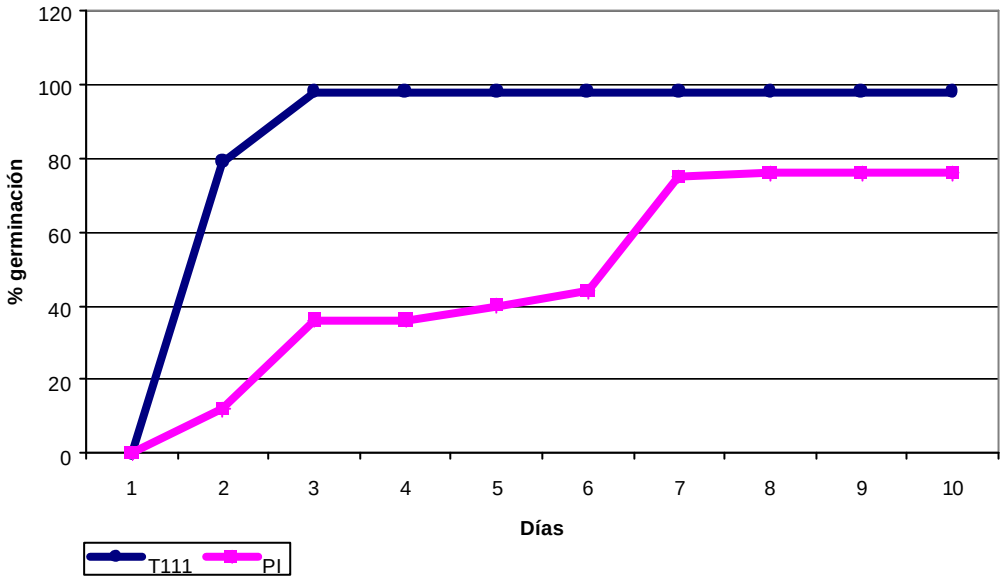
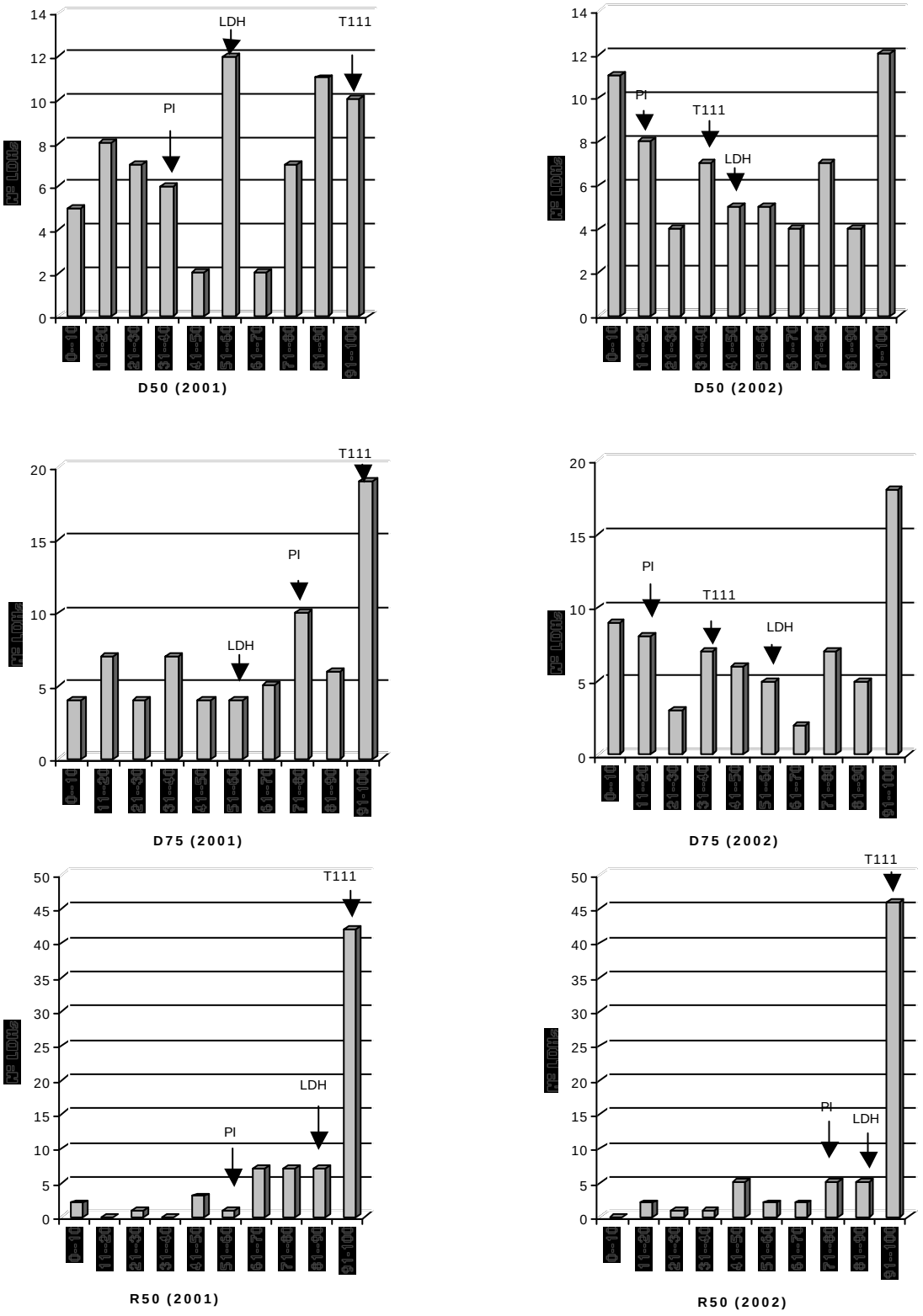


Figura 4.11: Distribución de la germinación de los dos parentales de la población de LDHs en el año 2001.

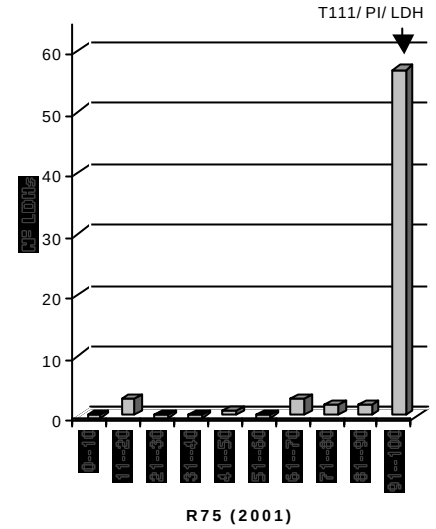
En la **Tabla 4.5** se presentan los valores de la media, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para todos los caracteres de fruto analizados.

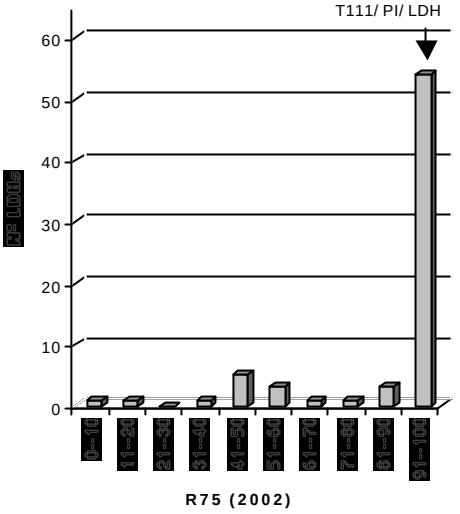
La mayoría de los caracteres relacionados con la germinación presentaron una distribución continua en la población de LDHs, a excepción de R50 (2001-02) y R75 (2001-02) (**Figura 4.12**).

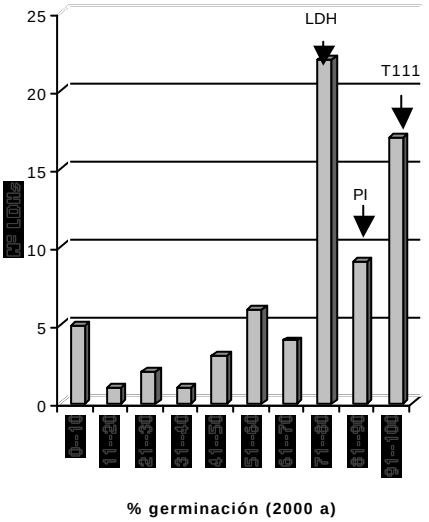
Los caracteres D50 (2001-02), D75 (2002) y porcentaje de germinación (2000a, 2001 y 2002) presentaron una distribución transgresiva. La media de la población de LDHs para D50 (2001), D75 (2001) y % germinación (2001) fue más cercana a PI 161375 y mientras que en D50 (2002), D75(2002), R50 (2001) y % germinación (2000b, 2002) la media fue más cercana a T111.

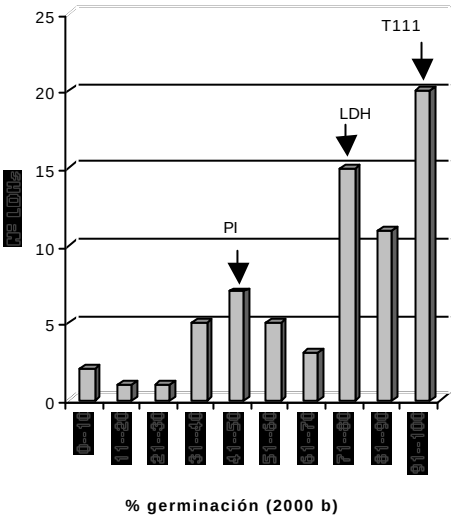


(Fig. 4.12)


T111/ PI/ LDH
60
50
40
30
20
10
0
R75 (2001)


T111/ PI/ LDH
60
50
40
30
20
10
0
R75 (2002)


LDH
T111
PI
25
20
15
10
5
0
% germinación (2000 a)


T111
LDH
PI
25
20
15
10
5
0
% germinación (2000 b)

(Fig. 4.12)

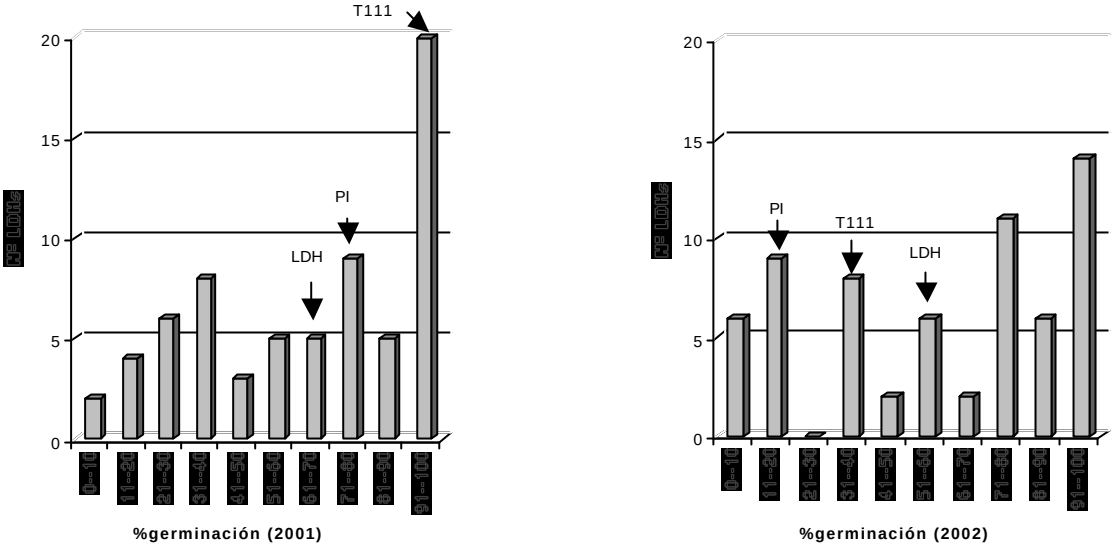


Figura 4.12: Histogramas de frecuencias de los caracteres de germinación analizados durante los años 2000-01-02, con una flecha se indica la media de PI 161375 (PI), T111 la población de LDHs (LDH).

Tabla 4.5: Descripción de las distribuciones observadas para los caracteres de germinación.

			PI161375	T111	LDHs						
Carácter	**Abrev.**	**Año**	**Media**	**Media**	**N**[1]	**Media**	**Varianza**	**SD**[2]	**CV**[3]	**Mínimo**	**Máximo**
% Germinación a mitad del experimento (5ª día)	**D50**	2001	40	98	70	56,34	941,33	30,68	0,55	0	100
		2002	12	40	74	50	1097,75	33,13	0,66	4	100
% Germinación transcurridas 3/4 partes del experimento (8º día)	**D75**	2001	75	98	70	60,40	968,42	31,12	0,52	4	100
		2002	16	40	74	51,41	1054,98	32,48	0,63	4	100
Nº semillas germinadas 5º día /nº semillas total germinadas	**R50**	2001	52,6	100	70	87,18	379,05	19,47	0,22	0	100
		2002	75	100	74	87,49	432,76	20,80	0,24	11,1	100
Nº semillas germinadas 8º día /nº semillas total germinadas	**R75**	2001	98,2	100	70	94,35	233,09	15,27	0,16	11,1	100
		2002	100	100	74	93,27	223,28	14,94	0,16	44,4	100
% Germinación total	**%germ**	2000 a	88	95	69	71,25	633,31	25,17	0,35	0	100
		2000 b	50	96	70	71,80	618,74	24,88	0,35	0	100
		2001	76	98	70	62,17	913,01	30,22	0,49	4	100
		2002	16	40	74	56,40	961,00	31	0,55	8	100

[1] Nº de líneas analizadas

[2] Desviación estándar

[3] Coeficiente de variación

4.3.2.- Correlación entre caracteres

La correlación entre los datos obtenidos para todos los caracteres durante los diferentes años en la población de LDHs se expone en la (**Tabla 4.6**).

Tabla 4.6: Valores de correlación entre añosde características de morfología floral y germinación entre años.

Carácter	Años	Coeficiente de correlación	
Dcor	2001 2002	0.428	**
Npet	2001 2002	0.532	**
Nsep	2001 2002	0.599	**
LogPel	2001 2002	0.672	**
PbPel	2001 2002	0.715	**
Dnspel	2001 2002	0.337	**
Lgov	2001 2002	0.358	**
Dov	2001 2002	0.529	**
L/d ov	2001 2002	0.412	**
Pflor	2001 2002	0.487	**
D50	2001 2002	0.089	ns
D75	2001 2002	0.059	ns
R50	2001 2002	0.319	**
R75	2001 2002	0.273	*
%germ	2000a 2000b	0.277	*
%germ	2000a 2001	0.425	**
%germ	2000a 2002	0.133	ns
%germ	2000b 2001	0.600	**
%germ	2000b 2002	-0.039	ns
% germ	2001 2002	-0.112	ns

****, *:** valor de la correlación significativamente diferente de cero a nivel 0.01 y 0.05 respectivamente.
ns: No significativo.

Se observaron valores altamente significativos (P=0.01) para todos los caracteres de morfología floral, siendo la correlación significativa más alta entre la densidad de pelo (0.715) y la menor la del número de pelos (0.337). Para los caracteres relacionados con la germinación de las LDHs los valores más significativos fueron para D50, R50, D75 en los años 2001-02 y porcentaje de germinación en los años 2000 (a y b)-01. Para los caracteres R75 y porcentaje de germinación, entre los dos experimentos del año 2000, la correlación fue poco significativa. El porcentaje de germinación del año 2002 no presentó correlación significativa con ningún ensayo anterior.

Se estudió la correlación en el mismo año entre caracteres de morfología de flor, de fruto y pubescencia del ovario (**Tabla 4.7**). Longitud de ovario y fruto y la relación longitud /diámetro mostraron una correlación positiva y fueron altamente significativos con un 0.333 y 0.638 respectivamente. La correlación entre diámetro de ovario y fruto dio valores positivos pero poco significativos (0.216) y la correlación entre peso de flor y fruto no fue significativa. La pubescencia del ovario y la densidad de pelo presentaron una correlación altamente significativa y negativa.

Tabla 4.7: Valores de correlación de los datos de diferentes características de morfología floral y fruto obtenidos el mismo año (2002).

Carácter	Coeficiente de correlación	
Logov 02 / Lgfrut 02	0,333	**
Dov 02 / Dmfrut 02	0,216	*
L/dov 02 / L/dfrut 02	0,638	**
Pflor 02 / Pfrut 02	0.1038	ns
Pbov01/ Dnpel01	-0.68	**
Pbov02/ Dnpel02	-0.37	**

****, *:** valor de la correlación significativamente diferente de cero a nivel 0-05 y 0.01 respectivamente.
ns: No significativo.

4.3.3.- Localización y caracterización de QTLs

A continuación se describen los QTLs identificados para los caracteres estudiados, su localización y posición en el mapa aparecen representados en la **Figura 4.13**. Los QTLs se nombran con la abreviatura del carácter, el número de grupo de ligamiento donde se localizan y el número de QTL dentro de ese grupo de ligamiento. Se estimó el efecto aditivo, que si era positivo indicaba que el alelo de PI 161375 aumentaba el carácter y un efecto aditivo negativo que lo disminuía, es decir, que el alelo de T111 aumentaba el carácter.

4.3.3.1- Características de morfología floral:

Se identificaron 38 QTLs, con una media de 3 QTLs para cada carácter, que fueron identificados siguiendo los criterios definidos en el **Apartado 3.6.3**. Para el carácter de exerción del pistilo no se detectó ningún QTL. A continuación se detallan los QTLs localizados para cada carácter, los datos de estos QTLs aparecen resumidos en la **Tabla 4.8**. Así mismo, en el **Anexo 2** se presentan los resultados gráficos del análisis de QTLs por Composite Interval Mapping con el programa Windows QTL Cartographer 2.0.

Diámetro de corola:

Este carácter se estudió en los dos años que se hizo el ensayo (2001-02), se detectaron 2 QTLs con valores superiores al umbral obtenido tras el estudio por permutaciones LOD= 2.55 y LOD =2.75 para los años 2001-02 respectivamente.

dc3.1: localizado entre los marcadores MC311 y TJ38, explicó un 26,8% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo negativo. Este QTL fue detectado el año 2001 con un LOD=4.8 mientras que tras el análisis de los datos del año 2002 se observó en esta zona un pico con un LOD 1.93.

dc7.1: localizado entre los marcadores CMTC47 y CM98, explicó un 31,6% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo. Este QTL fue identificado el año 2002 con un LOD=5.83 y en el año 2001 se detectó con un LOD= 2.1.

Además de estos dos QTLs, en el año 2002, se observó otro posible QTL, *dc1.1*, con un LOD=2.6, entre los marcadores MC11 y CMAG59, presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 11.49% de la variación fenotípica.

Número de pétalos:

Se detectaron dos QTLs para el carácter de número de pétalos, con valores superiores a los umbrales obtenidos tras el análisis de permutaciones, LOD= 2.7 y LOD= 2.59 para los años 2001-02 respectivamente:

np9.1: se detectó el año 2001, entre CSWCT01 y CMGA172, con un LOD=4.02, explicó un 15.28% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

np11.1: se detectó en los dos años en que se realizó el ensayo (2001-02), con un LOD= 5.06 y 7.7 respectivamente. Este QTL se localizó entre los marcadores Carp, MC132 y MC320, explicó un 20.09% y un 37.05% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

Número de sépalos:

Para el carácter número de sépalos, se identificaron 3 QTLs, los cuales fueron detectados el año 2001 con LOD = 2.47 como umbral. Los tres QTLs identificados fueron:

ns2.1: detectado con un LOD= 5.70 entre los marcadores MC54 y NR5b, con un efecto aditivo positivo y explicó 26.81% de la varianza fenotípica.

ns11.1: detectado con un LOD= 5.70, situándose entre los marcadores Carp y MC132, presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 26.84% de la varianza fenotípica. En el año 2002 se localizó en esta misma zona, con un LOD = 2.53, cercano al valor umbral establecido por permutaciones (LOD = 2.55), este QTL explicó un 11.17% de la varianza fenotípica.

ns11.2: se detectó el año 2001, entre los marcadores MC320 y NR14, con un LOD=2.61, explicó un porcentaje de varianza fenotípica de 11.17% y presentó un efecto aditivo negativo.

Longitud de pelo:

Se detectaron 3 QTLs, con valores superiores al umbral que fue LOD= 2.58 y 2.78 para los años 2001-02 respectivamente:

lp4.1: localizado el año 2001, con un LOD= 6, entre los marcadores NR2 y CSWTA02, con un efecto aditivo negativo y el porcentaje de varianza fenotípica explicada fue del 32.7%.

lp8.1: detectado el año 2001, entre los marcadores CM149 y MC51, con un LOD = 3.09, presentó un efecto aditivo positivo y el porcentaje de varianza fenotípica que explicó fue del 16.29%.

lp10.1: En el año 2002, con un LOD= 3.67, se identificó entre los marcadores NR79 y CM122 un QTL que presentó un efecto aditivo positivo y que explicó 18.42% de la varianza fenotípica.

Pubescencia del ovario:

Se identificaron 3 QTLs, superiores a los valores umbral, LOD= 2.73 y 2.63 respectivamente para los años 2001-02:

pb3.1: se identificó el año 2001 con un LOD=2.76, entre los marcadores NR21 y CM139, con un efecto aditivo negativo y explicó un 13.1% de la varianza fenotípica.

pb4.1: Se identificó en los años 2001-02 con un LOD=3.61-6.13 respectivamente, localizándose entre los marcadores NR2 y CSWTA02, explicó un porcentaje de la varianza fenotípica de un 35% y 19% y presentó un efecto aditivo positivo.

pb8.1: Este QTL se identificó el año 2001 con LOD =3.9, localizándose entre los marcadores MC51 y CMGA108, presentó un efecto aditivo positivo y explico un 20.9% de la varianza fenotípica

Con un LOD menor, entre el valor umbral y dos (LOD= 2.5) se identificó en el año 2002 otro posible QTL para este carácter: *pb9.1*, situado entre los marcadores CSWCT01 y CMGA172, con un efecto aditivo negativo y que explicó un 12.6% de la variación fenotípica.

Densidad de pelos:

Para la densidad de pelos (número de pelos en 0.2mm) se identificaron cuatro QTLs con un LOD mayor que el del valor umbral (2.74 y 2.5):

dspel1.1: se localizó el año 2001, situándose entre los marcadores MC356 y MC11, con un LOD= 4.63, explicó un 22.5% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

dspel1.2: en este mismo cromosoma se identificó otro QTL, el año 2001 (LOD=3.58), entre los marcadores CMACC146 y CMAG59, con un efecto aditivo negativo y que explicó un porcentaje de varianza fenotípica del 16.4%.

dspel9.1: el año 2001 fue detectado en el cromosoma 9 otro QTL, con LOD=4.06, que se encontraba situado entre los marcadores CSWCT01 y CMGA172. Este QTL explicó un 20% de la varianza fenotípica y mostró un efecto aditivo positivo.

dspel12.1: se localizó en el año 2002 con un LOD = 2.62, entre los marcadores MC8 y NR41, que explicó un 16.72% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

Longitud del ovario:

Se localizó un QTL con valor superior a los umbrales establecidos (LOD= 2.52 y 2.73):

lov7.1: Este QTL se localizó, con un LOD= 2.83 y 2.48 los años 2001 y 2002, entre los marcadores CM98 y MC325, con un efecto aditivo positivo y explicó un porcentaje de varianza fenotípica del 16% y 14% respectivamente.

Así mismo, se localizó un posible QTL el año 2002 con un LOD inferior al umbral:

lov1.1: detectado con un LOD=2.48, entre los marcadores MC68 y MC356, con un efecto aditivo positivo y explicó un 13,29% de la variación fenotípica.

Diámetro del ovario:

Para este carácter se identificaron 3 QTLs con un LOD superior al valor umbral obtenido por permutaciones (LOD = 2.6 para el año 2001 y LOD =2.7 para el 2002):

dov1.1: localizado el año 2001 con un LOD=3.11, situándose entre los marcadores TJ3 y MC68. Este QTL presentó un efecto aditivo negativo y explicó un 15 % de la varianza fenotípica.

dov8.1: localizado el año 2001 con un LOD =3.85, entre los marcadores CM149 y CMGA108, explicó un 15 % de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

dov11.1: localizado el año 2002, LOD=8.45, en el intervalo entre los marcadores Carp y MC132. Este QTL presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 38% de la varianza fenotípica.

Se identificaron cuatro posibles QTLs con valores ligeramente inferiores al umbral:

dov1.2: en el año 2001 se localizó con un LOD= 2.4, entre los marcadores CMAT141 y MC138 que explicó un 10.35% y presentó un efecto aditivo negativo.

dov5.1: el año 2001 se localizó con un LOD =2.4 entre los marcadores CMTC60 y CSWCT180. Este QTL presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 13.05% de la variación fenotípica.

dov7.1: el año 2002 se localizó con un LOD= 2.3, entre los marcadores CMTC47 y CM98, con un efecto aditivo positivo y explicó un 7,7% de la varianza fenotípica.

dov9.1: se identificó el año 2002 con un LOD=2.5, entre los marcadores CMGA172 y MC112, con un efecto aditivo negativo y explicó un 8.52% de la variación fenotípica.

Relación longitud/ diámetro de ovario:

En el carácter de forma del ovario, el estudio de la relación longitud/ diámetro resulta mucho más informativa que estos dos caracteres por separado. Así, tras el análisis de esta relación se detectaron, con valores superiores al umbral (LOD= 2.84 y 2.77 para los años 2001-2002), 2 QTLs:

ldov1.1: En los años 2001 y 2002 con un LOD =3.24 y 3.39 respectivamente, se localizó entre los marcadores MC356 y MC208 y explicó un 17% y 12% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

ldov11.1: El año 2002, con un LOD=5.27, localizado entre los marcadores Carp y MC132, con un efecto aditivo negativo y explicó un porcentaje de la varianza fenotípica del 22%.

ldov6.1: se situó entre los marcadores NR53 y CSWCT11 y fue identificado los años 2001 y 2002 con un LOD de 2.28 y 2.6 respectivamente, valor inferior al umbral, con efecto aditivo negativo y explicó un 10.27% y 9.95% de la varianza fenotípica.

Peso flor:

Para este carácter se identificó un QTL, *pflor8.1*, localizado el año 2001 con un LOD =2.34 (superior al valor umbral LOD=2.33), con un efecto aditivo positivo y que explicó un 14% de la varianza fenotípica. Este QTL se entre los marcadores MC273 y MC248.

Así mismo se detectaron otros 2 posibles QTLs implicados en el peso de la flor con un LOD más bajo al de los valores umbral obtenidos tras el análisis por permutaciones (LOD= 2.33 y 2.69 respectivamente para los años 2001-2002):

pflor7.1: localizado, el año 2002, entre los marcadores CM91 y MC325 con un LOD=2.5, con un efecto aditivo positivo y explicó un 10.85% de la varianza fenotípica.

pflor11.1: se detectó el año 2002 con un QTL con LOD=2.5, situado entre los marcadores Carp y MC132 que presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 13.68% de la varianza fenotípica.

Nº estambres:

Para este carácter sólo se tienen datos del año 2002, con ellos se pudieron identificar 2 QTLs con un superior al umbral (LOD=2.5):

nest9.1: Se localizó entre los marcadores MC112 y CM101B, con un LOD = 2.97, presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 8% de la varianza fenotípica.

nest11.1: se situó entre los marcadores MC132 y X15, con un LOD=3.41, presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 11% de la varianza fenotípica.

Densidad de estambres:

El carácter de densidad de estambres se analizó únicamente en el año 2002, con los datos obtenidos se pudo identificar 2 QTLs, con un superior al umbral (LOD= 2.53):

dest8.1: presentó un efecto aditivo negativo y explicó un 12% de la varianza fenotípica, se situó entre los marcadores TJ24 y MC233, con un LOD=2.52.

dest12.1:se identificó con un LOD=2.90, exhibió un efecto aditivo positivo, el porcentaje de varianza fenotípica explicado fue del 15 % y se situó entre los marcadores NR50 y NR18.

Exerción del pistilo:

No se detectaron QTLs para este carácter.

Tabla 4.8: Características de los QTLs identificados para los caracteres de morfología floral analizados. En la tabla se indican el nombre adjudicado a cada QTL, el año en que fueron identificados, su posición en el mapa de ligamiento, el LOD, el efecto aditivo (positivo indica que el alelo del PI aumenta el caracter y negativo que lo disminuye) y el porcentaje de variación fenotípica explicada.

Carácter	QTL	Año	Posición	Umbral	LOD	a	R^2
Dcor	*dc1.1*	2002	MC11-CMAG59	2,75	2,6	1,47	0,11
	dc3.1	2001	MC311-TJ38	2,55	4,8	-3,16	0,27
	dc7.1	2001	CMTC47-CM98	2,55	2,1	-1,9	0,09
		2002	CMTC47-CM98	2,75	5,83	-2,93	0,32
Npet	*np9.1*	2001	CSWCT01-CMGA172	2,7	4,02	0,25	0,15
	np11.1	2001	Carp-MC320	2,7	5,06	0,27	0,2
		2002	Carp-MC320	2,59	7,7	0,38	0,16
Nsep	*ns2.1*	2001	MC54-NR5b	2,47	5,7	-0,31	0,27
	ns11.1	2001	Carp-MC132	2,47	5,7	0,3	0,27
		2002	Carp-MC132	2,55	2,53	5,56	0,11
	ns11.2	2001	MC320-NR14	2,47	2,61	-0,19	0,11
LongPel	*lp4.1*	2001	NR3-CSWTA02	2,58	6	-0,47	0,33
	lp8.1	2001	CM149-MC51	2,58	3,09	0,33	0,16
	lp10.1	2002	NR79-CM122	2,78	3,67	-0,44	0,18
Pbov	*pb3.1*	2001	NR21-CM139	2,73	2,76	-0,54	0,13
	pb4.1	2001	NR3-CSWTA02	2,73	3,61	-0,4	0,19
		2002	NR3-CSWTA02	2,56	6,13	-0,53	0,36
	pb8.1	2001	MC51-CMGA108	2,73	3,9	0,44	0,21
	pb9.1	2002	CSWCT01-CMGA172	2,63	2,5	-0,33	0,13
Dspel	*dspel1.1*	2001	MC356-MC11	2,74	4,63	1,68	0,22
	dspel1.2	2001	CMACC146-CMGA59	2,74	3,58	-1,12	0,16
	dspel9.1	2001	CSWCT01-CMGA172	2,74	4,06	1,14	0,2
	dspel12.1	2002	MC8-NR41	2,5	2,62	0,45	0,16
Lgov	*lov1.1*	2002	MC68-MC356	2,73	2,48	1,58	0,13
	lov7.1	2001	CM98-MC325	2,52	2,83	1,55	0,16
		2002	CMTC47-CM91	2,73	2,48	1,36	0,14
Dov	*dov1.1*	2001	TJ3-MC68	2,6	3,11	-0,69	0,15
	dov1.2	2001	CMAT141-MC138	2,6	2,4	-0,56	0,1
	dov5.1	2001	NR12-CSWCT18	2,6	2,4	0,62	0,13
	dov7.1	2002	CMTC47-CM98	2,7	2,3	0,39	0,07
	dov8.1	2001	CM149-CMGA108	2,6	3,85	0,8	0,17
	dov9.1	2002	CMGA172-MC112	2,7	2,5	-0,41	0,09
	dov11.1	2002	Carp-MC132	2,7	3,11	0,93	0,38
L/dov	*ldov1.1*	2001	MC356-MC208	2,84	3,24	0,27	0,18
		2002	MC356-MC208	2,77	3,39	0,15	0,12
	ldov6.1	2001	NR53-CSWT11	2,84	2,28	-0,27	0,1
		2002	NR53-CSWT11	2,77	2,6	-0,13	0,1
	ldov11.1	2002	Carp-MC132	2,77	5,27	-1,96	0,22
Pflor	*pflor7.1*	2002	CM91-MC325	2,69	2,5	0,11	0,11
	pflor8.1	2001	CMGA108-MC273	2,33	2,34	0,15	0,15
	pflor11.1	2002	Carp-MC132	2,69	2,5	0,09	0,67
Nest	*nest9.1*	2002	MC112-CMTA134a	2,5	2,97	0,3	0,08
	nest11.1	2002	MC132-X15	2,5	3,41	0,13	0,14
Dnsestb	*dest8.1*	2002	TJ24-MC273	2,53	2,52	-0,24	0,12
	dest12.1	2002	NR50-MC69	2,53	2,9	0,26	0,15

4.3.3.2.- Características de morfología de fruto

Se identificaron 5 QTLs para los caracteres de morfología de fruto, que fueron identificados siguiendo los criterios definidos anteriormente en el **Apartado 3.6.3**. El análisis de estos caracteres solo se realizó el año 2002. A continuación se detallan los QTLs localizados para cada carácter, los datos de estos QTLs aparecen resumidos en la **Tabla 4.9**. Así mismo, en el **Anexo 2** se presentan los resultados gráficos del análisis de QTLs por Composite Interval Mapping con el programa Windows QTL Cartographer 2.0.

Longitud del fruto:

No se detectaron QTLs para este carácter.

Diámetro del fruto:

Se detectó un QTL para este carácter:

dfrut 5.1, con un LOD= 3.08 superior al umbral (LOD=2.5), se localizó entre los marcadores CSWT18B y NR89, presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 19.71 de la variación fenotípica observada.

Relación Longitud/ diámetro de fruto:

Para este carácter se detectó un QTL con un valor superior al umbral establecido por permutaciones (LOD =2.66),:

lfrut 9.1: Se localizó entre los marcadores CSWCT01 y CMGA172, con un LOD=2.93 presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 16.67% de la variación fenotípica observada.

Se localizó así mismo un posible QTL:

lfrut 11.1: Localizado entre los marcadores MC330 y NR14, con un LOD= 2.39, presentó un efecto aditivo negativo y explicó un 12.2% de la variación fenotípica.

Peso fruto:

Se identificaron 2 QTLs con valores superiores al umbral (LOD = 2.06).

pfrut5.1: Este QTL se localizó, con un LOD=2.55, entre los marcadores CSWT18B y TJ23, explicó un 12.77% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

pfrut11.1: Se localizó, con un LOD= 2.53, entre los marcadores Carp y MC132, explicó un 13.70% de la variación fenotípica observada y presentó un efecto aditivo positivo.

Tabla 4.9: Características de los QTLs identificados para los caracteres de morfología de fruto analizados. En la tabla se indican el nombre adjudicado a cada QTL, el año en que fueron identificados, su posición en el mapa de ligamiento, el LOD, el efecto aditivo (positivo indica que el alelo del PI aumenta el caracter y negativo que lo disminuye) y el porcentaje de variación fenotípica explicada.

Carácter	QTL	Año	Posición	LOD umbral	LOD	a	R2
Dmfrut	*dm5.1*	2002	CSWT18B-TJ23	2,5	3,08	0,864	0,19
L/Dfrut	*ldfrut9.1*	2002	CSWCT01-CMGA172	2,66	2,93	0,162	0,17
	ldfrut11.1	2002	MC330-NR14	2,66	2,39	-0,137	0,12
Pfrut	*pfrut5.1*	2002	CSWT18B-TJ23	2,06	2,55	171,4	0,13
	pfrut11.1	2002	Carp-MC132	2,06	2,53	185,6	0,14

4.3.3.3.- Caracteres relacionados con la germinación

Se identificaron 23 QTLs con un LOD superior al valor umbral obtenido tras el análisis por permutaciones, con una media de 4 QTLs para cada carácter. Con un LOD menor que el umbral pero superior a 2 se encontraron 5 posibles QTLs. A continuación se detallan los QTLs localizados para cada carácter, datos que aparecen resumidos en la **Tabla 4.10**. Así mismo, en el **Anexo 2** se presentan los resultados gráficos del análisis de QTLs por Composite Interval Mapping con el programa Windows QTL Cartographer 2.0.

D50 (% germinación a mitad del experimento, 5º día):

Para este carácter se identificaron 4 QTLs. Los valores umbrales que se definieron tras el análisis de permutaciones fueron LOD= 2.63 y 2.66 para los años 2001-02 respectivamente:

d50gm5.1: fue identificado en el año 2001, con un LOD =2.63, localizándose entre los marcadores CMGA104 y MC93, explicó un 10.65% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo negativo.

d50gm8.1: Así mismo, el año 2001, se identificó, con un LOD=2.64, un QTL que se situó entre los marcadores CMGA108 y MC273. El porcentaje de varianza fenotípica explicada por este QTL fue del 13.03% y presentó un efecto aditivo negativo.

d50gm11.1: Se identificó el año 2001, con un LOD=2.68, entre los marcadores MC320 y TJ29, explicó un 9.9% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo negativo.

d50gm12.1: Se identificó el año 2002, con un LOD=3.28, entre los marcadores NR94 y NR18, explicó un 15.8% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo negativo.

Se identificaron, además, 2 posibles QTLs con un valor de LOD entre el umbral obtenido por el análisis de permutaciones y 2:

d50gm2.1: Se identificó el año 2001, con un LOD=2.1, entre los marcadores NR66a y MC54, con un efecto aditivo negativo y explicó un 9.3% de la varianza fenotípica.

d50gm4.1: Identificado los dos años, 2001-02, con un LOD= 2.29 y 2.09 respectivamente. Se localizó entre los marcadores NR52-NR35 el año 2001 y MC4-NR2 el año 2002, explicó un 8,4 y 9,7% de la variación fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

D75 (% germinación transcurridas ¾ partes del experimento, 8º día):

Para este carácter se detectaron 4 QTLs con valores superiores al umbral (LOD=2.61 y 2.84 para 2001-02 respectivamente):

d75gm2.1: El año 2001 entre los marcadores CSWCT10 y MC54, con un LOD= 3.26, con un efecto aditivo negativo y explicó un 12% de la variación fenotípica

d75gm5.1: El año 2001 se identificó, con un LOD=3.69, un QTL que presentó un efecto aditivo negativo y que explicó un 16.02% de la varianza fenotípica. Este QTL se localizó entre los marcadores CMGA104 y MC93.

d75gm11.1: Se identificó eL año 2001, con LOD=3.33, localizándose entre los marcadores MC320 y TJ29. El efecto aditivo que presentó fue negativo y explicó el 12.95% de la varianza fenotípica.

d75gm12.1: Se localizó el año 2002, con un LOD= 3.2, situándose entre los marcadores NR94 y MC69 con un efecto aditivo negativo y explicó un 14.88% de la varianza fenotípica. En el año 2001, se observó un pico en esta misma zona.

Así mismo, con un LOD inferior al umbral pero superior a 2, se localizaron 2 posibles QTLs:

d75gm4.1: Se identificó el año 2002, con un LOD= 2.06, entre los marcadores MC4-NR2. El efecto aditivo que presentó fue positivo y explicó un 9,7% de la variación fenotípica. En el año 2001 se observó, así mismo, un pico en este cromosoma entre los marcadores NR52-NR35 con un LOD=1.7.

d75gm8.1: Así mismo, el año 2001, con un LOD=1.9, se identificó otro posible QTL que se situó entre los marcadores CMGA108 y MC273, explicó un 9.3% de la varianza fenotípica y presentó un efecto aditivo positivo.

De los 6 QTLs identificados para este carácter, 5 coinciden con los detectados para el carácter anterior, D50.

R50 (Nº de semillas germinadas el 5º día/ Nº de semillas total germinadas):

Se identificaron un total de 3 QTLs para este carácter, dos a partir de los datos del año 2001, con un LOD=2.53, y uno con los del 2002, con un LOD= 2.49:

r50gm1.1: Se localizó el año 2001, con un LOD=3.26, entre los marcadores TJ2 y MC78 con un efecto aditivo negativo y explicó un 14.2% de la varianza fenotípica.

r50gm6.1: Se identificó a partir de los datos obtenidos el año 2002, con un LOD= 2.65, entre los marcadores MC134 y MC309 con un efecto aditivo negativo y explicó un 11.74% de la varianza fenotípica.

r50gm10.1: Se localizó el año 2001, con un LOD= 2.56, entre los marcadores MC344 y CM131, presentando un efecto aditivo positivo y explicó un 12.39 de la varianza fenotípica.

R75 (Nº de semillas germinadas el 8º día/ Nº de semillas total germinadas):

Se pudieron identificar un total de 4 QTLs con valores superiores a los valores umbrales (LOD=2.34 y 2.48 para los años 2001 y 2002 respectivamente).

r75gm3.1: Se identificó el año 2002, con un LOD=2.48, entre los marcadores MC311 y NR21 con un efecto aditivo negativo y explicó un porcentaje de la variación fenotípica del 12.42%. El año 2001, con un LOD inferior al umbral, LOD=2.17, se identificó en este mismo cromosoma un posible QTL que explicó un 10.8% de la varianza fenotípica.

r75gm8.1: Se identificó el año 2001, LOD=2.58, entre los marcadores MC340 y CM149, presentó un efecto aditivo negativo y explicó un 12.29% de la variación fenotípica.

r75gm8.2: Se localizó el año, 2001, con un LOD= 2.78, entre los marcadores CMGA108 y MC273 con un efecto aditivo positivo y explicó un 14.49% de la variación fenotípica.

r75gm10.1: Se identificó el año 2001, con un LOD=2.79, entre los marcadores MC344 y MC284 con un efecto aditivo positivo y explicó un 12.42% de la variación fenotípica.

Con un LOD= 2.29, inferior al umbral, se identificó el año 2002 un posible QTL, *r75gm6.1*, entre los marcadores MC134 y MC309, con un efecto aditivo negativo y explicó un 10% de la varianza fenotípica.

Porcentaje de germinación:

El estudio del porcentaje de germinación se realizó los años 2000 (con dos ensayos), 2001 y 2002, identificándose años 8 QTLs asociados al porcentaje de germinación con valores superiores a los umbrales (LOD= 2.58, 2.54, 2.73, 2.75 respectivamente para los 4 ensayos).

gm2.1: Se identificó el año 2001, con un LOD=3.46, entre los marcadores NR66a y MC54, presentó un efecto aditivo negativo y explicó un 12.26% de la variación fenotípica.

gm3.1: Se identificó el año 2002, con un LOD= 3.06, entre los marcadores CM139 y CMGA15, con un efecto aditivo positivo y explicó un 15.98% de la varianza fenotípica.

gm4.1: Se localizó los años 2000a, 2000b y 2001, con un LOD= 2.77, 4.44 y 2,7 respectivamente, la posición en el grupo de ligamiento fue muy parecida en los tres años en el intervalo entre los marcadores MC233 y MC4, lo que hace suponer que posiblemente se trate del mismo y las diferencias observadas se deban al error experimental. Este QTL presentó un efecto aditivo positivo y explicó un 11.45%, 19.25 % y 7.9% de la varianza fenotípica para cada año.

gm5.1: Se identificó, el año 2001, con un LOD= 4.22 entre los marcadores CMGA104 y MC93 con un efecto aditivo negativo y explicando un 16.84% de la variación fenotípica.

gm8.1: Se identificó el año 2001 con un LOD= 2.76, entre los marcadores CMGA108 y MC273, presentó efecto aditivo positivo y explicó un 13.30% de la variación fenotípica.

gm10.1: Se localizó el año 2000a, con un LOD= 3.88, entre los marcadores MC344 y NR79, presentó un efecto aditivo negativo y explicó un 18.98% de la variación fenotípica.

gm11.1: Se localizó el año 2000a, con un LOD= 4.7, entre los marcadores NR14 y NR33, con un efecto aditivo positivo y explicó un 21.2% de la variación fenotípica.

gm11.2: Se localizó el año 2001, con un LOD= 3.04, entre los marcadores MC320 y TJ29, con un efecto aditivo negativo y explicó un 10.63% de la variación fenotípica.

Tabla 4.10: Características de los QTLs identificados para los caracteres relacionados con la germinación analizados. En la tabla se indican el nombre adjudicado a cada QTL, el año en que fueron identificados, su posición en el mapa de ligamiento, el LOD, el efecto aditivo (positivo indica que el alelo del PI161375 aumenta el caracter y negativo que lo disminuye) y el porcentaje de variación fenotípica explicada.

Carácter[1]	QTL	Año	Posición	LOD umbral	LOD	a	R2
D50	*d50gm2.1*	2001	TJ30-MC54	2,63	2,1	-9,57	0,09
	d50gm4.1	2001	NR52-NR35	2,63	2,29	9,11	0,08
		2002	MC256-MC4	2,66	2,09	14,67	0,16
	d50gm5.1	2001	CMGA104-MC93	2,63	2,63	-10,22	0,11
	d50gm8.1	2001	CMGA108-MC273	2,63	2,64	-11,44	0,13
	d50gm11.1	2001	MC320-TJ29	2,63	2,68	-9,79	0,1
	d50gm12.1	2002	NR94-MC69	2,66	3,28	-14,62	0,15
D75	*d75gm2.1*	2001	CSWCT10-MC54	2,61	3,26	-11,12	0,12
	d75gm4.1	2002	MC256-MC4	2,84	2,06	10,8	0,09
	d75gm5.1	2001	CMGA104-MC93	2,61	3,69	-12,59	0,16
	d75gm8.1	2001	CMGA108-MC273	2,61	1,9	9,77	0,09
	d75gm11.1	2001	MC320-TJ29	2,61	3,33	-11,49	0,13
	d75gm12.1	2002	NR94-MC69	2,84	3,2	-14,2	0,15
R50	*r50gm1.1*	2001	TJ2-MC78	2,58	3,01	-8,17	0,14
	r50gm6.1	2002	MG1-MC309	2,49	2,65	-7,63	0,12
	r50gm10.1	2001	MC344-CM131	2,58	2,56	10,52	0,12
R75	*r75gm3.1*	2002	MC311-NR21	2,48	2,44	-5,76	0,12
	r75gm6.1	2002	MG1-MC309	2,48	2,29	-5,14	0,1
	r75gm8.1	2001	MC340-CM149	2,34	2,58	-5,7	0,12
	r75gm8.2	2001	CMGA108-MC273	2,34	2,78	6,4	0,14
	r75gm10.1	2001	MC344-MC284	2,34	2,79	5,72	0,12
% germ	*gm2.1*	2001	TJ30-MC54	2,73	3,46	-10,92	0,12
	gm3.1	2002	CM139-CMGA15	2,75	3,06	13,19	0,16
	gm4.1	2000a	MC233-TJ37	2,58	2,77	9,06	0,11
		2000b	NR52-MC256	2,54	4,44	11,64	0,19
		2001	TJ37-MC4	2,73	2,7	8,63	0,17
	gm5.1	2001	CMGA104-MC93	2,73	4,22	-12,52	0,16
	gm8.1	2001	CMGA108-MC273	2,73	2,76	11,4	0,13
	gm10.1	2000a	MC344-NR79	2,58	3,88	-17,14	0,18
	gm11.1	2001	MC320-TJ29	2,73	3,04	-9,97	0,1
	gm11.2	2000a	NR14-NR33	2,58	4,7	11,85	0,21

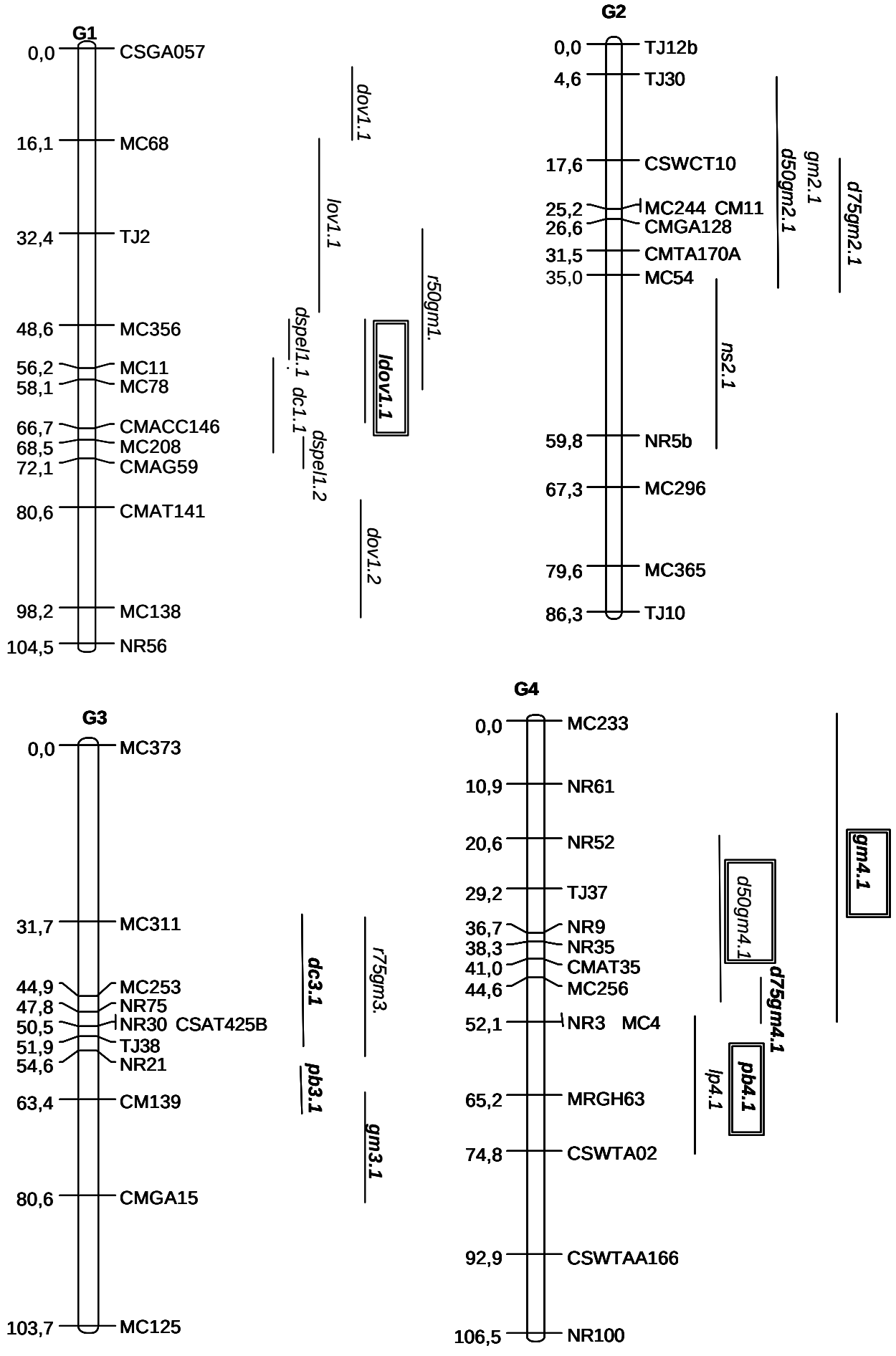
[1] **d50**=%germinación a mitad del experimento (5º día)

d75=%germinación transcurridas 3/4 partes del experimento (8º día)

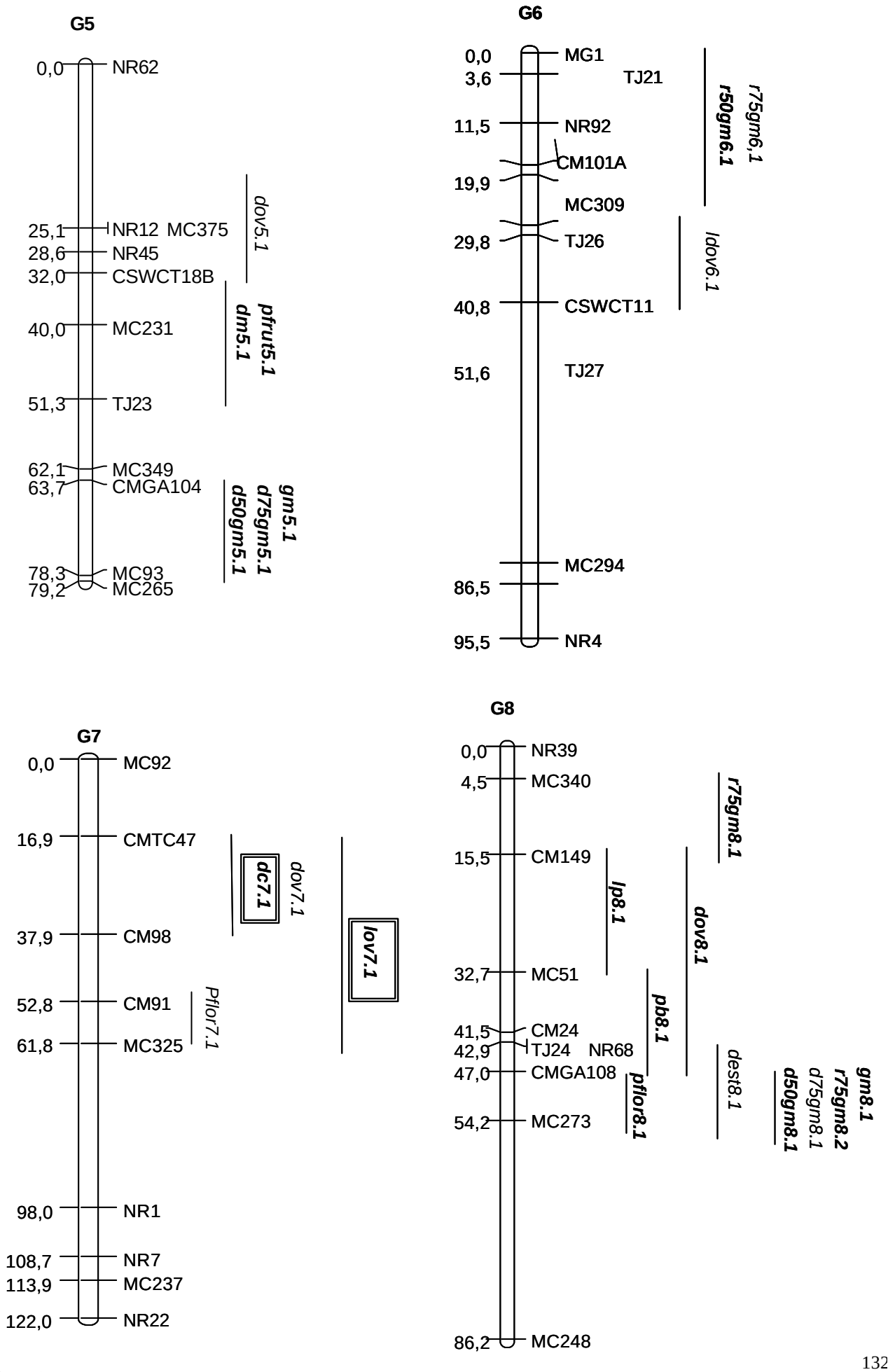
R50=Nº de semillas germinadas el 5ºdía / Nº de semillas total germinadas

R75=Nº de semillas germinadas el 8ºdía / Nº de semillas total germinadas

%germ= porcentaje de germinación


G1
0,0 CSGA057
16,1 MC68
32,4 TJ2
48,6 MC356
56,2 MC11
58,1 MC78
66,7 CMACC146
68,5 MC208
72,1 CMAG59
80,6 CMAT141
98,2 MC138
104,5 NR56
dov1.1
lov1.1
r50gm1.
ldov1.1
dspel1.1
dc1.1
dspel1.2
dov1.2
G2
0,0 TJ12b
4,6 TJ30
17,6 CSWCT10
25,2 MC244 CM11
26,6 CMGA128
31,5 CMTA170A
35,0 MC54
59,8 NR5b
67,3 MC296
79,6 MC365
86,3 TJ10
gm2.1
d50gm2.1
d75gm2.1
ns2.1
G3
0,0 MC373
31,7 MC311
44,9 MC253
47,8 NR75
50,5 NR30 CSAT425B
51,9 TJ38
54,6 NR21
63,4 CM139
80,6 CMGA15
103,7 MC125
dc3.1
pb3.1
r75gm3.
gm3.1
G4
0,0 MC233
10,9 NR61
20,6 NR52
29,2 TJ37
36,7 NR9
38,3 NR35
41,0 CMAT35
44,6 MC256
52,1 NR3 MC4
65,2 MRGH63
74,8 CSWTA02
92,9 CSWTAA166
106,5 NR100
gm4.1
d50gm4.1
d75gm4.1
pb4.1
lp4.1

(Fig 4.13)


G5
0,0 NR62
25,1 NR12 MC375
28,6 NR45
32,0 CSWCT18B
40,0 MC231
51,3 TJ23
62,1 MC349
63,7 CMGA104
78,3 MC93
79,2 MC265
dov5.1
pfrut5.1
dm5.1
gm5.1
d75gm5.1
d50gm5.1
G6
0,0 MG1
3,6 TJ21
11,5 NR92
CM101A
19,9
MC309
29,8 TJ26
40,8 CSWCT11
51,6 TJ27
MC294
86,5
95,5 NR4
r75gm6.1
r50gm6.1
ldov6.1
G7
0,0 MC92
16,9 CMTC47
37,9 CM98
52,8 CM91
61,8 MC325
98,0 NR1
108,7 NR7
113,9 MC237
122,0 NR22
dc7.1
dov7.1
lov7.1
Pflor7.1
G8
0,0 NR39
4,5 MC340
15,5 CM149
32,7 MC51
41,5 CM24
42,9 TJ24 NR68
47,0 CMGA108
54,2 MC273
86,2 MC248
r75gm8.1
lp8.1
dov8.1
pb8.1
pflor8.1
dest8.1
gm8.1
r75gm8.2
d75gm8.1
d50gm8.1

(Fig 4.13)

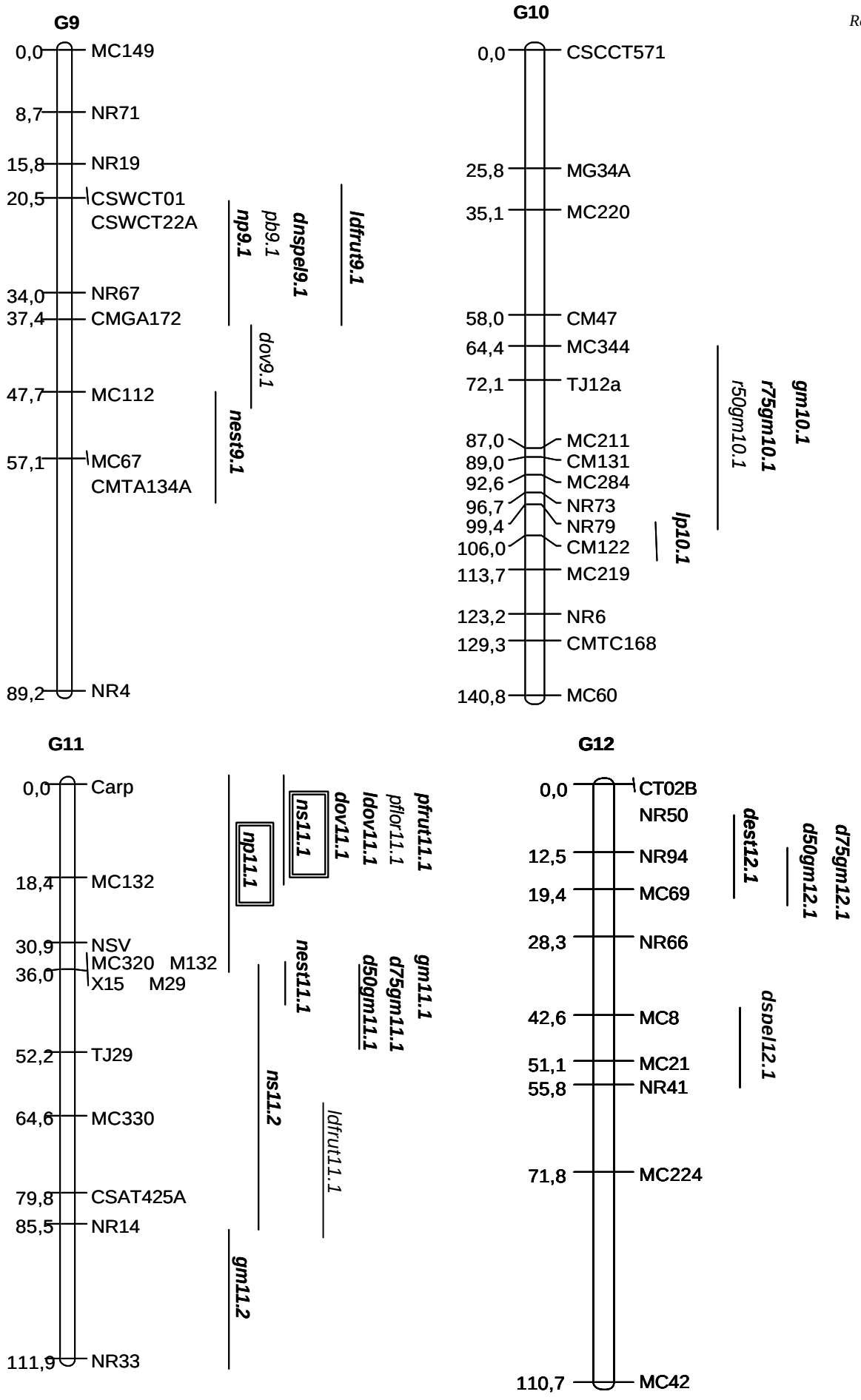


Figura 4.13: Localización de los QTLs identificados para todos los caracteres estudiados, en el mapa de la población de LDHs generada a partir del cruce PI 161375xT111. Las barras verticales a la derecha del mapa indican el intervalo de confianza para cada QTL. En negrita se marcan los QTLs identificados con un LOD superior al umbral y en un recuadro aparecen los QTLs detectados los dos años en que se realizaron los ensayos.

5.- DISCUSIÓN

5. – Discusión

5.1.- Respuesta a la partenogénesis de diferentes variedades de melón

Como en la gran mayoría de los procesos de cultivo *in vitro*, el genotipo es un factor determinante de la eficiencia en la producción de LDHs partenogénicas. La respuesta a la partenogénesis inducida *in situ* por polen irradiado esta influenciada por el genotipo, variedades de diferente subespecie y variedades dentro de la misma subespecie, presentan distintos comportamientos. Se definieron 3 pasos limitantes en la obtención de haploides: Eficacia en la obtención de embriones a partir de semilla de frutos partenocárpicos (EC/500S), supervivencia de los embriones en el proceso de cultivo *in vitro* (ER/EC) y obtención de líneas diploidizadas, perpetuadas por semilla a partir de estos embriones (LDHs/ER).

La obtención de embriones a partir de frutos partenogénicos presentó alta variabilidad entre genotipos pertenecientes al mismo tipo varietal, pero no se observaron diferencias apreciables entre las respuestas medias de cada tipo varietal. Por ejemplo en tipos Piel de sapo las respuestas variaron entre los 0.37 embriones/ 500S obtenidos para el híbrido M75C164 y los 2.95 embriones/ 500S obtenidos a partir del híbrido MC75C257, y en los melones pertenecientes al tipo Galia los valores observados oscilaron entre los 0.15 del híbrido M93 y los 2.78 del híbrido M92. Por otro lado, la media obtenida para los del tipo Piel de Sapo fue de 1.71 embriones por 500 semillas abierta y para los de tipo Galia de 1.68 embriones, lo que ilustra la similitud en el parámetro EC/ 500S entre los tipos varietales distintos, y las diferencias entre genotipos del mismo tipo varietal. Esta comparación sólo pudo realizarse en los melones de la subespecie *melo* ya que únicamente se estudió un genotipo de las variedades pertenecientes a la subespecie *agrestis*, observándose una gran variabilidad especialmente en los genotipos del grupo *inodorus*. Esta diferencia del número de embriones puede deberse a la diferente capacidad partenogénica de los mismos, ya que las condiciones en las que se realizó el experimento fueron iguales para todos los genotipos analizados. La influencia del genotipo en la respuesta partenogénica había sido ya descrita por Sauton, (1988b) que observó diferencias en el número de embriones obtenidos dentro de melones pertenecientes al mismo tipo varietal, sin embargo, el estudio se realizó utilizando únicamente melones pertenecientes a la subespecie *melo* por lo que no pudo compararse con el comportamiento de otros tipos varietales.

La supervivencia de los embriones durante el proceso de cultivo *in vitro* (ER/EC) también fue variable dependiendo de los genotipos. En algunos casos el número de embriones quedó reducido

a más de la mitad mientras que en otros la supervivencia fue de hasta el 90-100%. Este porcentaje no está relacionado con el número de embriones obtenido a partir del fruto partenocárpico, ya que algunos de los híbridos que mejores resultados habían tenido en el primer paso, como el M75C257 de tipo Piel de Sapo o PI 161375, obtuvieron un porcentaje de supervivencia del 0.38% y 0.24% respectivamente. El número de embriones que sobrevivieron a la fase de cultivo *in vitro* fue sin embargo superior a los obtenidos en otros trabajos donde el porcentaje de embriones que se desarrollaron a plantas haploides diploidizadas no supero el 29% (Cuny *et al*., 1992). Este mismo autor sugiere que las anormalidades en el desarrollo pueden deberse a la expresión de alelos recesivos deletéreos que se encuentran en homocigosis en las plantas haploides.

La obtención de líneas dihaploides con semilla a partir de los embriones supervivientes (LDHs/ER) es el último de los pasos limitantes del proceso. No todas las líneas diploidizadas *in vitro* y que se aclimataron se fijaron como líneas dihaploides con semilla. En este paso algunos genotipos perdieron más de la mitad de las líneas. Por ejemplo del híbrido 6 x T111, se fijaron un 36% de las líneas obtenidas, del RQ200 X T111 un 37%, y de la variedad catalogada como Agrestis un 33%. Estos resultados son debidos al tratamiento *in vitro* con colchicina, a la baja fertilidad en invernadero de la líneas producidas, o por problemas de germinación de la semilla por efectos letales o subletales de alelos recesivos (Pauls, 1996).

Ninguna de las variedades estudiadas presentó una respuesta homogénea para todos los pasos del proceso de obtención de haploides, siendo en general diferente el paso limitante para cada genotipo. Así, algunos presentaron una respuesta buena en la obtención de embriones a partir de frutos partenocárpicos (6 x T111, RQ200 X T111, M75C167, M75C257, M91, M92, Agrestis y PI 161375), viéndose reducido el número de LDHs obtenidas en los otros pasos del proceso. Con otros genotipos a partir de un menor número de embriones se obtuvieron aproximadamente el mismo número de LDHs ya que presentaron mayor eficiencia en otros pasos, por ejemplo la línea T111 o el híbrido M81B520.

La respuesta del híbrido PI 161375 x T111 se mantuvo dentro del rango de los dos parentales en prácticamente todos los pasos del proceso de obtención de LDHs, obteniéndose en general valores más cercanos al parental masculino T111. Para este parental el paso limitante fue la supervivencia una vez que ya se ha terminado el proceso *in vitro* (LDHs/ER), mientras que el PI 161375 sufrió una mayor disminución de embriones viables durante el proceso de cultivo *in vitro* (ER/EC). La única diferencia del híbrido PI 161375 x T111 con los dos parentales fue en la obtención de líneas dihaploides con semilla viable a partir de los embriones supervivientes (LDHs/ER), en el híbrido el valor fue menor (0.24 LDH/ 500S) que para el PI 161375 (0.28 LDH/ 500S) o el T111 (0.43 LDH /500S).

En otros trabajos realizados en melón, se observó una respuesta partenogénica más parecida a la del parental femenino en la obtención de plantas haploides (Cuny *et al*., 1993). Sin embargo, con los resultados obtenidos en nuestro trabajo parece que el parental masculino, T111, juega también un papel importante, ya que aunque la tasa de LDHs obtenidas por cada 500 semillas sea más cercana a PI 161375, en pasos intermedios del proceso la respuesta es muy parecida a T111. Esto sugiere que alelos de ambos parentales podrían intervenir en la respuesta a las distintas etapas del proceso.

El número de embriones partenogénicos obtenidos en este trabajo fue algo más bajo a lo observado en otros trabajos, donde el porcentaje de embriones por semillas abiertas osciló entre el 3.4% (Cuny *et al*. 1992, 1993) y 2,5% (Sauton y Dumas de Vaulx, 1987). La diferencia encontrada podría ser debida a las condiciones de cultivo de las plantas donantes y al efecto del genotipo, ya que los genotipos utilizados en la obtención de plantas haploides, pertenecientes al tipo varietal Vendredais, no son iguales a los empleados en este trabajo. El número final de plantas obtenidas únicamente se menciona en el trabajo de Lotfi *et al.*, (2003), donde el porcentaje de plantas obtenidas por embriones osciló entre 61-75%, valores cercanos a los obtenidos en nuestro trabajo (ER/EC). Sin embargo, en el proceso de autofecundación observaron que este porcentaje disminuyó, señalando que solamente algunas planta produjeron semilla viable, sin mencionar el porcentaje final de plantas haploides diploidizadas obtenidas (LDHs/ER).

Los genotipos estudiados se comportaron de forma diferente en cada uno de los pasos limitantes, por lo cual a la hora de emplear este método de obtención de haploides en melón habrá que investigar los pasos limitantes que sean específicos de cada genotipo.

5.2. - Generación de una población de líneas dihaploides

En el proceso de generación de una población de líneas dihaploides uno de los pasos más importantes es la selección de las líneas que formaran parte de la población con el propósito de mantener únicamente aquellos individuos que sean verdaderamente dihaploides y fértiles. Para ello se llevan a cabo distintos procesos de selección, tanto a nivel morfológico como a nivel molecular, que se realizan en diferentes etapas del proceso de obtención de plantas dihaploides.

El primer proceso de selección que se realizó fue la selección de embriones partenogénicos en función de las características morfológicas del embrión. Los resultados obtenidos mostraron que esta selección fue buena y puede hacerse una buena elección de embriones partenogénicos basada en su morfología. Únicamente 2 de los embriones rescatados el año 97-98 y 9 de los rescatados en el año 98-99, que ya habían sido calificados por su morfología como de posible

origen zigótico, resultaron no ser partenogénicos. Esta eficiencia de la selección ya había sido señalada por Sauton y Dumas de Vaulx (1987), en cuyo estudio los embriones rescatados de acuerdo a su morfología fueron confirmados como de origen partenogénico.

La segunda selección se realizó en función del nivel de ploidía o número cromosómico, que esta relacionado con el contenido de ADN determinado por citometría de flujo. Las líneas que dieron un nivel de ploidía 2n, sin fase haploide visible, fueron posteriormente clasificadas como heterocigotas mediante marcadores moleculares codominantes. Mientras que las de un nivel de ploidía n resultaron ser homocigotas. Se observaron plantas que siendo haploides en la mayoría de sus células, presentaron niveles de ploidía 2n en algunas de ellas, lo que se achacó a la realización del análisis después del tratamiento de duplicación cromosómica. Sin embargo, las plantas haploides antes del tratamiento con colchicina también presentan un pequeño porcentaje de células diploides que se corresponden a las células en fase de división mitótica. La aparición de dos líneas con solo fase 2n antes del tratamiento con colchicina y homocigotas (1131 y 2007) demuestra la existencia de duplicación cromosómica espontánea, fenómeno que ocurre con muy baja frecuencia (2 / 95 plantas). La duplicación espontánea en cucurbitáceas también ha sido señalada por otros autores con valores variables, desde 1 planta/ 44 embriones haploides en melón (Sauton 1988 a) hasta 2 plantas/ 13 embriones en pepino (Niemirowicz-Szczytt y Dumas de Vaulx, 1989), datos que coinciden con los obtenidos en este estudio donde 1 planta de 42 embriones haploides en el año 98-99 y 1 de 11 en el año 2000-01 presentaron duplicación espontánea del número cromosómico, en el año 97-98 ninguna de las plantas haploides obtenidas presentó duplicación espontánea.

La utilización de marcadores codominantes (RFLPs y SSRs) como herramienta de selección de líneas homocigotas permite la identificación de las plantas dihaploides, verificando el origen de las líneas (Rivard *et al*., 1989). Tras el análisis de las líneas con marcadores moleculares no apareció ninguna banda perteneciente al donador de polen, descartando una contaminación producida por polen de ese origen. A partir del segundo año, aparecieron individuos heterocigotos que no lo habían sido tras el análisis del material proveniente de las líneas aclimatadas. Este hecho podría ser debido a errores en la manipulación del material vegetal durante el proceso de autofecundación. La aparición de individuos heterocigotos una vez finalizado el proceso *in vitro* de obtención de haploides fue observado anteriormente por otros autores, sugiriendo que la aparición de heterocigotos es más probable que se produzca en los procesos realizados en el invernadero (errores de muestreo o de autofecundación) que durante los procesos de cultivo *in vitro* (Murigneux *et al*., 1993).

La fertilidad de las líneas dihaploides obtenidas del híbrido PI 161375 x T111 fue buena. Se obtuvieron semillas viables de un 86.3% de las líneas autofecundadas. Este resultado es muy

superior al obtenido con otros híbridos, como los que se utilizaron en el primer ensayo para estudiar la respuesta partenogénica de diferentes genotipos de melón, pudiendo deberse a que las líneas de estos híbridos solo fueron autofecundadas un año. El hecho de que existan líneas no fértiles puede ser consecuencia de la interacción de los dos genomas parentales y expresión de alelos deletéreos que afecten negativamente en la fecundidad o en el vigor de las plantas y que influyen en el proceso de obtención de semilla (Cuny *et al*., 1992). Así mismo pueden afectar otros factores externos derivados de la manipulación del cultivo (cantidad de polen, climatología, nutrición y sanidad vegetal, etc.). Para minimizar estos efectos se realizaron dos autofecundaciones en años consecutivos.

5.3.- Polimorfismo entre parentales con marcadores SSR

El nivel de polimorfismo a nivel de ADN dentro del melón es relativamente bajo (Neuhausen, 1992). A pesar de ello, la elección de parentales alejados genéticamente (Garcia-Mas *et al*., 2000) permitió la detección de un nivel de polimorfismo del 44.63%. Este valor se acerca mucho al encontrado en otros estudios realizados con estos mismos parentales, donde el nivel de polimorfismo encontrado fue del 51% analizando 100 microsatélites (Oliver, 2001).

El origen de los microsatélites analizados en este trabajo no parece influir en el grado de polimorfismo obtenido ya que se observaron valores similares tanto en los microsatélites generados a partir de ADN genómico de melón como en los obtenidos a partir de EST, con un nivel de polimorfismo del 43.8% y 46.9% respectivamente. Sin embargo en otros trabajos se ha descrito la influencia del origen de los microsatélites, presentando en general mayor grado de polimorfismo los SSRs derivados de bibliotecas genómicas que los derivados de ESTs, tanto en melón (Danin-Poleg *et al*., 2001) como en otros cultivos como el arroz (Cho *et al*., 2000; Temnykh *et al*., 2000). A pesar de que en general los microsatélites generados a partir de ESTs presentan menor grado de polimorfismo, su utilización como fuente de nuevos microsatélites ofrece ciertas ventajas, ya que son secuencias que se expresan pudiendo utilizarse como fuente de genes candidatos implicados en la determinación de importantes caracteres agronómicos y pueden ser transferidos, con mayor éxito que los derivados de bibliotecas genómicas, a otras especies al estar flanqueados por secuencias más conservadas que el DNA genómico intergenérico (Holton *et al.*, 2002).

5.4.- Generación de mapa genético

El mapa de ligamiento construido a partir de una población de LDHs de melón incluyó 169 marcadores. Estos marcadores se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento, que se corresponde con el número de cromosomas básico de esta especie, la densidad del mapa fue de 7.6cM/ marcador. La distancia aproximada del genoma que se cubrió fue de 1289.6cM, la mayoría de los grupos de ligamiento cubrieron una distancia aproximada de 100cM cada uno. La distancia total del genoma puede ser estimada siguiendo el método descrito por Kennard *et al*. (1994) basada en los análisis meióticos. En el caso del melón, utilizando una media de 1.97quiasmas por cromosoma, se estimaría el tamaño del genoma en 1182cM (1.97 quiasmas /cromosoma x 12 cromosomas x 50cM/quiasma). Este valor estimado del tamaño del genoma es cercano al obtenido en este trabajo, así mismo, esta distancia es cercana a los 1197cM que cubrían el mapa de la F_2 realizada a partir del cruce PI 161375 x T111 (Oliver *et al*., 2001). Aunque el mapa de la F_2 se encuentre más saturado, con una densidad de 3-3.4 cM por marcador, la distancia cubierta del genoma de melón es similar en ambos mapas, lo que indica que se ha cubierto todo el genoma. Otros trabajos en esta especie, estiman la distancia del genoma de melón entre 1080cM y 2400cM (Périn *et al*., 2002a), la distancia obtenida con el mapa generado con la población de LDHs esta dentro de este rango.

Muchos de los marcadores analizados fueron idénticos en los mapas de la F_2 y la población de LDHs, el orden de los mismos, se mantuvo, confirmándose, por tanto, que el orden de los marcadores se mantiene de unas poblaciones a otras como ya había sido descrito por otros autores (Baudracco-Arnas y Pitrat 1996, Danin-Poleg *et al*., 2000, Danin-Poleg *et al.*, 2002). Así mismo, fue posible mapar los marcadores de tipo microsatélite provenientes de secuencias de pepino en la población de LDHs de melón, el hecho de poder utilizar marcadores de especies próximas ya había sido descrito (Katzir *et al*., 1996) aumentando el número de marcadores disponible.

Los dos mapas de melón obtenidos a partir de la población F_2 y la de LDHs, se integraron, generándose un mapa en el cual se localizaron 463 marcadores (132 dominantes y 331 codominantes) que se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento con una media de 38.5 marcadores por grupo. Este mapa cubrió una distancia del genoma de 1099cM, valor similar al obtenido en el mapa de la población de LDHs. La densidad del mapa integrado obtenido fue de 2.38cM por marcador, un mapa más saturado que el de la F_2.

En el mapa integrado los marcadores conservaron el mismo orden y la distancia del genoma cubierta fue similar a la de los mapas individuales, lo que confirma la validez de este mapa como

mapa de referencia en melón. Así mismo, este mapa presenta ciertas ventajas ya que posee un alto grado de saturación y el hecho de emplear una población de líneas LDHs permitirá añadir nuevos marcadores al mapa.

Además, se generó un mapa genético empleando 331 marcadores de calidad, de tipo codominante, con una densidad media de 3.02cM/ marcador. Se cubrió una distancia del genoma de 1061cM, valor cercano al obtenido en el mapa integrado anterior lo que indica que se cubrió todo el genoma utilizando marcadores de tipo codominante.

La importancia de emplear este tipo de marcadores de alta calidad y que el orden de los mismos se mantenga en ambas poblaciones hace posible transferirlo y emplearlo en cualquier cruzamiento que se realice en melón. Así mismo, estos marcadores poseen mayor calidad comparándolos con los dominantes, ya que permite diferenciar los dos parentales de los individuos heterocigotos lo que los hace mas eficientes en el análisis de pedigríes, en la transferencia de los marcadores a otras poblaciones de la misma especie o especies próximas y en la selección asistida por marcadores (MAS). Las características de los marcadores codominantes son importantes para la generación de mapas genéticos y permite una mejor estimación de QTLs implicados en caracteres agronómicos.

Anteriores trabajos en esta misma especie habían dado lugar a la obtención de mapas genéticos con mayor o menor grado de saturación pero donde la mayoría de los marcadores posicionados presentaban un tipo de herencia dominante. En la generación del primer mapa de melón publicado se emplearon 104 marcadores, de los cuales únicamente 35 (34 RFLPs y 1 isoenzima) eran marcadores codominantes (Baudracco-Arnas y Pitrat, 1996). En 1997, (Wang *et al*., 1997) publicaron otro mapa con 204 marcadores de los cuales sólo 1 era codominante. Uno de los últimos mapas publicados (Périn *et al*., 2002a), cuenta con un alto número de marcadores, lo que se traduce en un alto grado de saturación, sin embargo, los marcadores son en su mayoría de tipo AFLPs y ISSRs, de tipo dominante. Por ello, es de gran importancia el mapa generado en este trabajo ya que presenta un alto grado de saturación cubriendo el genoma completo empleando únicamente marcadores codominantes. Así mismo, el carácter inmortal de la población de LDHs facilitará el posicionamiento en el mapa de nuevos marcadores que se vayan generando, lo que supone una gran ventaja frente al trabajo con otro tipo de poblaciones como la F_2.

5.5.- Segregación de las frecuencias alélicas

Alteraciones de las frecuencias alélicas esperadas en poblaciones de líneas dihaploides han sido descritas por varios autores (Chani *et al*., 2002; Guiderdoni, 1991; Manninen, 2000; Thompson *et al*., 1991; Zivy *et al*., 1992). Esta alteración parece ser más frecuente en poblaciones de líneas dihaploides que en poblaciones de tipo SSD (Single seed descent) o F_2 (Foisset y Delourme, 1996). La presión de selección que se ejerce durante el proceso de cultivo *in vitro* podría ser la causa principal de la aparición de alteraciones en las frecuencias alélicas. La segregación distorsionada en poblaciones LDHs ha sido atribuida a la selección favorable de alelos que benefician la regeneración durante el proceso de cultivo *in vitro* o a la selección negativa en contra de alelos letales o semiletales (Murigneux *et al*., 1993; Pauls, 1996; Rivard *et al*., 1989). Normalmente, los alelos del parental que presenta mejor respuesta a la obtención de haploides suelen presentarse en mayor frecuencia (Manninen, 2000). Las zonas distorsionadas podrían contener genes implicados en la eficiencia de producción de estas líneas (Foisset y Delourme, 1996; Manninen, 2000; Rivard *et al*., 1989). Por tanto, las 6 zonas en las que se observó distorsión de las frecuencias alélicas en este trabajo, serían candidatas de incluir genes que son seleccionados en los procesos de generación de LDHs.

En melón han sido descritas desviaciones en la segregación alélica de poblaciones de tipo F_2 (Baudracco-Arnas y Pitrat, 1996; Oliver *et al*., 2001) y retrocruzamiento (Wang *et al.*, 1997). El porcentaje de marcadores que presentaron una distribución distorsionada en nuestro trabajo (17.75%) fue mayor que el observado en otros estudios realizados en melón 12% (Baudracco-Arnas y Pitrat, 1996), 14% (Wang *et al.*, 1997), 5.8% (Oliver *et al*., 2001), lo que confirma que en melón el mayor número de procesos selectivos que se producen durante el proceso de obtención de plantas haploides aumenta la probabilidad de que aparezcan distorsiones en las frecuencias alélicas (Chani *et al*., 2002).

Las alteraciones en las frecuencias alélicas observadas en el cromosoma 1 de la población de LDHs fueron observadas también por Oliver *et al*., (2001), en la población F_2. Esta distorsión aparece cubriendo la misma región del grupo de ligamiento en ambas poblaciones e interviniendo los mismos loci en muchos casos. En el caso de la población F_2, se apreció un exceso del genotipo de la clase heterocigota lo que sugiere que es debida a una selección post-zigótica. En la población de LDHs se apreció un aumento de los alelos del parental PI161375. En este tipo de población no existe interacción entre gametos parentales lo que indica que la distorsión de las frecuencias alélicas no es debida a una selección post-zigótica y probablemente se deba a la selección producida durante el proceso de obtención de líneas dihaploides.

En el cromosoma 3, también se observaron alteraciones de las frecuencias alélicas en ambas poblaciones, pero en el caso de la F_2, únicamente dos marcadores de herencia dominante presentaron esta distorsión, se plantea la duda de si se trata del mismo gen o genes distintos, lo que hace difícil la comparación con la distorsión observada en la población de LDHs.

Las otras cuatro zonas donde se observó una distorsión de las frecuencias alélicas presentaron una segregación favorable al alelo del parental T111, que es lo esperado, ya que es el que mostró mejor respuesta a la generación de LDHs (**Apartado 4. 1**).

En diferentes cultivos como en cebada (Graner *et al*., 1991; Manninen, 2000; Zivy *et al*., 1992), o en maíz (Bentolila *et al*., 1992; Murigneux *et al*., 1993), se ha descrito que la distorsión de las frecuencias alélicas en poblaciones de líneas dihaploides es favorable al parental que mejor respuesta presenta a la generación de LDHs. T111 fue el parental que presentó una mejor respuesta a la partenogénesis, expresada en LDHs/ 500S. Sin embargo, en algunos de los pasos limitantes definidos para el proceso de generación de LDHs, como EC/ 500S, PI 161375 presentó una mejor respuesta. La aparición de zonas distorsionadas en las que se vieron favorecidos alelos de ambos parentales podría explicar la diferente respuesta, en los pasos limitantes definidos para el proceso de generación de LDHs, que presentaron PI 161375 y T111. Estos resultados confirmarían que en el proceso de generación de una población de líneas dihaploides alelos de ambos parentales pueden aumentar la eficacia del proceso.

5.6.- Identificación de QTLs implicados en caracteres de morfología floral, morfología de fruto y germinación de las LDHs

En este estudio se identificaron un total de 71 QTLs implicados en los caracteres de morfología floral, morfología de fruto y germinación estudiados. Para todos los caracteres que presentaron una distribución continua se detectó más de un QTL, lo que confirma su control genético poligénico. Se identificaron 38 QTLs implicados en los 13 caracteres de morfología floral, con una media de 3 QTLs por carácter, entre 2 y 6 QTLs para cada carácter, que explicaron entre el 8% y el 67% de la varianza fenotípica total. Se identificaron 5 QTLs implicados en los 4 caracteres de morfología de fruto, entre 1 y 2 para cada carácter con una media de 1.6, que explicaron entre el 12 y el 19% de la variación fenotípica observada. Así mismo, se identificaron 28 QTLs para los 5 caracteres relacionados con la germinación, con una media de 5.6 QTLs por carácter y identificándose entre 3 y 8 QTLs por carácter. Estos QTLs explicaron entre un 8% y 21% de la variación fenotípica total. La media de QTLs obtenida para cada carácter está dentro de los rangos descritos en trabajos previos en plantas (Kearsey y Farquhar, 1998). El hecho de

trabajar con una población de tamaño reducido (66-70 individuos) limita la detección de QTLs a aquellos que presentan efectos más importantes (Tanksley, 1993). Tal como predice la teoría, prácticamente todos los QTLs detectados mostraron efectos importantes, R^2>10, sin embargo, únicamente algunos de ellos, generalmente implicados en características de morfología floral, pueden clasificarse como QTLs mayores con R^2>25. La varianza no explicada podría deberse a QTLs de efecto menor, no detectados en el experimento actual, o a la varianza ambiental (Kearsey y Farquhar, 1998).

Algunos de los caracteres presentaron segregaciones transgresivas cuya aparición puede deberse a distintas causas, como a la epistasia, que en este trabajo no ha sido estudiada, a la dominancia, que no se presenta en una población LDH o a la complementación de alelos de los parentales de la población. De este modo, únicamente podemos estudiar si la complementación alélica puede explicar las segregaciones transgresivas observadas (de Vicente y Tanksley, 1993). Excepto para los caracteres longitud de ovario, peso flor, número de estambres y peso fruto, se identificaron QTLs con efectos aditivos complementarios en los caracteres que presentaron segregación transgresiva, por lo que en estos caracteres la complementación explicaría al menos en parte la segregación transgresiva. En un total de 17 de los 71 QTLs identificados (24%) se observó que el alelo de PI 161375 produjo un efecto contrario al esperado. La mayoría de los QTLs en los que se observó este efecto pertenecían a los caracteres relacionados con la germinación, identificándose para estos caracteres 10 QTLs, *d50gm4.1*, *d75gm4.1*, *d75 gm8.1*, *r50gm10.1*, *r75gm8.2*, *r75gm10.1*, *gm3.1*, *gm4.1*, *gm8.1* y *gm11.1*, en los que el alelo de PI 161375 aumentaba la tasa de germinación. El hecho de detectar QTLs en los que alelos de PI 161375 aumentan la tasa de germinación, a pesar que esta línea presenta una germinación más irregular y menor que T111, puede tener importantes consecuencias desde el punto de vista agronómico, ya que pueden ayudar a conocer más sobre el control del proceso de germinación y facilitar la germinación de genotipos en los que la tasa de germinación no sea muy elevada. En otros trabajos de QTLs relacionados con la germinación se había encontrado también un alto porcentaje de QTLs con efectos contrarios a los esperados (Foodlad *et al*., 1998). Así, los análisis de QTLs permiten la identificación de genes con efectos deseables en genotipos que tienen un comportamiento agronómico general inferior y por tanto, el descubrimiento de variabilidad genética oculta (Bernacchi *et al*., 1998).

Los 71 QTLs identificados se distribuyeron por todo el genoma. Comparando QTLs identificados en este trabajo para los caracteres relacionados con la forma del ovario con los resultados obtenidos en otros trabajos, se comprobó que 9 de los QTLs, un 47%, (*dov1.1*, *dov1.2*, *ldov1.1*, *ldov6.1*, *lov7.1*, *dov8.1*, *dov9.1*, *dov11.1*, *ldov11.1*) coincidieron con los descritos por Périn *et al*., (2002b), lo que confirma la validez de los QTLs detectados. Así mismo, comparando los

QTLs relacionados con la forma del fruto, se observó que 3 de los QTLs identificados, un 14%, en la población de LDHs coincidieron con los descritos por Périn *et al*., (2002b) y el 50% coincidieron con los identificados en otros estudios de QTLs realizados con la población de LDHs y la F_2 (Monforte *et al*., 2003b).

En algunos grupos de ligamiento se localizó mas de un QTL, llegando en algunos casos a posicionarse en las mismas zonas. La co-localización de estos QTLs podría indicar que en la misma zona del grupo de ligamiento existen genes ligados o que existen genes con efecto pleiotrópico en diferentes caracteres (Mackay, 2001). Así, para todos los QTLs relacionados con la forma del ovario identificados en este trabajo, en la población de LDHs, se encontraron QTLs localizados en posiciones similares y que presentaron el mismo efecto aditivo relacionados con la forma de fruto en el estudio realizado por Monforte *et al.,* (2003b). La correlación altamente significativa observada entre los caracteres Ldov/ Ldfruto en la población de LDHs y la detección de estos QTLs, localizados en las mismas posiciones, indicando que el control de la forma de fruto se produce en etapas tempranas del desarrollo, como ya se había descrito en otros trabajos en melón (Périn *et al*., 2002b) y otras especies vegetales como tomate (Grandillo *et al.*, 1999).

En la población de LDHs, se localizaron, así mismo, QTLs involucrados en caracteres de morfología floral y de fruto en posiciones idénticas o muy cercanas. En el grupo de ligamiento 1 se localizaron en la misma zona QTLs para los caracteres longitud, diámetro y longitud diámetro de ovario. En el grupo 5 se localizaron en la misma zona QTLs para los caracteres de diámetro de ovario, diámetro fruto y peso fruto que podría explicar la correlación encontrada entre los dos primeros caracteres. Así mismo, en el grupo 11, se identificaron en la zona cercana al marcador Carp que es el responsable del carácter numero de carpelos, varios QTLs, con una media de R^2>20: *np11.1*, *ns11.1*, *dov11.1*, *ldov11.1*, *pflor11.1* y *pflrut11.1*. El número de carpelos varía entre 5 en PI 161375 y 3 en T111, parece lógico pensar que esta variación pueda afectar a otros caracteres de morfología de flor y fruto, por efectos pleitrópicos (Périn *et al*., 2002b). De esta forma, Carp puede ser el gen candidato de los QTLs de morfología localizados en esta zona.

Los caracteres pubescencia y la longitud de pelo del ovario presentaron una alta correlación negativa, las líneas que presentan un aspecto lanoso poseen menor número de pelos, es decir, pelos dispersos, que sería el caso de T111. De este modo, PI 161375 que a simple vista presenta un aspecto lampiño posee mayor densidad de pelos, pelos cortos y compactos. La distribución de los QTLs relacionados con la pubescencia del ovario sugiere que este carácter posee una herencia poligénica. Así mismo, se observaron QTLs para estos caracteres con efectos aditivos contrarios, lo que indica que alelos de ambos parentales aumentan el carácter. En los grupos 4 y 8 se co-localizaron QTLs relacionados con la pubescencia y la longitud de pelo del ovario y en el grupo 9 se localizaron QTLs relacionados con la pubescencia del ovario y la densidad de pelos, lo

que podría indicar la existencia de genes que están involucrados en los diferentes componentes de la pubescencia. De esta forma, se podrá desglosar este carácter en dos componentes, longitud y densidad de pelo, en cuya expresión intervendrían QTLs diferentes.

Se ha empleado el carácter de pubescencia del ovario, en estudios taxonómicos del género *C.melo*, para diferenciar entre las dos subespecies, *melo* (ovario pubescente) y *agrestis* (no pubescente), aunque se observó la aparición de individuos con características intermedias (Stepanski *et al*., 1999). Además, en otros trabajos se encontraron algunos genotipos silvestres (normalmente clasificados como *agrestis*), de la especie *C. melo*, con un aspecto lanoso, como es el caso de la accesión Ames24297, clasificado anteriormente como *C. trygonus* y cuyo origen esta en Pakistán y de la accesión PI 435284 de origen en Iraq, clasificado anteriormente como *C. callosus* (Monforte AJ; Comunicación personal). Estas diferencias de pubescencia entre las variedades orientales y occidentales, no se deberían a la mutación en un solo gen sino a cambios en varios genes. La aparición de genotipos diferentes para este carácter probablemente tenga su principal causa en la deriva genética en los procesos de diversificación que condujeron a los cultivares Orientales y Occidentales (Monforte *et al*., 2003a).

En el estudio de las diferentes etapas del proceso de germinación se co-localizaron QTLs para D50, D75, y % germinación en los grupos de ligamiento G2, G4, G5, G8, G10, G11 y G12, lo que indica que el control de la germinación se produce en las primeras etapas del proceso, expresándose los genes implicados en la germinación en estas etapas, produciéndose poca o nula nueva expresión de genes en el resto del proceso de germinación.

Únicamente 9 de los 71 QTLs fueron detectados los dos años. Estos QTLs correspondían a los caracteres: Dcor, Npet, Nsep, Pbov, Lgov y L/dov, lo que indicaría la alta heredabilidad del carácter y explicaría la alta correlación significativa que presentaron entre años. La correlación entre años de los caracteres fue significativa en todos los casos excepto cuando se compararon los caracteres de germinación del año 2002, año cuyos datos no coincidieron con el resto de años. El bajo número de QTLs comunes identificados también podría deberse a la baja potencia para la detección de QTLs en esta población.

La baja correlación encontrada entre otros caracteres analizados los 2 años, como por ejemplo R75 y porcentaje de germinación, podría explicarse por la existencia de una importante interacción con el ambiente (GxE). La causa de esta interacción no es controlable en este trabajo, excepto para los caracteres relacionados con la germinación donde la interacción GxE es especialmente destacable. Las condiciones en las que se realizaron los ensayos fueron diferentes, los años 2000 y 2001 la germinación se realizó con luz y el año 2002 en oscuridad. La correlación de los caracteres de germinación entre los años 2000-01 y el 2002 fue poco significativa o no significativa como es el caso del % de germinación, además, no se detectaron QTLs comunes con

el año 2002, lo que confirma la alta interacción G x E. El año 2002 la germinación se realizó en oscuridad, obteniéndose resultados más bajos que en los años anteriores lo que podría indicar un importante papel de la luz en el proceso de germinación. La luz parece intervenir en la activación de algunas de las hormonas implicadas en el inicio de la germinación (Borevitz *et al.,* 2002), lo que podría haber condicionado la germinación de algunas de las líneas de la población de LDHs el año 2002.

6.- CONCLUSIONES

6. - CONCLUSIONES:

El método de partenogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado es eficaz para la producción de líneas dihaploides en melón (*C. melo* L.). La respuesta de diferentes tipos de melón a este método varía dependiendo del genotipo y cada uno de ellos se comporta de forma diferente en las distintas etapas del proceso de obtención de plantas dihaploides. Existiendo, por tanto, pasos limitantes específicos para cada genotipo del que se generen plantas dihaploides.

Empleando el método de partenogénesis inducida *in situ* con polen irradiado, se obtuvo una población de 95 líneas dihaploides a partir del híbrido PI161375 x T111. El origen partenogénico de las 95 líneas se verificó mediante análisis del nivel de ploidía por citometría de flujo y confirmación de su homocigosis con marcadores moleculares de tipo RFLP y SSR.

A partir de esta población, se generó un mapa genético con 169 marcadores moleculares codominantes, que se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento, coincidiendo con el número de cromosomas básico de la especie. La distancia media entre marcadores fue de 7.6cM y la distancia total cubierta por los 12 grupos de ligamiento fue de 1289.6 cM. El orden de los marcadores se mantuvo en comparación con otros mapas que ya habían sido descritos.

Se integraron los mapas obtenidos en la población de LDHs y el mapa, a partir del mismo cruzamiento, de una población F_2, generándose un mapa con 463 marcadores que se distribuyeron en 12 grupos de ligamiento, con una media de 38.5 marcadores por grupo de ligamiento. La distancia media entre marcadores fue de 2.38cM y se cubrió una distancia del genoma de 1099cM.

Se generó, así mismo, un mapa integrándose el mapa de la F_2 y el mapa de la población de LDHs únicamente utilizando marcadores de tipo codominante de alta calidad. Se localizaron 331 marcadores que se distribuyeron en doce grupos de ligamiento, con un número medio de 27.6 marcadores por grupo. La densidad del mapa fue de 3.02 cM/ marcador.

La distribución alélica general observada de la población de las LDHs fue igual que la esperada 1:1. Sin embargo se observaron zonas donde las frecuencias alélicas estaban distorsionadas. La aparición de zonas con alteraciones en las frecuencias alélicas es más frecuente cuando se trabaja con poblaciones de líneas dihaploides debido al mayor número de procesos selectivos que conlleva su obtención. Se identificaron, 6 regiones candidatas a incluir genes que influyen en la respuesta a la selección durante los procesos de generación de LDHs. La aparición de zonas distorsionadas en las que se vieron favorecidos alelos de ambos parentales podría explicar la diferente respuesta de estos, en los pasos limitantes definidos para el proceso

de obtención de LDHs. Estos resultados confirmarían que en el proceso de generación de una población de líneas dihaploides alelos de ambos parentales pueden aumentar la eficacia del proceso.

Se detectaron 71 QTLs para los caracteres de morfología de flor (38 QTLs), morfología de fruto (5 QTLs) y germinación (28) estudiados, entre 1 y 8 QTLs para cada carácter. El porcentaje de variación fenotípica explicada vario entre el 8 y el 67%.

Un 24 % de los QTLs identificados mostraron un comportamiento diferente al esperado en la dirección de los efectos alélicos, la mayoría de ellos pertenecientes a los caracteres relacionados con la germinación. La aparición de zonas con segregación transgresiva podría explicarse por la complementación de QTLs con diferentes efectos.

En el grupo de ligamiento 11, en la región donde se encuentra el gen de número de carpelos se co-localizaron QTLs de caracteres relacionados con la morfología floral, que dependen del mismo proceso fisiológico, indicando que en esa zona pueden existir genes ligados que intervienen en el mismo proceso o que la expresión de estos caracteres es debida a genes con efecto pleiotrópico. La hipótesis de que se trata de un único gen el que influye en estos caracteres es la más probable.

QTLs para las diferentes etapas del proceso de germinación se localizaron en la misma posición lo que indicaría que la germinación estaría controlada desde las primeras etapas del proceso.

La correlación encontrada entre la forma de ovario y fruto y la co-localización de QTLs de flor y fruto nos indica, que en melón, este carácter está controlado desde etapas tempranas del desarrollo.

El carácter de pubescencia del ovario presenta una herencia poligénica. Así mismo, este carácter esta correlacionado negativamente con el de densidad de pelos en el ovario, de forma que el aspecto lanoso o lampiño de los ovarios de las flores de melón se debe a la distribución de los pelos (dispersos o compactos) y a la longitud (largos o cortos) más que al número de pelos que poseen.

La interacción genotipo por ambiente fue evidente sobre todo en los caracteres relacionados con la germinación, proceso que estaría influenciado por la luz. En presencia de luz la tasa de germinación aumenta.

7.- BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA:

Alpert K B, Grandillo S and Tanksley S D (1995). *fw2.2*: a major QTL controlling fruit weight is common to both red-and-green-fruited tomato species. Theor Appl Genet 91: 994-1000.

Arús P, Tanskley S D, Orton T J and Jones R A (1982). Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of Brassica oleracea. Euphytica 31: 417-428.

Álvarez J M (1997). Melones. Compendios de Horticultura 10: 25-34. Ediciones de Horticultura SL, Reus.

Baenziger P S (1996). Reflections on double haploids in plant breeding. S M Jain, S K Sopory, R E Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in Higher plants, Vol.1: 35-48.

Basten C J, Weir B S and Zeng Z B (1994). Zmap a QTL cartographer. In: Smith C, Gavora J S, Benkel Chesnais J, Fairfull W, Gibson J P, Kennedy B W, B. Burnside E B (eds) Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph, Ontario, Canada pp 65-66.

Basten C J, Weir B S and Zeng Z B (2002). QTL Cartographer, version 1.16. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Baudracco-Arnas S and Pitrat M (1996). A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. Theor Appl Genet 93: 57-64.

Bauer E, Wegen J, Schiemann A, Graner A and Ordon F (1997). Molecular mapping of novel resistance genes against Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV). Theor Appl Genet 95: 1263-1269.

Bentolila S, Hardy C, Guitton C and Freyssinet G (1992). Comparative genetic analyses of F_2 plants and anther culture derived plants of maize. Genome 35: 575-582.

Bernacchi D, Beck-Bunn T, Eshed Y, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D and Tanksley S (1998). Advanced backross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. Theor Appl Genet 97: 381-397.

Borevitz J O, Maloof J N, Lutes J, Dabi T, Redfern J L, Trainer G T, Werner J D, Asami T, Berry C C, Weigel D and Chory J (2002). Quantitative trait loci light and hormone response in two accessions of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 160: 683-696.

Bostein D, White R L, Skolnick M and Dawis R W (1980). Construction of a genetic map in man using restriction fragment legth polymorphism. American Journal of Human Genetics 32: 314-330.

Burr B and Burr A F (1991). Recombinant inbred for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. Trends in Genetics 7: 55-60.

Burr B, Burr A F, Thompson K H, Albertson M C and Stuber C W (1988). Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Genetics 118: 519-526.

Capel J, Santalla M, Ferreira J J, de Ron A M y Lozano R (2000). Selección asistida por marcadores moleculares. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez F, Carrillo J M.: 357-381.

Clulow S A, Wilkinson M J, Waugh R, Baird E, DeMaine M J and Powell W (1991). Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*-induced dihaploid potatoes. Theor Appl Genet 82: 545-551.

Cramer C S (1999). Laboratory techniques for determining ploidy in plants. Hortechnology 9: 594-596.

Cuny F, Dumas de Vaulx R, Longhi B and Siadous R (1992). Analyse des plantes de melon (*Cucumis melo* L.) issues de croisements avec du pollen irradié à différentes doses. Agronomie 12: 623-630.

Cuny F, Grotte M, Dumas de Vaulx R and Rieu A (1993). Effects of gamma irradiation of pollen on parthenogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melo* L.). Envirommental and Experimental Botany 33: 301-312.

Çaglar G and Abak K (1996). The effects of seasons and irradiation doses on haploid embryo production in cucumber (*Cucumis sativus* L.). VIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Malaga, Spain, 28-39 May: 25-30.

Chani E, Ashkenazi V, Hillel J and Veilleux E (2002). Microsatellite marker analysis of an anther-derived potato family: skewed segregation and gene-centromere mapping. Genome 45: 236-242.

Cho Y G, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch S R, Park W D, Ayres N and Cartinhour S (2000). Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (Oryza sativa L.) Theor Appl Genet 100: 713-722.

Churchill G A and Doerge R W (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138: 963-971.

Danin-Poleg Y, Reis N, Baudracco-Arnas S, Pitrat M, Staub J E, Oliver M, Arus P, de Vicente C M and Katzir N (2000). Simple Sequence Repeats in *Cucumis* mapping and map merging. Genome 43: 963-974.

Danin-Poleg Y, Reis N, Tzuri G and Katzir N (2001). Development and characterization of microsatellites markers in *Cucumis*. Theor Appl. Genet 102: 61-72.

Danin-Poleg Y, Tadmor Y, Tzuri G, Reis N, Hirschberg J and Katzir N (2002). Construction of genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. Euphytica 125: 373-384.

Devaux P (1987). Comparison of anther culture and *Hordeum bulbosum* method for the production of doubled haploid in winter barley. Plant Breeding 98: 215-219.

Devey M E, Sewell M M, Uren T L and Neale D B (1999). Comparative mapping in loblolly and radiate pine using RFLP and microsatellite markers. Theor Appl Genet 99: 656-662.

De Vicente M C and Tanksley S D (1993). QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. Genetics 134: 585-596.

Dogimont C, Leconte L, Périn C, Thabius A, Lecoq H and Pitrat M (2000) Identification of QTLs contributing to resistance to different strains of cucumber mosaic cucumovirus in melon. Acta Hort. 510: 391-398.

Dolcet-Sanjuan R, Claveria E and Huerta A (1997). Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-Effects of carbohydrate and Carbon Dioxide Enrichment. J. Amer. Soc. Hort. Sc. 122: 468-475.

Dolcet-SanJuan R, Clavería E, Llauradó M, Ortigosa A and Arús P (2001). Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) dihaploid lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. Dianthi. Acta Hort 560: 141-144.

Doyle J J and Doyle J L (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Dryanovska O A and Ilieva I N (1983). In vitro anther and ovule culture in muskmelon (*Cucumis melo* L.). C. R. Académie Bulgare des Sciences 36: 1107-1110.

Dumas de Vaulx R (1979). Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.)après pollinisation par *Cucumis ficifolius* A. Rich. C. R. Acad. Sc. Paris Serie D 289: 875-879.

El-Assal S E D, Alonso-Blanco C, Peters A J M, Raz V and Koornneef M (2001). A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of CRY2. Nature Genetics 29: 435-440.

Fahleson J, Dixelius J, Sundberg E and Glimelius K (1988). Correlation between flow cytometric determination of nuclear DNA content and chromosome number in somatic hybrids within *Brassicaceae*.

Plant Cell Reports 7: 74-77.

Falco S C and Botstein D (1983). A rapid chromosome mapping method for cloned fragments of yeast DNA. Genetics 105: 857-872

FAO (2002). Production yearbook, Rome. www.fao.org. http://apps.fao.org/

Fazio G, Staub J E and Chung S M (2002). Development and characterization of PCR markers in cucumber. J Amer Soc Hort Sci 127: 545-557.

Frary A, Nesbitt T C, Frary A, Grandillo S, Van der Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert K B and Tanksley S (2000). *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit siza. Science 289: 85-88.

Foisset N and Delourme R (1996). Segregation distorsion in androgenic plants. S M Jain, S K Sopory & R E Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in Higher plants, Vol. 2: 189-201

Foisset N, Delourme R, Lucas M-O and Renard M (1997). In vitro androgenesis and segregation distortion in *Brassica napus* L.: spontaneous versus colchicines-doubled lines. Plant Cell Reports 16: 464-468.

Foolad M R, Chen F Q and Lin G Y (1998). RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during germination in an interspecif cross of tomato. Theor Appl Genet 97: 1133-1144.

Garcia-Mas J, Graziano E, Aranzana M J, Monforte A, Oliver M, Ballester J, Viruel M A y Arus P (2001). Marcadores de ADN: Concepto, tipos, protocolos. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez F, Carrillo J M.: 93-151.

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

Gardiner S E, Bassett H C M, Madie C and Noiton D A M (1996). Isozyme, Randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD), and Restriction Fragment-length Polymorphism (RFLP) markers used to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. J Amer Soc Hort Sci 121: 996-1001.

Gardiner J M, Coe E H, Melia-Hancock S, Hoinsington D A and Chao S (1993). Development of a Core RFLP map in maize using an immortalized F2 population. Genetics 134: 917-930.

Gelderman H (1975). Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers.

I. Methods. Theor Appl Genet 46: 300-319.

Gémesné Juhász A, Venczel G and Balogh P (1997). Haploid plant induction in Zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina* Duch) and in cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines through in vitro gynogenesis. *Hort. Biotech. in vitro Cult, and Breeding. Eds, A. Altman, M Ziv.* Acta Hort 447 ISHS 447.

Grandillo S, Ku H M and Tanksley S (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. Theor Appl Genet 99: 978-987.

Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen K, Fischbeck G, Wenzel G and Herrmann R G (1991). Construction of an RFLP map of barley. Theor Appl Genet 83: 250-256.

Guiderdoni E (1991). Gametic selection in anther culture of rice (Oryza sativa L.). Theor Appl Genet 81: 406-412.

Guilford P, Prakash S, Zhu J M, Rikkerink E, Gardiner S, Basset H and Forster R (1997). Microsatellites in *Malus* x *domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theor Appl Genet 94: 249-254.

Hill M, Witsen Boer H, Zabeau M, Vos P, Kesseli R and Michelmore R (1996). PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in Lactuca spp. Theor Appl Genet 93: 1202-1210.

Holton T A, Christopher J T, McClure L, Harker N and Henry R J (2002). Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed sequences of barley and wheat. Molecular Breeding 9: 63-71.

Hu H (1996). *In vitro* induced haploids in wheat. S M Jain, S K Sopory, R E Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in Higher plants, Vol.2: 125-144.

Huang C C, Cui Y Y, Weng C R, Zabel P and Lindhout P (2000). Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene Ol-1 on chromosome 6 of tomato. Theor Appl Genet 101: 918-924.

Hunter R L and Market C L (1975). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch genes. Science 125: 1294-1295.

Jeffery C (1980). A review of the Cucurbitaceae. J Linn Soc Bot 81: 233-247.

Juenger T, Purugganan M and Mackay T F C (2000). Quantitative trait loci for floral morphology in *Arabidopsisi thaliana*. Genetics 156: 1379-1392.

Kao C-H, Zeng B-Z and Teasdale R D (1999). Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait loci. Genetics 152: 1203-1216.

Katzir N, Danin-Poleng Y, Tzuri G, Karchi Z, Lavi U and Cregan P B (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. Theor Appl Genet 93: 1282-1290.

Kearsey M J and Farquhar A G L (1998). QTL analysis in plants; where are we now? Heredity 80: 137-142.

Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A, Meglic V, Staub J E and Havey M J (1994). Linkages among RFLP, RAPD, isoenzyme, disease resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. Theor Appl Genet: 89: 42-48.

Kerje T and Grum M (2000). The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. Acta Hort. 510: 37-44.

Kim H S and Ward R W (1997). Genetic diversity in Eastern U.S soft winter wheat (*Triticum aestium* L. em. Thell.) based on RFLPs and coefficients of parentage. Theor Appl Genet 94: 472-479.

Kirkbride J H (1993). Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae). Pakway. Boone, NC.

Konieczny A and Ausubel F M (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant Journal 4: 403-410.

Khush G S and Virmani S.S. (1996). Haploids in plant breeding. S M Jain, S K Sopory, R E Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in Higher plants, Vol. 1: 11-33.

Lambody W F, Yu J, Forsline P L and Weeden N F (1996). Partitioning af allozyme diversity in wild populations for germplasm collection. Journal of the American Society for Horticultural Science 121: 982-987

Landegren U, Nilsson M and Kwok P-Y (1998). Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. Genome Research 8: 769-776.

Lander E S and Botsein D (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.

Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E and Newburg L (1987).

MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.

Le Deunff E and Sauton A (1994). Effect of parthenocarpy on ovule development in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after pollination with normal and irradiated pollen. Sex Plant Reprod 7: 221-228.

Lin J-J and Kuo J (1995). AFLP™: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. Focus 17: 52-56.

Liu J, Van Eck J, Cong B and Tanksley S D (2002). A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shape tomato fruit. PNAS 99: 13302-13306.

Lofti M, Alan A R, Henning M J, Jahn M M and Earle E D (2003). Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Reports 21: 1121-1128.

Mackay T F C (2001) The Genetic Architecture of Quantitative traits. Annu Rev Genet 35: 303-339.

Mallick M F R and Masui M (1986). Origin, distribution and taxonomy of melons. Scientia Hort 28: 251-261.

Manninen O M (2000). Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.) Theor Appl Genet 100:57-62.

MAPA (2002). Anuario de estadística agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

Maroto B J V (1989). Horticultura herbácea especial. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. Pp: 384-409.

Martín A (2002). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. En Genómica y Mejora Vegetal Ed. Mundi-Prensa: 37-63.

Memelink J, Swords K M M, Staehelin L A and Hoge H C (1994). Southern, Northern and Western blot analysis. *Plant Molecular biology manual* D1: 1-23.

Messeguer R, Viruel M A, de Vicente M C, Dettori M T and Quarta R (1993). Methods of molecular marker analysis in prunus. *First meeting of the european prunus mappong project. IRTA, Cabrils (BCN) Spain. November 15 th to 19th, 1993: 27-38*.

Michelmore R W, Paran I and Kesseli R V (1991). Identification of markers linked to disease resistance

genes in bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 9828-9832.

Monfort A, Garcia-Mas J, Puigdomènech P y Arús P (2002). Estructura del genoma. En Genómica y Mejora Vegetal Ed. Mundi-Prensa: 37-63.

Monforte A J, Garcia-Mas J and Arús P (2003a). Genetic variability in melon based on microsatellite variation. Plant Breeding 122: 153-157.

Monforte A J, Oliver M, Gonzalo M J, Álvarez J M, Dolcet-Sanjuán R and Arús P (2003b). Identification of Quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melon. 7th International Congress of plant molecular biology (ISPMB). Barcelona, June 23-28, 2003.

Morales M, Luis-Arteaga M, Álvarez J M, Dolcet-Sanjuán R, Monfort A, Arús P and Garcia-Mas J (2002). Marker saturation of the region flanking the gene NSV conferring resistance to the melon necrotic spot carmovirus (MNSV) in melon. Journal of the American Society for Horticultural Science 127: 540-544

Moreno-González J (2000) Marcadores moleculares para la selección de caracteres cuantitativos. Ed . F.Nuez y J M Carrillo. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. 385-408

Morrison R A and Evans D A (1988). Haploid plants from tissue culture: New plant varieties in shortened time frame. Bio/Technology 6: 684-689.

Munger H M and Robinson R W (1991). Nomenclature of *Cucumis melo* L. Cucurbit Genet Coop Rep 14: 43-44.

Murigneux A, Barloy D, Leroy P and Beckert M (1993). Molecular and morphological evaluation of double haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines. Theor Appl Genet 86: 837-842.

Naudin C V (1859). Essais d'une monographie des espèces et des varieties du genre *Cucumis*. Ann Sci Nat Bot sér 4 (11): 5-87.

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

Niemirowicz-Szczytt K and Dumas de Vaulx R (1989). Preliminary data of haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. Cucurbit. Genet Coop 12: 24-25.

Oliver M (2001). Construcció d'un mapa de marcadors moleculars i anàlisi genètica de caràcters

agronòmics en meló. PhD dissertation. Universitat de Barcelona.

Oliver M, Garcia-Mas J, Cardús M, Pueyo N, López-Sesé A I, Arroyo M, Gómez-Paniagua H, Arús P and DeVicente MC (2001). Construction of a reference linkage map for melon. Genome 44: 836-845.

Paran I and Michelmore RW (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downey mildew resistance genes in lettuce. Theor Appl Genet 85: 985-993.

Paterson A H, Lander E S, Hewitt J D, Peterson S, Lincoln S E and Tanksley S D (1988). Resolution of quantitative trait into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction length polymorphism. Nature 355: 721-726.

Pauls K P (1996). The utility of double haploid populations for studying the genetic control of traits determinated by recessive alleles. S M Jain, S K Sopory, R E Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in Higher plants, Vol.1: 125-144.

Périn C, Hagen L S, De Conto V, Katzir N, Danin-Poleg Y, Portnoy V, Baudracco-Arnas S, Chadoeuf J, Dogimont C and Pitrat M (2002a). A reference map of Cucumis melo based on two recombinant inbred lines populations. Theor Appl Genet 104: 1017-1034.

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

Perl-Treves R, Stepansky A, Schaffer A A and Kovalski I (1998). Intraspecific classification of *Cucumis melo*: How is the morphological and biochemical variation of melons reflected at the DNA level?. Cucurbitaceae 98: 310-319.

Picó B y Ruiz J J (2000). Clonación posicional y mapeo comparativo. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez F, Carrillo J M.: 443-512.

Pitrat M (1998). Gene list for melon. Cucurbit Genetics Cooperative Report 21: 69-81.

Pitrat M, Hanelt P and Hammer K (2000). Some comments on intrespecif classification of cultivars of melon. Cucurbitacea 2000. Acta Horticulturae 510: 29-36.

Przyborowski J A (1996). Haploidy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). S M Jain, S K Sopory, R E Veilleux (eds.). In vitro haploid production in Higher plants, Vol. 3: 91-98

Przyborowski J A and Niemirowicz-Szczytt K (1994). Main factors Affecting cucumber (*Cucumis sativus*

L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. Plant Breeding 112: 70-75.

Rafalski A (2002). Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. Genome studies and molecular genetics: 94-100.

Rao P S and Suprasanna P (1996). Methods to double haploid chromosome numbers. S M Jain, S K Sopory, R E Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in Higher plants, Vol.1: 317-339.

Rivard S R, Cappadocia M, Vincent G, Brisson N and Landry B S (1989). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of plants produced by *in vitro* anther culture of *Solanum chacoense* Bitt. Theor Appl Genet 78: 49-56.

Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. CloD Spring Harbor Laboratory Press, Plainsview, NY.

Sari N, Abak K, Pitrat M, Rode J C and Dumas de Vaulx R (1994). Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. HortScience 29: 1189-1190.

Sauton A and Dumas de Vaulx R (1987). Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. Agronomie 7: 141-148.

Sauton A (1988a). Doubled haploid production in melon (*Cucumis melo* L.). *Meeting on Cucurbitaceae, Avignon-Montfavet*, 119-128.

Sauton A (1988b). Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L.. Scientia Horticulturae 35: 71-75.

Sauton A (1989). Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. Cucurbit Genetic Coop. Rpt 12: 22-23.

Sestili S and Ficcadenti N (1996). Irradiated pollen for haploid production. S M Jain, S K Sopory, R E Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in Higher plants, Vol.1: 263-274.

Schlotterer C and Tautz D (1995). Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucl Acids Res 20: 211-215

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

Smulders M J M, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P and Vosman B (1997). Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. Theor Appl Genet 97: 264-272.

Sobrino E (1989). Tratado de horticultura herbácea. Ed. Aedos. Barcelona. Pp: 155-191.

Soller M and Brody T (1976). On the power of experimental designs for detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. Theor Appl Genet 47: 35-39.

Souther E M (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Bio 98: 503-517.

Staub J E, Serquen F C and Gupta M (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience 31: 729-741.

Stepansky A, Kovalski I and 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.

Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T and Yano M (2001). *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the αsubunit of protein kinasa CK2. PNAS 98: 7922-7927.

Tanksley S D and Orton T J (1983). Isoenzymes in plant genetics and breeding. Elsevier Co., Amserdam.

Tanksley S D, Young N D, Paterson A H and Bonierbale M W (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio/technology 7: 257-264.

Tanksley S D, Ganal M W, Prince J P, de Vicente M C, Bonierbale M W, Broun P, Fulton T M, Giovannoni J J, Grandillo S, Martin G B, Messeguer R, Miller J C, Miller L, Paterson A H, Pineda O, Röder M S, Wing R A, Wu W and Young N D (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potatoes genomes. Genetics 132: 1141-1160.

Tanksley S D (1993). Mapping polygenes. Annu Rev Genet 27: 205-233.

Tanksley S D, Ganal M W and Martin G B (1995). Chromosome landing: a paradigm for map-based gen cloning in plants with large genomes. TIG vol. 11(2) Ed. Elsevier Science. West Layffette, USA: 63-68.

Tanksley S D, Fulton T M, Beck-Bunn T, Uhlig J and Zamir D (1998). A gene for reduced lycopene on chromosome 12 of *Lycopersicon parviflorum*, possibly allelic to *Del*. Tomato Genet Coop 48: 57-58.

Tao Q, Chang Y-L, Wang J, Chen H, Islam-Faridi M N, Scheuring C, Wang B, Stelly D M. and Zhang H-B (2001) Bacterial Artificial Chromosome-Based Physical Map of the Rice Genome Constructed by Restriction Fingerprint Analysis Genetics, Vol. 158: 1711-1724.

Temnykh S, Park W D, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho Y G, Ishii T and McCouch S R (2000). Mapping and genome oraganization of microsatellite sequences in rice (Oryza sativa L.). Theor Appl Genet 100: 697-712.

Thompson D M, Chalmers K, Waugh R, Forster B P, Thomas W T B, Caligari P D S and Powell W (1991). The inheritance of genetic markers in microspore-derived plants of barley Hordeum vulgare L. Theor Appl Genet 81: 487-492

Torres J M (1997). Melones. Compendios de Horticultura 10: 13-20. Ediciones de Horticultura SL, Reus.

Valles M P y Lasa J M (1994). Agrobacterium-mediated transformation of comercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). Plant Cell Rep 13: 145-148.

Van Ooijen J W and Voorrips R E (2001). Join map 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International, Wagwningen, the Netherlands*.

Voorrips R E (2002). MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. The Journal Heredity 93: 77-78.

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

Warburton M L and Bliss F A (1996), Genetic diversity in Peach (Prunus persica L. Batch). Revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) Markers and compared to inbreeding coefficients. Journal of the American Society for Horticultural Science 121: 1012-1019.

Welsh J and McClelland M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nuc Acids Res 18: 7213-7218.

Willians J G K, Kubclick A R, Livak K J, Rafalsky J A and Tingey SV (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res 18: 6531-6535.

Witaker T W and Davis G N (1962). Cucurbits, botany, cultivation and utilization. Interscienec Pub., NY.

Yanmaz R, Ellialtioglu S and Taner K Y (1999). The effects of gamma irradiation on pollen viabilty and haploid plant formation in snake cucumber (*Cucumis melo* L. var. *flexuosus* Naud.). *Acta Horticulturae* 492: 307-310.

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y and Sadaki T (2000). Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene CONSTANS. The Plant Cell 12: 2473-2483.

Zeng Z-B (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10972-70976.

Zeng Z-B (1994). Precision Mapping of Quantitative Trait loci. Genetics 136: 1457-1468.

Zeng Z-B, Kao C-H and Basten C J (1999). Estimating the genetic architecture of quantitative traits. Genet Res Camb 74: 279-289.

Zivy M, Devaux P, Blaisonneau J, Jean R, Thiellement H (1992) Segregation distortion and linkage studies in microspore-derived double haploid lines of *Hordeum bulgare* L. Theor Appl Genet 83:919-924.

Zwick M S, Islam-Faridi M N, Czeschin Jr D G, Wing R A, Hart G E, Stelly D M and Price H J (1998). Physical Mapping of the liguless Linkage Group in Sorghum bicolor Using Rice RFLPs-Selected Sorghum BACs. Genetics 148: 1983-1992.

ANEXOS

ANEXO 1:

Tabla 1: Microsatélites de melón, origen, motivo repetitivo, tamaño esperado, temperatura de hibridación y características de algunos de ellos.
Marcados en sombreado aparecen los SSR localizados en el mapa de melón generado a partir de una poblacion de LDHs

Nombre	Origen	Motivo	Tamaño bp	Tmp. °C
NR1	ADN genómico melón (1)	(TC)15	155	51
NR2-F	ADN genómico melón (1)	(CT)12	172	51
NR3-F	ADN genómico melón (1)	(GA)10	203	51
NR4-F	ADN genómico melón (1)	(CT)21??(CT)23	126	51
NR5-F	ADN genómico melón (1)	(CT)7AT(CT)15(AT)8(AC)6	211	51
NR6-F	ADN genómico melón (1)	(TC)2TT(TC)16	151	51
NR7-F	ADN genómico melón (1)	(CT)20	130	51
NR8-F	ADN genómico melón (1)	(TC)19N8(TAA)6	164	57
NR9-F	ADN genómico melón (1)	(TC)11	207	51
NR10-F	ADN genómico melón (1)	(AG)10	110	51
NR11-F	ADN genómico melón (1)	(AG)9	211	43
NR12-F	ADN genómico melón (1)	(GA)21	179	40
NR14-F	ADN genómico melón (1)	(TC)18	165	51
NR16-F	ADN genómico melón (1)	(AG)1AC(AG)11	165	51
NR17-F	ADN genómico melón (1)	(AG)6(TG)8	181	51
NR18-F	ADN genómico melón (1)	(TC)11N24(TC)17(TA)12	172	57
NR19-F	ADN genómico melón (1)	(CT)12	103	57
NR20-F	ADN genómico melón (1)	(AG)8	92	51
NR21-F	ADN genómico melón (1)	(GA)10	135	51
NR22-F	ADN genómico melón (1)	(AC)7(AT)8	166	51
NR23-F	ADN genómico melón (1)	(CT)10	172	51
NR24-F	ADN genómico melón (1)	(TA)4(GA)7	182	51
NR25-F	ADN genómico melón (1)	(GA)9	164	51
NR26-F	ADN genómico melón (1)	(CT)7(CCCT)2(TC)4	140	51
NR27-F	ADN genómico melón (1)	(TA)2(TAA)5	123	51
NR28-F	ADN genómico melón (1)	(TA)(TTA)9...(TTA)13	88	51
NR28-Rb	ADN genómico melón (1)		289	51
NR29-F	ADN genómico melón (1)	(ATT)6	151	51
NR30-F	ADN genómico melón (1)	(TC)13	193	51
NR31-F	ADN genómico melón (1)	(AAT)6(AAAT)4	179	51
NR32-F	ADN genómico melón (1)	(AG)14	169	27
NR33-F	ADN genómico melón (1)	(AG)2AA(AG)8TT(GA)3	122	51
NR34-F	ADN genómico melón (1)	(TC)17	155	51
NR35-F	ADN genómico melón (1)	(CT)10	186	51
NR37-F	ADN genómico melón (1)	(GA)16	170	51
NR38-F	ADN genómico melón (1)	(CT)15N5(CT)C(CT)3	141	51
NR39-F	ADN genómico melón (1)	(AG)22	158	51
NR40-F	ADN genómico melón (1)	(TC)8	144	51
NR41-F	ADN genómico melón (1)	(TC)12	129	40
NR42-F	ADN genómico melón (1)	(AG)15	136	51
NR43-F	ADN genómico melón (1)	(AG)6CG(AG)3	154	51
NR44-F	ADN genómico melón (1)	(CTTT)11	169	51

NR45-F	ADN genómico melón (1)	(AG)14	100	57
Nombre	Origen	Motivo	Tamaño bp	Tmp. °C
NR46-F	ADN genómico melón (1)	(A)20(AG)9	201	51
NR47-F	ADN genómico melón (1)	(AG)8	184	51
NR48-F	ADN genómico melón (1)	(GA)11	120	51
NR49-F	ADN genómico melón (1)	(GA)9	172	35
NR50-F	ADN genómico melón (1)	(TC)16(TA)12	134	57
NR51-F	ADN genómico melón (1)	(GA)15	188	51
NR52-F	ADN genómico melón (1)	(AG)18	135	51
NR53-F	ADN genómico melón (1)	(CT)16	149	57
NR54-F	ADN genómico melón (1)		155	51
NR55-F	ADN genómico melón (1)	(AG)8N10(AG)3(GA)4	181	51
NR56-F	ADN genómico melón (1)	(TC)11	96	59
NR57-F	ADN genómico melón (1)	(CTT)3(CT)9	157	51
NR58-F	ADN genómico melón (1)	(CT)9	189	51
NR59-F	ADN genómico melón (1)	(GA)17	69	40
NR60-F	ADN genómico melón (1)	(TG)8(AG)8	157	51
NR61-F	ADN genómico melón (1)	(AG)4AA(AG)8	142	59
NR62-F	ADN genómico melón (1)	(TC)15	145	57
NR63-F	ADN genómico melón (1)	(CT)8	101	40
NR65-F	ADN genómico melón (1)	(TC)18	119	57
NR66-F	ADN genómico melón (1)	(TC)17	127	40
NR67-F	ADN genómico melón (1)	(TC)12	145	51
NR68-F	ADN genómico melón (1)	(AG)20	190	51
NR70-F	ADN genómico melón (1)	(TC)10	162	35
NR71-F	ADN genómico melón (1)	(CT)11	160	51
NR73-F	ADN genómico melón (1)	(AG)19	130	51
NR74-F	ADN genómico melón (1)	(AG)4AA(AG)9	227	51
NR75-F	ADN genómico melón (1)	(AG)18	157	51
NR76-F	ADN genómico melón (1)	(AG)T(AG)6G(AG)4	166	60
NR77-F	ADN genómico melón (1)	(CTT)2T(CTT)(CCA)2(CCG)3(TGG)7	172	40
NR79-F	ADN genómico melón (1)	(AG)13	153	51
NR80-F	ADN genómico melón (1)	(GA)2TG(GA)14TCT(CCTTT)6	159	40
NR81-F	ADN genómico melón (1)	(CT)2TC(CT)10	170	40
NR82-F	ADN genómico melón (1)	(CT)11	129	51
NR83-F	ADN genómico melón (1)	(CT)5A(TC)5	93	51
NR84-F	ADN genómico melón (1)	(GT)7GAT(GT)2	167	51
NR85-F	ADN genómico melón (1)	(CT)6TT(CT)9	185	51
NR87-F	ADN genómico melón (1)	(TAA)TT(TAA)4A(TAA)2T	125	51
NR88-F	ADN genómico melón (1)	(TTC)TCC(TTC)6	184	35
NR 91-F	ADN genómico melón (1)	(TC)8…….(TTC)7	252	51
NR92-F	ADN genómico melón (1)	(GA)8	140	51
NR94-F	ADN genómico melón (1)	(GA)8	167	35
NR95-F	ADN genómico melón (1)	(AG)8	158	51
NR96-F	ADN genómico melón (1)	(CA)8	145	51
NR98-F	ADN genómico melón (1)	(GT)6(GA)10	140	51
NR99-F	ADN genómico melón (1)	(TGG)10	175	51
NR100-F	ADN genómico melón (1)	(TAA)9N8(GA)9(AT)3	175	51
TJ1-f	EST1-39 (2)	(GA)26T(GA)22	222	49
TJ2-f	EST1-73 (2)	(CAT)8	152	57
TJ3-f	EST2-30 (2)	(GA)11	158	57
TJ4-f	EST5-31(2)	(GAA)7	122	57

Nombre	Origen	Motivo	Tamaño bp	Tmp. °C
TJ6-f	EST5-48 (2)	(GAT)3GGT(GAT)3GGT(GAT)4/(GAT)3	150	57
TJ7-f	EST5-94 (2)	(TA)12	131	40
TJ8-f	EST6-28 (2)	(GAA)8	163	57
TJ9-f	est6-79 (2)	(CTTT)9(CT)7	199	40
TJ10-f	MC207 (2)	(CTT)5(CT)3	117	57
TJ11-f	MC290 (2)	(CAA)8GGATTCC(CAA)2	120	57
TJ12-f	MC291 (2)	(CTT)9	139	40
TJ13-f	MC38 (2)	(GAA)15	155	40
TJ18-f	gi|16648635 (2)	(CTT)22TTT(CTT)17	207	57
TJ19-f	gi|18629539 (2)	(TA)14	92	57
TJ21-f	gi|2625083 (2)	(CT)21	195	51
TJ22-f	gi|5052965 (2)	(CTTT)8/(CTTTTTTT)5	136	57
TJ23-f	gi|7582392 (2)	(TA)15	158	51
TJ24-f	CM24 (2)	(CTT)18	165	59
TJ25-f	CM40 (2)	(GAA)8	155	57
TJ26-f	EST F091 (2)	(TC)11	133	59
TJ27-f	EST F182 (2)	(TCT)8	171	59
TJ28-f	EST F215 (2)	(GA)17	143	59
TJ29-f	EST 1.83 (2)	(TC)10	137	59
TJ30-f	EST 11.21 (2)	(CAATC)7	178	59
TJ31-f	EST 11.35 (2)	(GA)13	196	59
TJ32-f	EST 12.44 (2)	(AT)13	182	57
TJ33-f	EST 3.58 (2)	(AAG)10	196	59
TJ34-f	EST 4.01 (2)	(TCT)9	159	57
TJ35-f	EST 4.15 (2)	(TGA)10	160	57
TJ36-f	EST 4.77 (2)	(TA)26	164	57
TJ37	gi|2104811 (2)	(CTT)18-------(TA)3AA(TA)2C(AT)7	127	43
TJ38	GI:7416123 (2)	(TA)5TC(CA)5T(AC)2	135	51

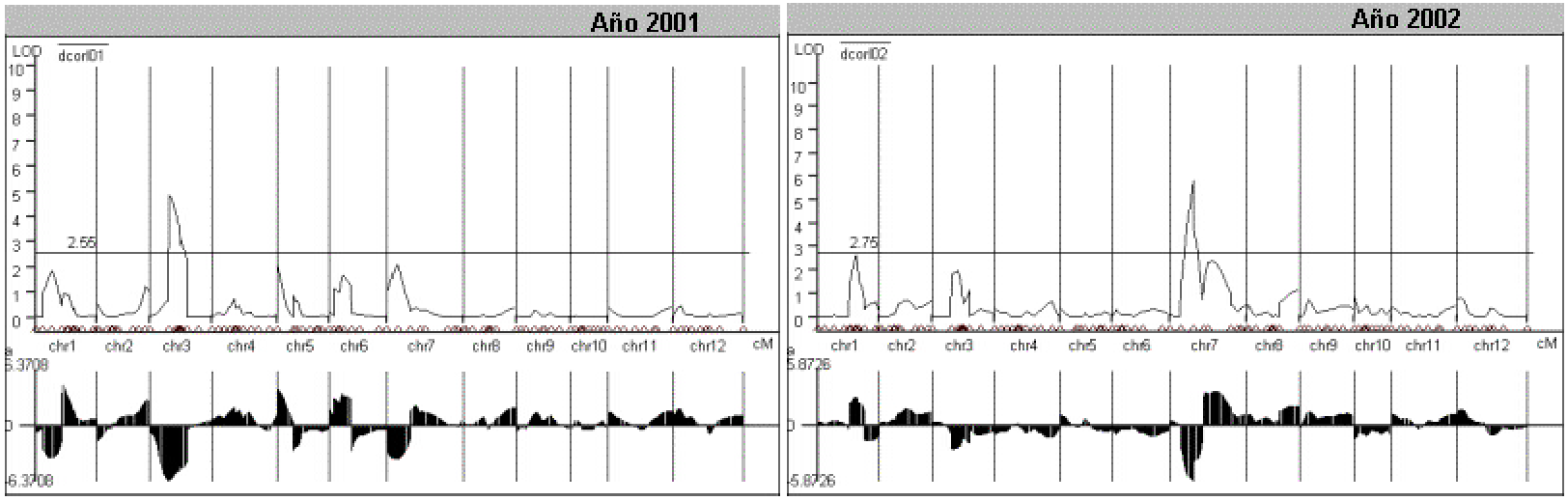
(1) Microsatélites obtenidos en el laboratorio de genética molecular de 'Newe Ya'ar Research Center'

(2) Microsatélites desarrollados a partir de ESTs (Expressed-Sequence Tags) de melón en el laboratorio de Genética Vegetal del IRTA de Cabrils en el año 2002

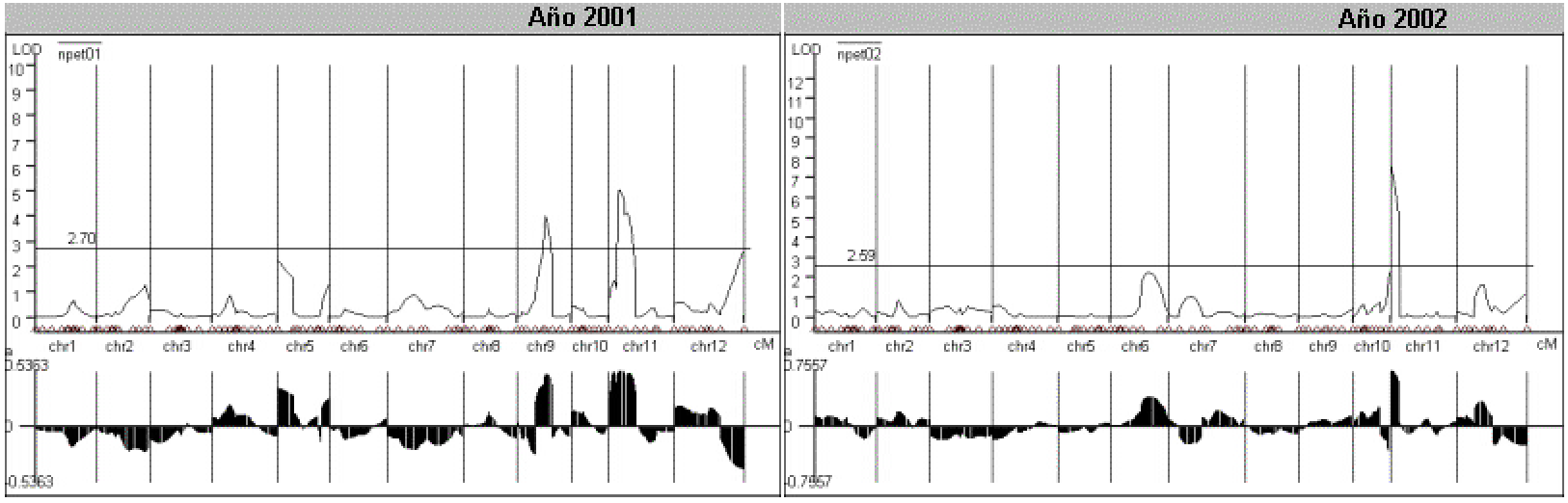
ANEXO 2:

Representación gráfica de los QTLs detectados para los caracteres relacionados con la morfología floral y de fruto y germinación de la población de LDHs de melón (*Cucumis melo* L.) obtenida a partir del cruzamiento PI 161375 x T111.

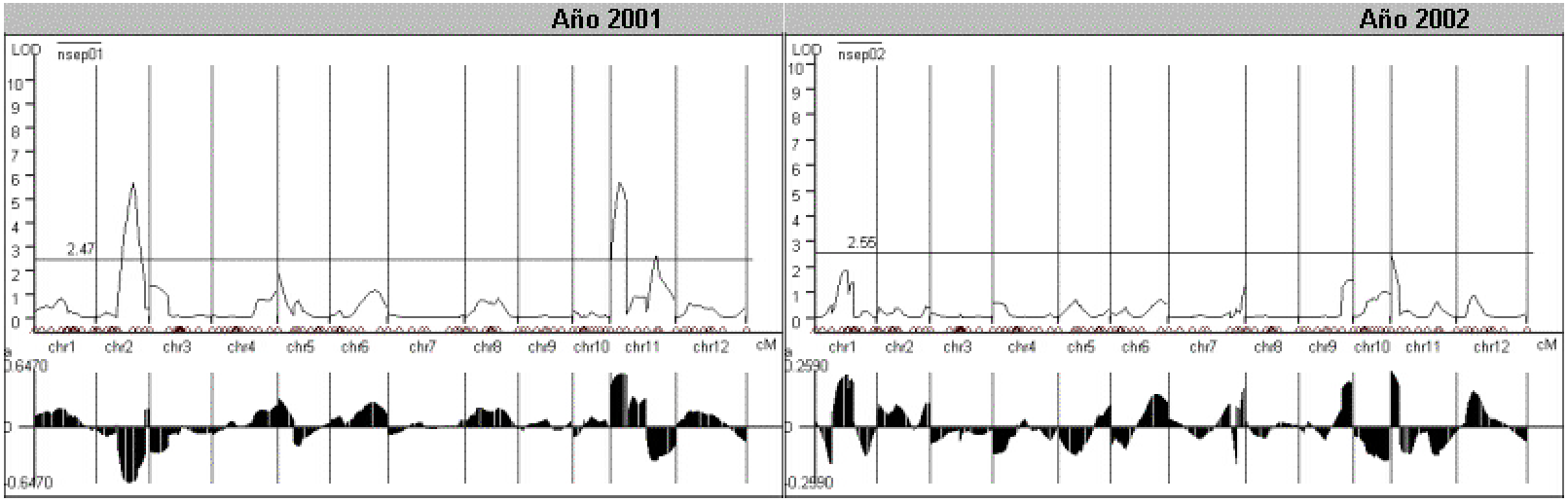
Diámetro de corola:



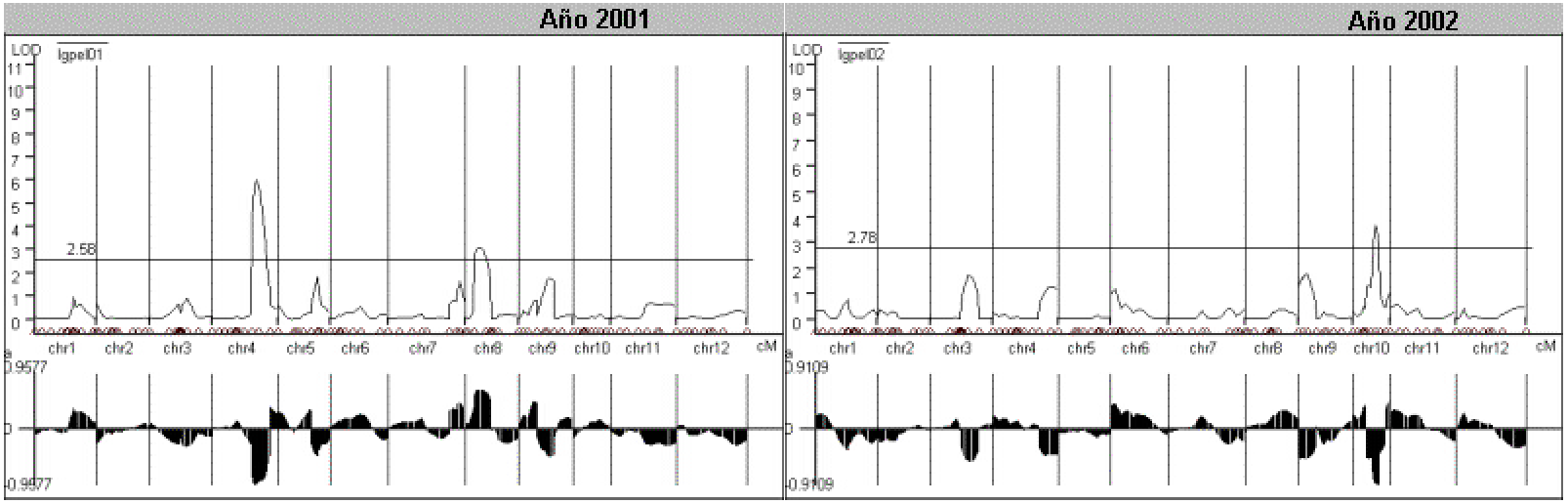
Número de pétalos:



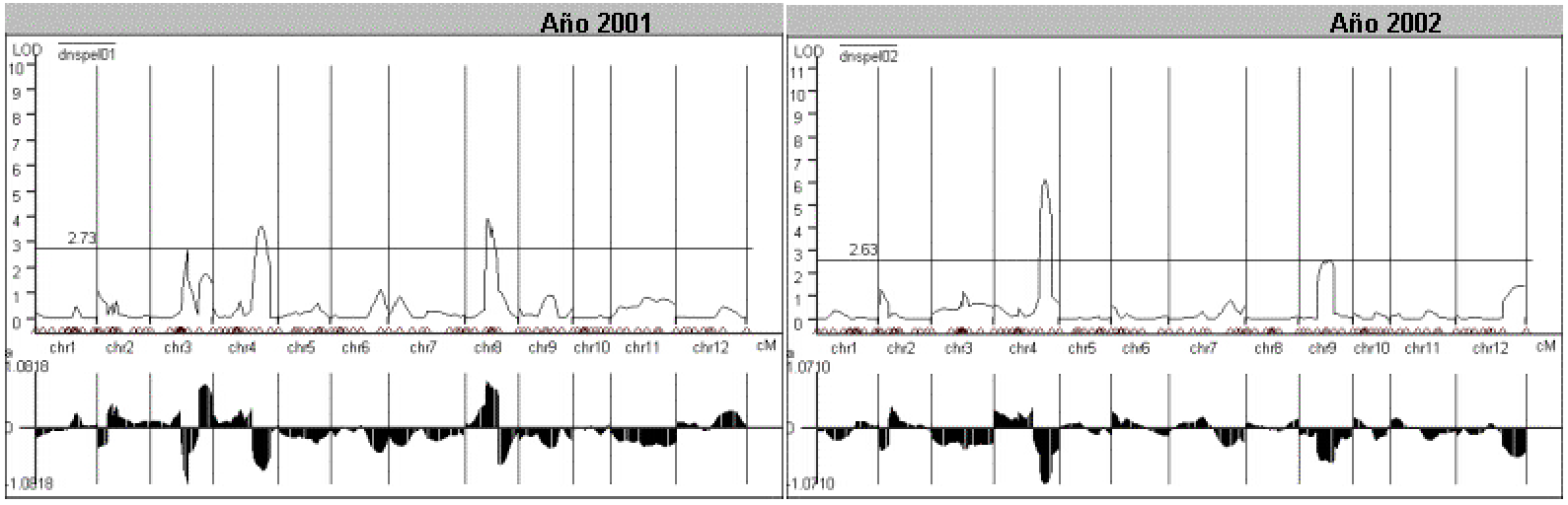
Número de sépalos:



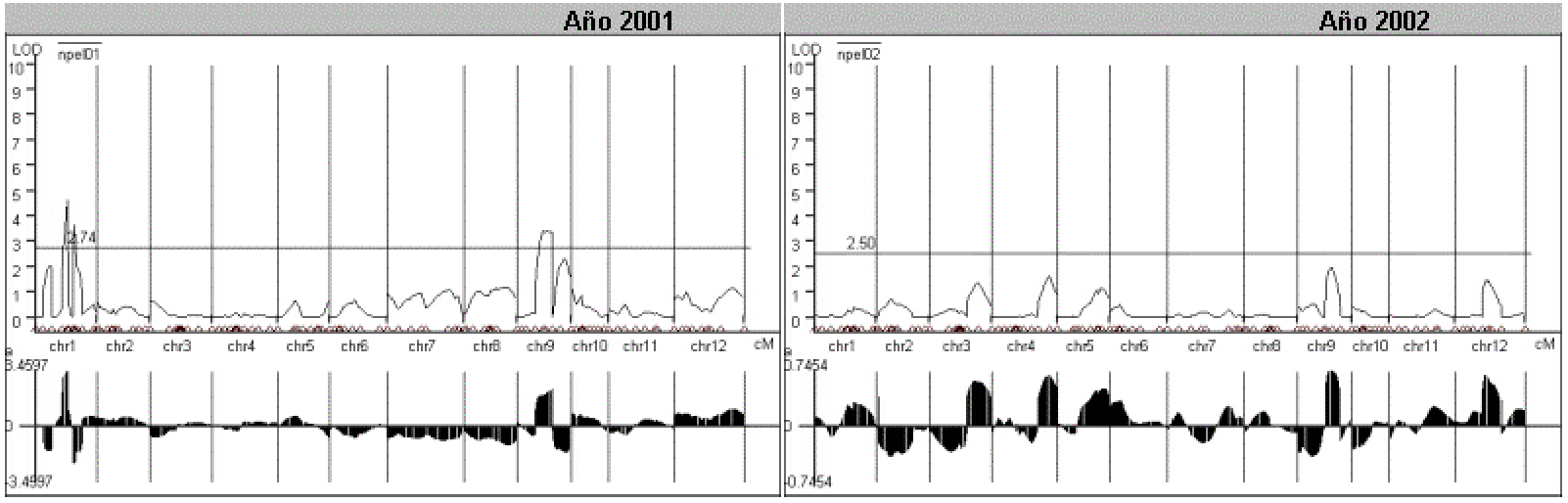
Longitud de pelo:



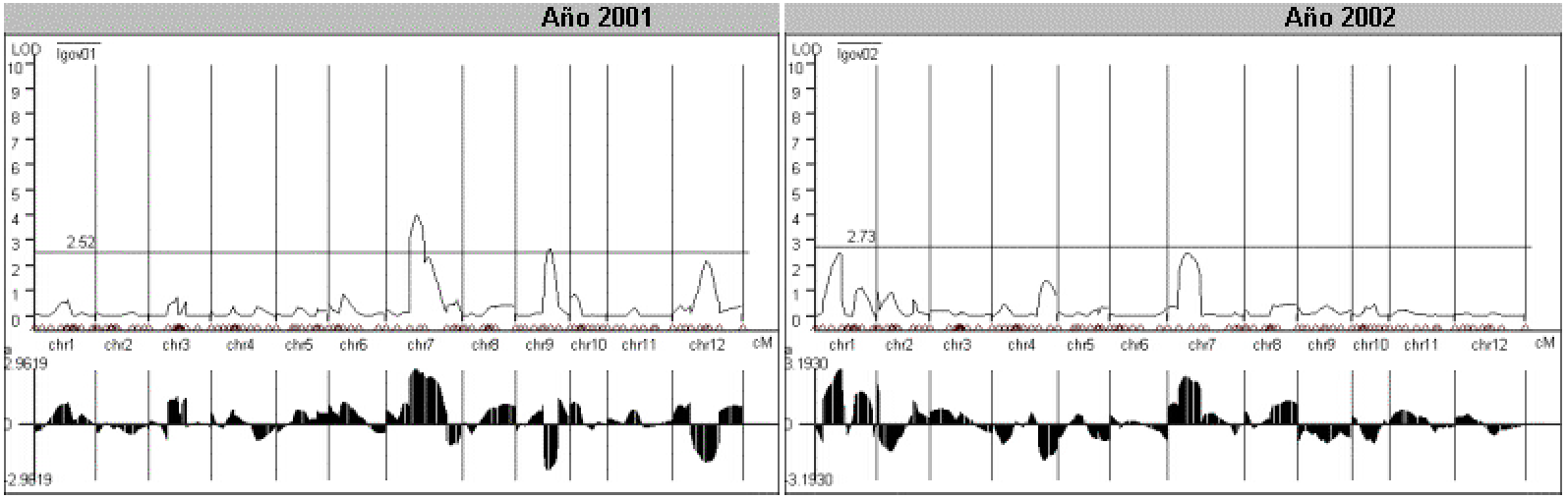
Pubescencia del ovario:



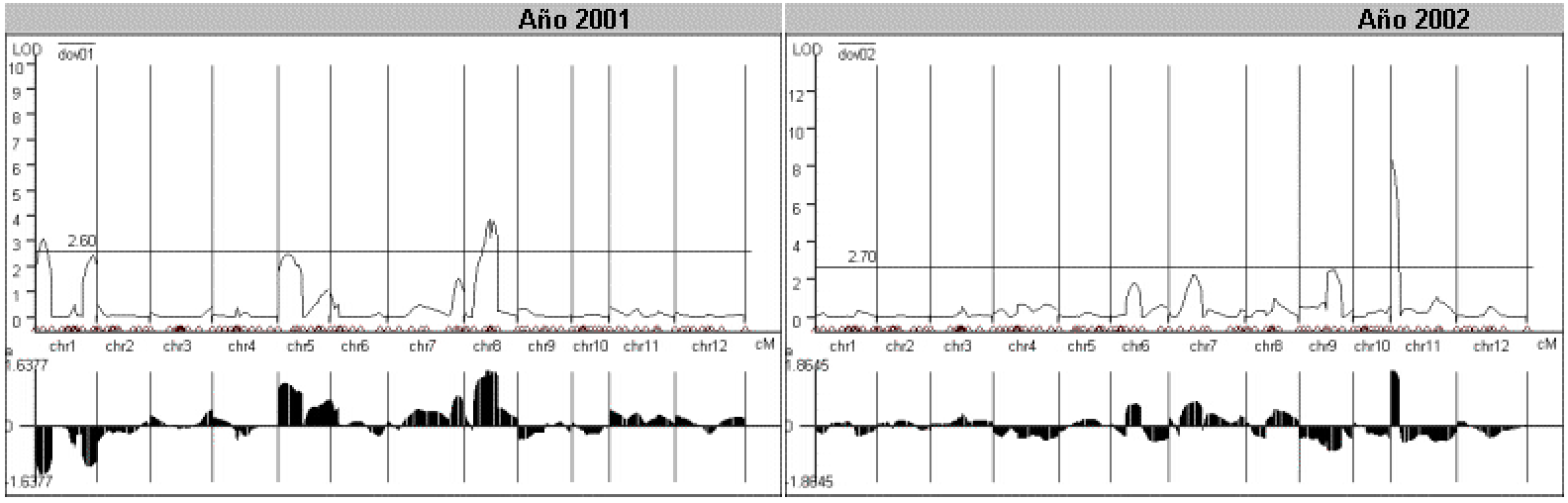
Densidad de pelo en el ovario:



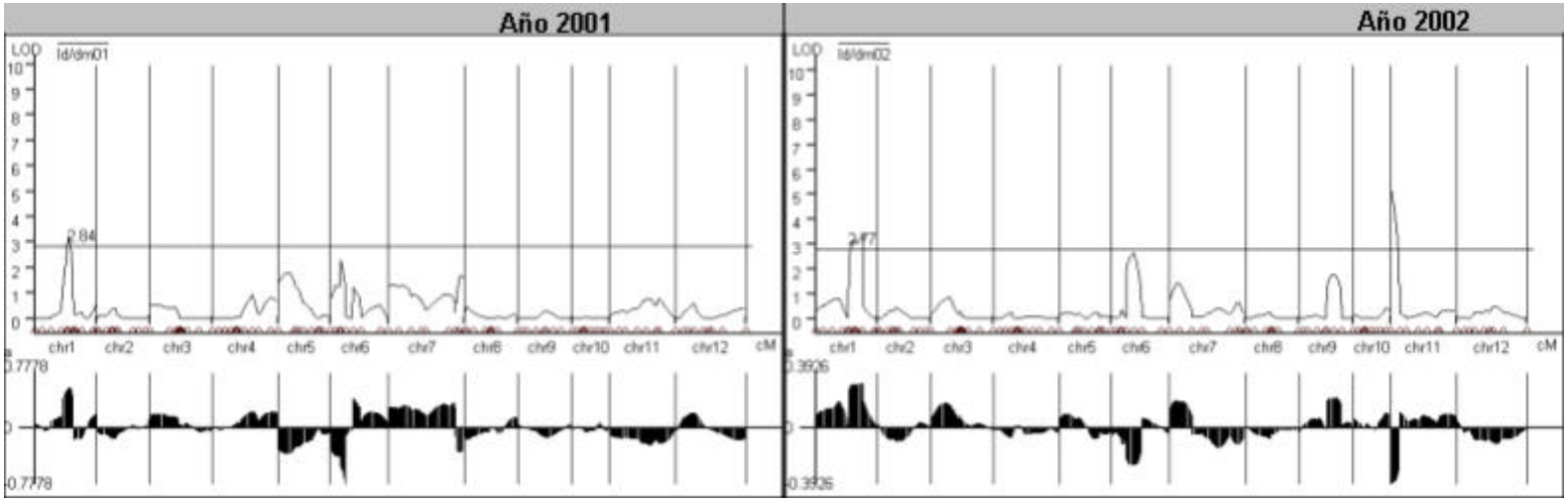
Longitud ovario:



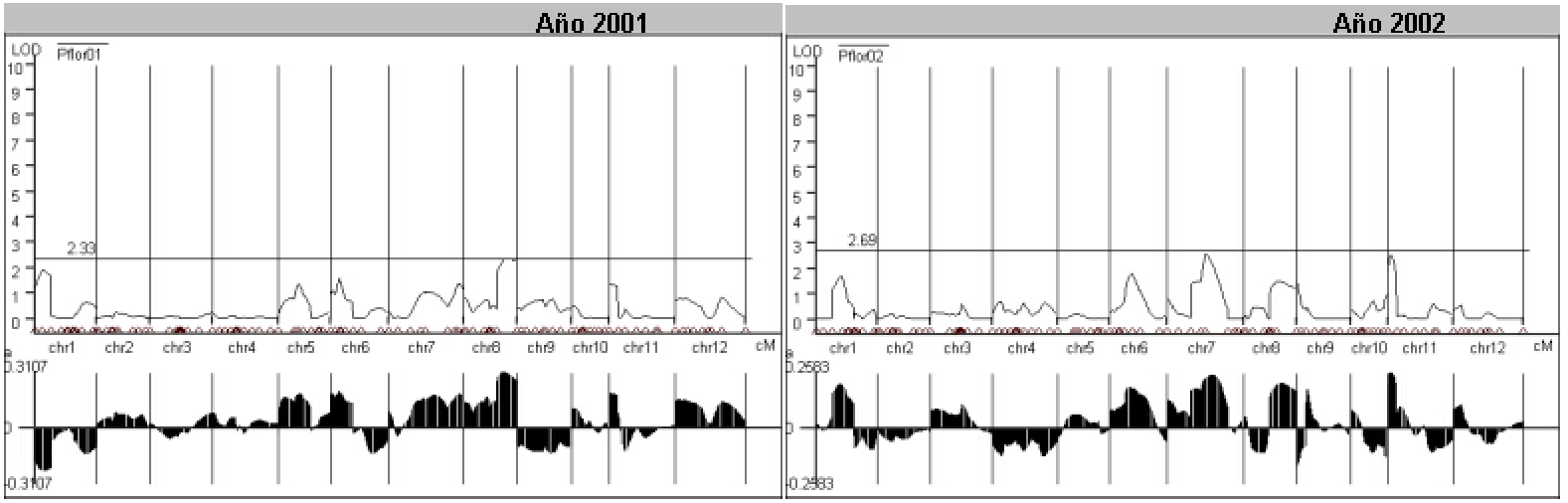
Diámetro de ovario:



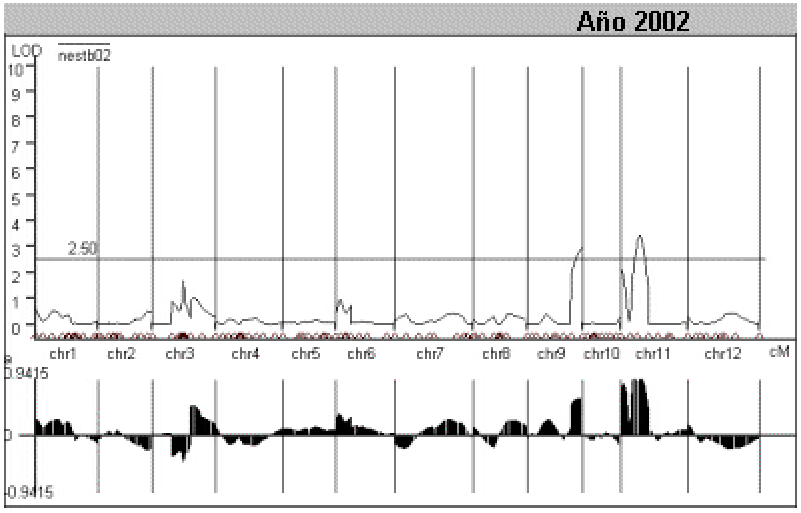
Relación Longitud/ diámetro de ovario:



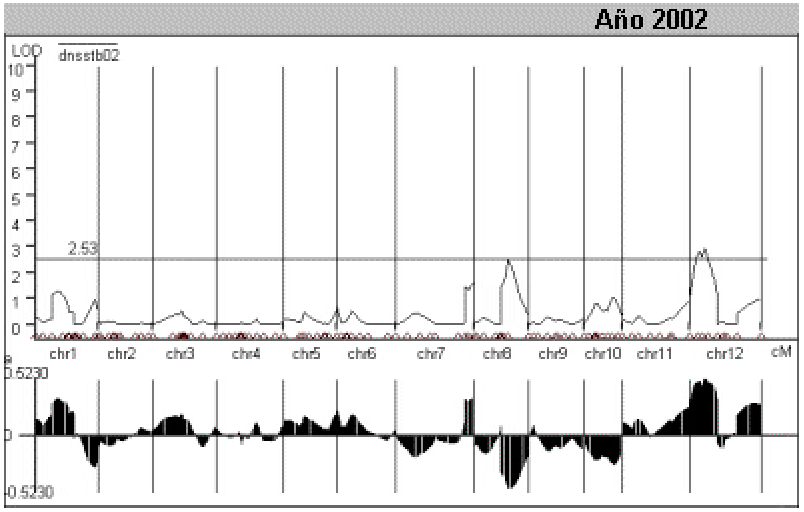
Peso flor:



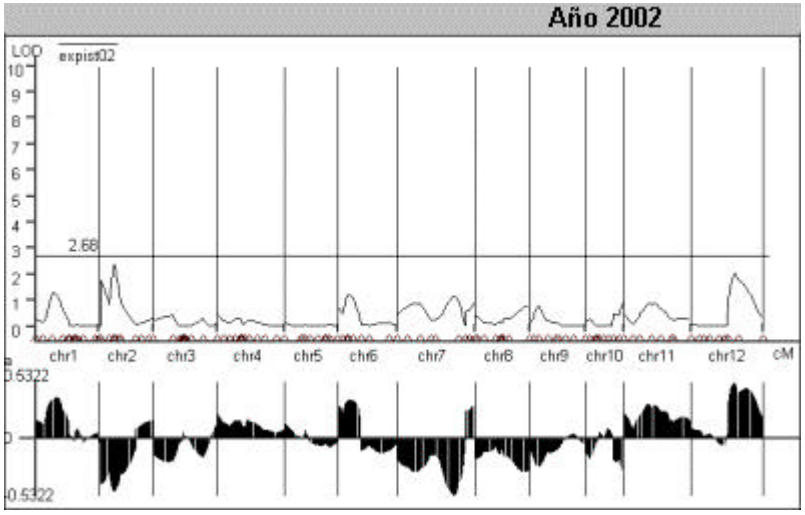
Número de estambres:



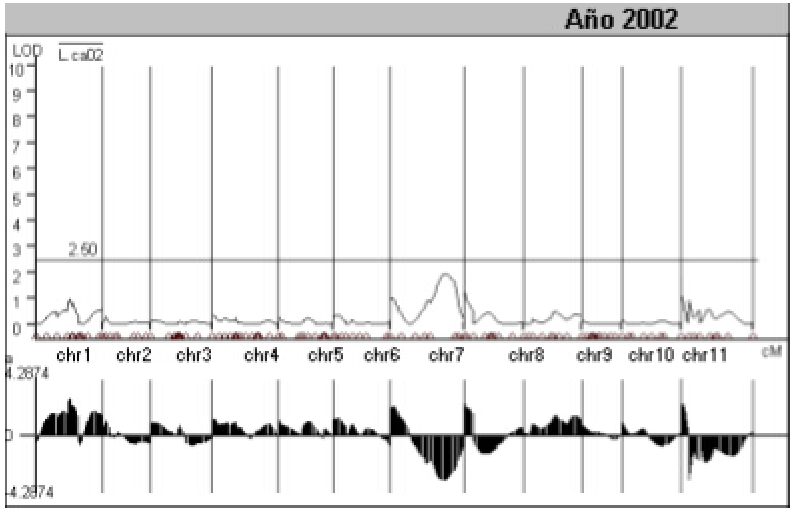
Densidad estambres:



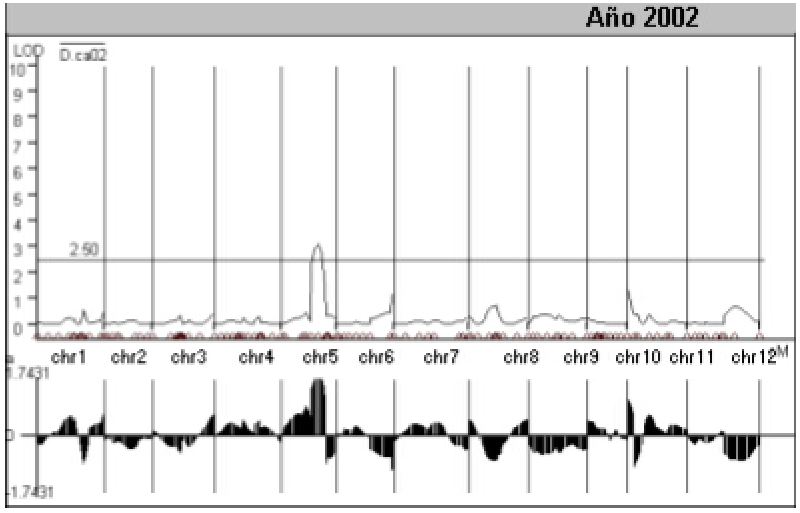
Exerción pistilo:



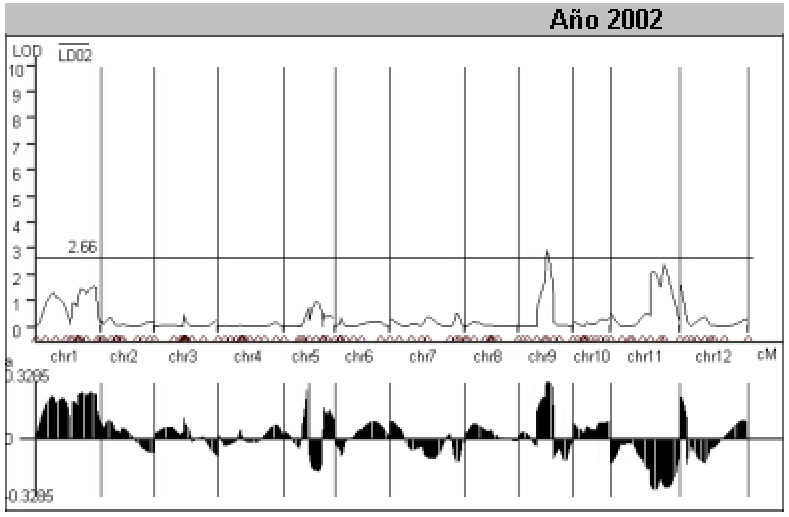
Longitud fruto:



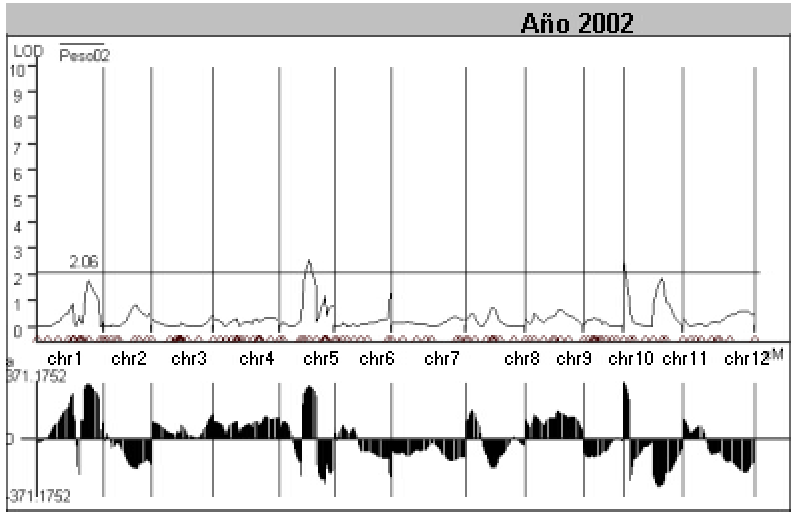
Diámetro fruto:



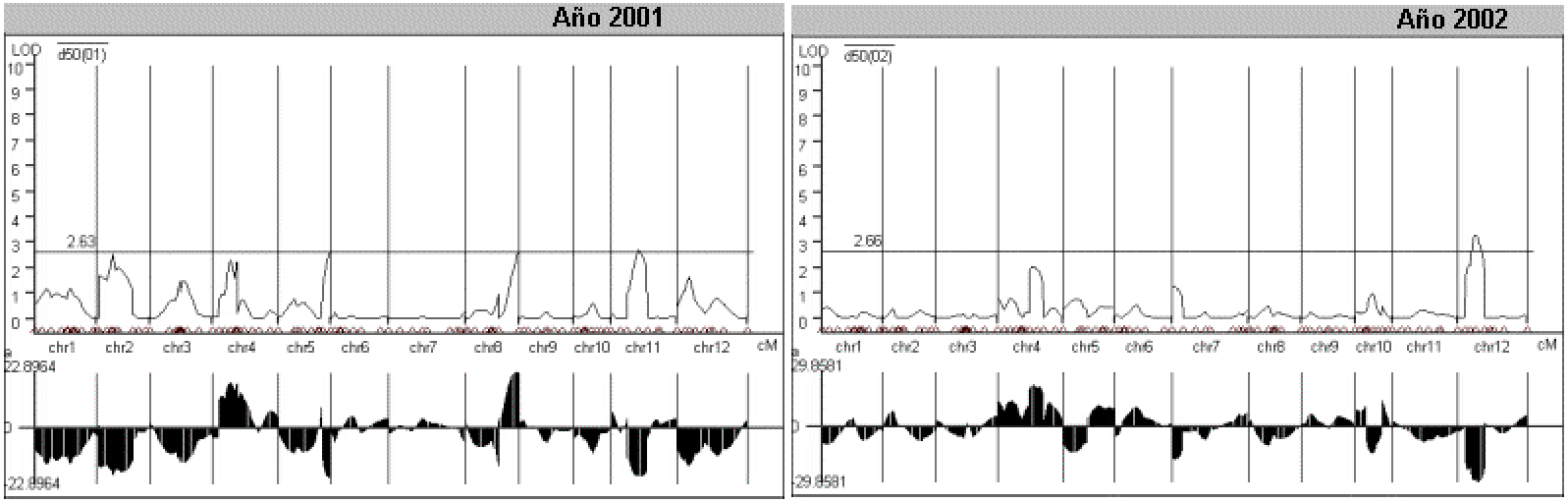
Relación Longitud / Diámetro fruto:



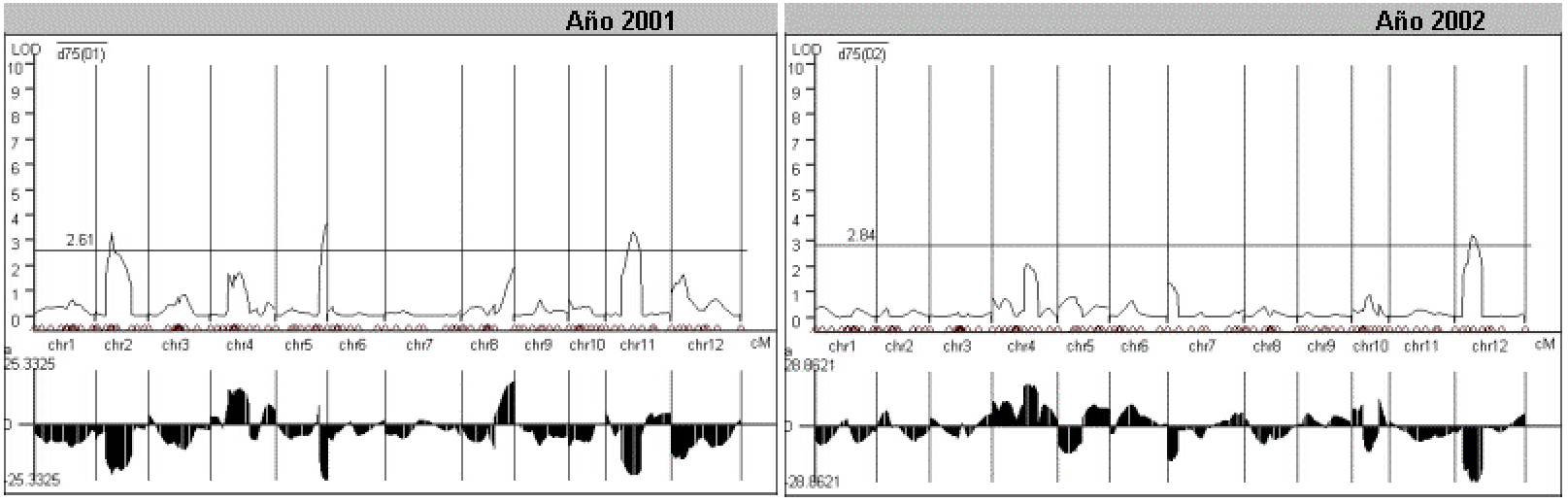
Peso fruto:



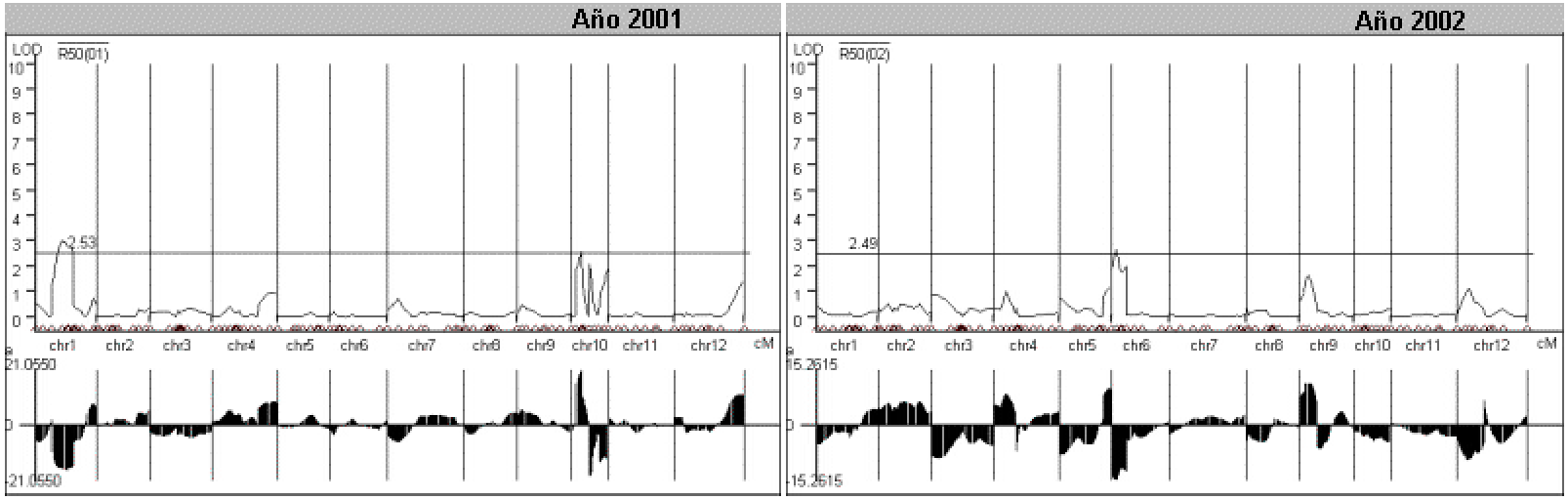
D50:


Año 2001
Año 2002
LOD
d50(01)
d50(02)
2.63
2.66
chr1 chr2 chr3 chr4 chr5 chr6 chr7 chr8 chr9 chr10 chr11 chr12 cM
22.8964
-22.8964
29.8581
-29.8581

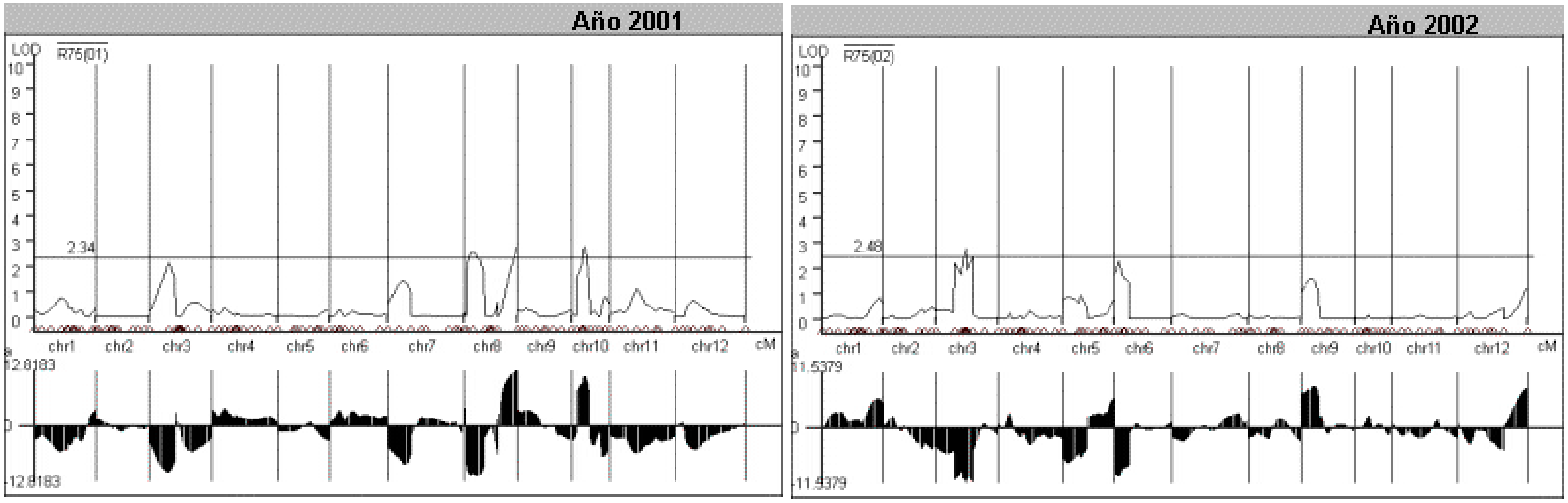
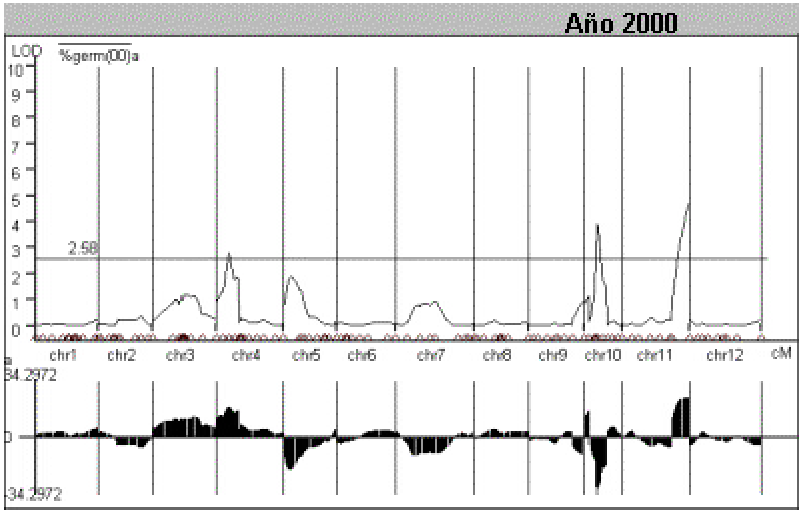
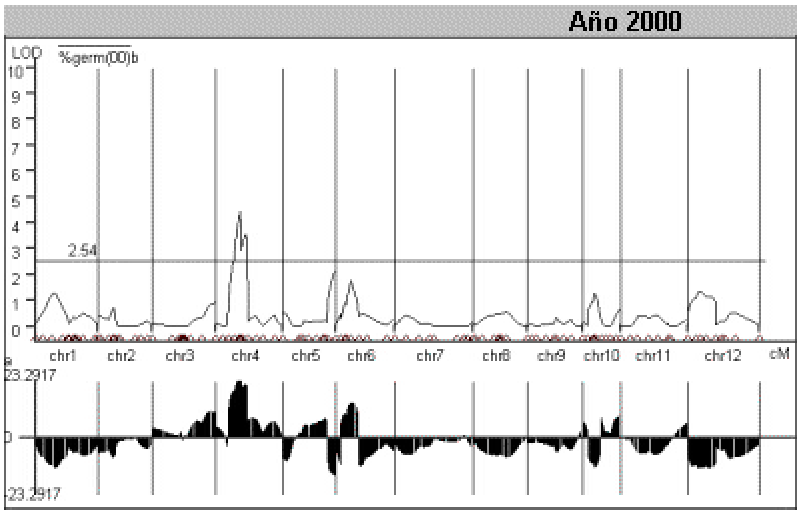
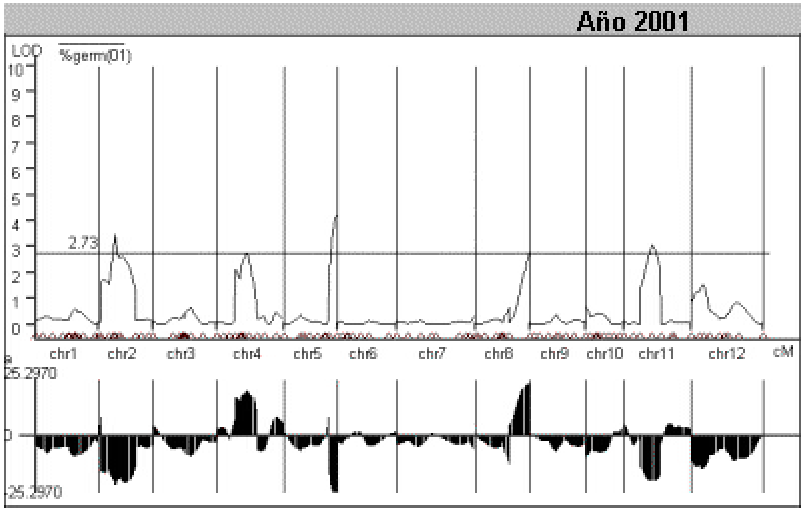
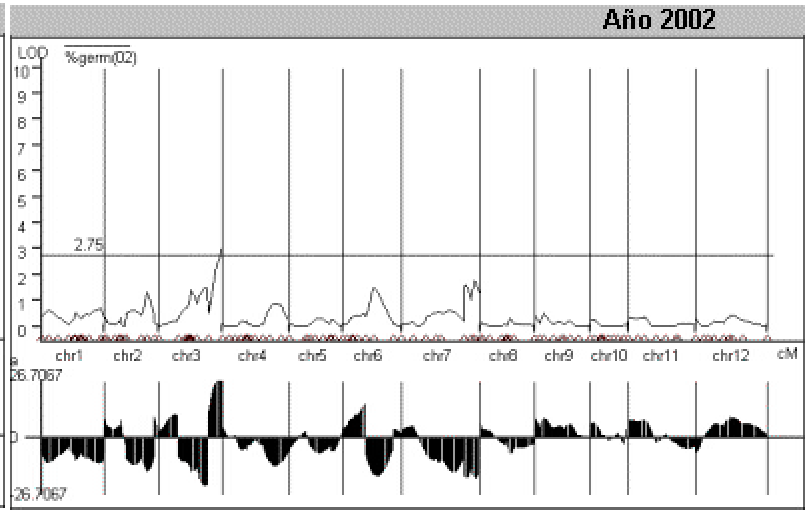
D75


Año 2001
Año 2002
LOD
d75(01)
d75(02)
2.61
2.84
chr1 chr2 chr3 chr4 chr5 chr6 chr7 chr8 chr9 chr10 chr11 chr12 cM
25.3325
-25.3325
28.8621
-28.8621

R50:


Año 2001
Año 2002
LOD
R50(01)
R50(02)
2.53
2.49
chr1 chr2 chr3 chr4 chr5 chr6 chr7 chr8 chr9 chr10 chr11 chr12 cM
21.0550
-21.0550
15.2615
-15.2615

R75:


Año 2001
Año 2002
LOD
R75(01)
R75(02)
2.34
2.48
chr1 chr2 chr3 chr4 chr5 chr6 chr7 chr8 chr9 chr10 chr11 chr12 cM
12.8183
-12.8183
11.5379
-11.5379

Porcentaje de germinación: