



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Dept. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Estudis de Doctorat en Biologia i Biotecnologia Vegetal

Tesis Doctoral

Clonaje posicional y validación de un gen candidato para *eth6.3*, un QTL implicado en la maduración climatérica del fruto del melón.

Memoria de Investigación presentada por Pablo Ríos Rodríguez para el título de Doctor en Biología y Biotecnología Vegetal por la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Este trabajo ha sido realizado en el Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Bellaterra

Director

Tutora

Doctorando

Dr. Jordi Garcia Mas

Dra. Charlotte
Poschenrieder Wiens

Pablo Ríos Rodríguez

Barcelona, Diciembre de 2015

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resúmenes.....	1
1. Introducción general.....	7
1.1. El melón (<i>Cucumis melo</i> L.).....	9
1.1.1. Taxonomía y filogenia	9
1.1.2. Importancia económica de la especie.....	11
1.1.3. Herramientas genéticas y genómicas disponibles	12
1.1.4. Mapeado de QTLs	14
1.1.5. Identificación de genes de interés mediante clonaje posicional	16
1.2. La maduración del fruto	17
1.2.1. Biosíntesis de etileno durante la maduración del fruto.....	17
1.2.2. Regulación genética de la maduración del fruto	21
1.2.3. Otros factores implicados en la regulación de la maduración del fruto	23
1.2.4. Procesos relacionados con la maduración del fruto.....	25
1.3. La maduración del fruto en melón.....	31
1.3.1. El etileno y la maduración del fruto	31
1.3.2. Control genético de la maduración.....	32
1.3.3. Biosíntesis y señalización de etileno	33
1.3.4. Biosíntesis de carotenoides	33
1.3.5. Biosíntesis de compuestos aromáticos	34
1.3.6. Acumulación de azúcares y ácidos orgánicos.....	35
1.3.7. Metabolismo de pared celular.....	36
1.3.8. Dehiscencia del fruto	36
2. Objetivos	39
3. Material y métodos	43
3.1. Material vegetal y cultivo	44
3.2. Micropropagación de melón in vitro	45
3.3. Evaluación fenotípica de la maduración del fruto	45
3.4. Manipulación de ácidos nucleicos	46
3.4.1. DNA.....	46
3.4.2. RNA	47
3.5. Secuenciación de ácidos nucleicos	47
3.5.1. Secuenciación de DNA por Sanger	47

3.5.2. Secuenciación masiva de mRNA	48
3.6. Genotipado	48
3.6.1. SSRs.....	48
3.6.2. SNPs.....	50
3.7. Clonaje posicional del QTL <i>eth6.3</i>	52
3.8. Detección de mutantes de TILLING.....	52
3.9. Obtención de una construcción RNAi.....	54
3.9.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	54
3.9.2. Técnicas específicas utilizadas en la obtención del RNAi.....	54
3.9.3. Proceso de construcción del hpRNA.....	55
3.10. Análisis bioinformático de secuencias	56
3.10.1. Análisis comparativo y filogenético de secuencias	56
3.10.2. Análisis del RNA-Seq	58
Preparación de las lecturas para el mapeado	59
Mapeado y recuento de las lecturas	59
Procesamiento del recuento de lecturas y análisis de expresión diferencial	59
Caracterización de genes DE.....	61
4. Resultados	63
4.1. Clonaje posicional del QTL <i>eth6.3</i>	65
4.1.1. Introducción.....	65
4.1.2. Obtención de una población segregante para <i>eth6.3</i>	67
4.1.3. Búsqueda de recombinantes en el intervalo de <i>eth6.3</i>	68
4.1.4. Fenotipado de recombinantes y mapeo fino de <i>eth6.3</i>	71
4.1.5. Identificación de un gen candidato para <i>eth6.3</i>	75
4.1.6. Discusión	76
4.2. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> mediante secuenciación.....	81
4.2.1. Introducción.....	81
4.2.2. La familia de genes tipo NAC en melón.....	83
4.2.3. Análisis filogenético de la secuencia de MELO3C016540.	84
4.2.4. Secuenciación del gen candidato en una colección de variedades de melón.....	86
4.2.5. Discusión	94
4.3. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> por TILLING.....	99
4.3.1. Introducción.....	99
4.3.2. Búsqueda de mutaciones en el gen candidato en la población de TILLING “CharMono”	100
4.3.3. Caracterización fenotípica de los mutantes	103

4.3.4. Discusión.....	108
4.4. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> por RNAi.	111
4.4.1. Introducción.....	111
4.4.2. Diseño y construcción del hpRNA.....	113
4.4.3. Preparación del vector binario y transformación de <i>Agrobacterium</i>	117
4.4.4. Discusión.....	117
4.5. Estudio transcriptómico de la maduración del fruto.....	119
4.5.1. Introducción.....	119
4.5.2. Estudio transcriptómico mediante secuenciación 454-Roche.	120
4.5.3. Discusión.....	137
5. Discusión general	141
6. Conclusiones	151
7. Bibliografía.....	155
8. Anexo.....	183

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introducción general.....	7
1.1. El melón (<i>Cucumis melo</i> L.).....	9
Figura 1.1: Reconstrucción filogenética del género <i>Cucumis</i>	9
Figura 1.2: Filogenia de la especie <i>C. melo</i> L.: Árbol filogenético de 27 accesiones de melón construido a partir de su genotipado con 18 SSRs.	11
Figura 1.3: Filogenia de la especie <i>C. melo</i> L.: Árbol filogenético de 74 accesiones de melón a partir de su genotipado con 768 SNPs.	12
Figura 1.4: Construcción y genotipado de la población de NILs “Piel de Sapo” x “Songwhan Charmi”.....	14
1.2. La maduración del fruto	17
Figura 1.5: Esquema de la biosíntesis y señalización del etileno.....	18
Figura 1.6 Ciclo de Yang.....	19
Figura 1.7: Modelo de regulación epigenética sobre la maduración en tomate y su relación con el control genético de <i>RIN</i> , <i>NOR</i> y <i>CNR</i>	25
Figura 1.8: Esquema simplificado de las principales rutas de síntesis de carotenoides y compuestos aromáticos a partir de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos.....	27
1.3. La maduración del fruto en melón.....	31
Figura 1.9: Esquema general de los procesos de maduración del fruto de melón y su división en función del papel del etileno en su regulación.	31
3. Material y métodos	43
3.10. Análisis bioinformático de secuencias	56
Figura 3.1: Análisis de un experimento de RNA-Seq.....	58
4. Resultados	63
4.1. Clonaje posicional del QTL <i>eth6.3</i>	65
Figura 4.1.1: Producción de etileno durante la maduración del fruto de las líneas PS, GF31, GF35 y GF40.....	66
Figura 4.1.2: Mapa genético de alta resolución del locus <i>eth6.3</i>	66
Figura 4.1.3: Esquema de los cruzamientos desarrollados durante el clonaje posicional de <i>eth6.3</i>	67
Figura 4.1.4: Distribución temporal de los experimentos llevados a cabo durante el clonaje posicional de <i>eth6.3</i>	68
Figura 4.1.5: Mapa físico del intervalo de <i>eth6.3</i> y posición de los marcadores utilizados en el cribado de la población 2012-F ₄	69
Figura 4.1.6: Mapa físico de alta resolución de <i>eth6.3</i>	71

Figura 4.1.7: Distribución de las fechas de dehiscencia expresadas en días después de la polinización (DAP) de las progenies de los recombinantes analizados en el año 2013.....	73
Figura 4.1.8: Distribución de las fechas de dehiscencia expresadas en días después de la polinización (DAP) de las progenies de los recombinantes analizados en el año 2014.....	74
4.2. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> mediante secuenciación.....	81
Figura 4.2.1: Análisis filogenético de la familia NAC en melón.....	82
Figura 4.2.2: Distribución de los genes de la familia NAC anotados en el genoma del melón.....	83
Figura 4.2.3: Posición física de los genes de la familia NAC anotados en el genoma del melón.....	84
Figura 4.2.4: Estructura del gen candidato <i>MELO3C016540</i>	84
Figura 4.2.5: Alineamiento múltiple del dominio NAC de 38 proteínas de la familia NAC de distintas especies.....	85
Figura 4.2.6: Análisis filogenético de la proteína <i>MELO3C016540</i> respecto a proteínas de la familia NAC de otras especies.....	86
Figura 4.2.7: Análisis filogenético y representación de los alelos del gen <i>MELO3C016540</i> en la colección de variedades del COMAV.....	88
Figura 4.2.8: Comparación de las secuencias proteicas de <i>MELO3C016540</i> en las variedades In-PS-T111, Con-SC y Can-Ved.....	92
Figura 4.2.9: Alineamiento múltiple de las secuencias de las variedades de melón en el polimorfismo INDEL-126.....	92
Figura 4.2.10: Bloques encontrados para el INDEL-126.....	94
4.3. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> por TILLING.....	99
Figura 4.3.1: Estructura del gen <i>MELO3C16540</i> utilizado para la búsqueda de mutantes en la colección de TILLING “CharMono”.....	100
Figura 4.3.2: Posición de las mutaciones detectadas en la población TILLING en la secuencia proteica de <i>MELO3C016540</i>	102
Figura 4.3.3: Posición de las sustituciones E59K, P129L y S164F respecto al dominio conservado NAC en <i>MELO3C016540</i>	103
Figura 4.3.4: Diferencias fenotípicas en las familias M2 durante la temporada de 2014.....	106
Figura 4.3.5: Diferencias fenotípicas en las familias M2 durante la temporada de 2015.....	108
4.4. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> por RNAi.....	111
Figura 4.4.1: Modelo de silenciamiento génico mediado por RNA en plantas.....	112
Figura 4.4.2: Selección de la diana de silenciamiento 200-NAC según la conservación de <i>MELO3C016540</i> respecto a la familia NAC de melón.....	113
Figura 4.4.3: Mapas de los plásmidos utilizados en el silenciamiento del gen <i>MELO3C016540</i>	115

Figura 4.4.4: Localización de la diana de silenciamiento 200-NAC en el gen <i>MELO3C016540</i>	115
Figura 4.4.5: Verificación de las construcciones pKan-200-NAC, pKan-HP y pART27-HP mediante digestión enzimática.	116
4.5. Estudio transcriptómico de la maduración del fruto.	119
Figura 4.5.1: Cuantificación por PCR semicuantitativa de la expresión de <i>CmACO1</i> en pulpa de fruto de las líneas PS y SC3-5-1 en diferentes estadios de maduración.....	120
Figura 4.5.2: Frutos en diferentes estadios de desarrollo y maduración de las líneas PS y SC3-5-1.....	120
Figura 4.5.3: Rendimiento de la secuenciación por 454-Roche tras el filtrado inicial con Newbler 2.6.	121
Figura 4.5.4: Efecto del filtrado con Trimmomatic 0.33 sobre la calidad de los nucleótidos a lo largo de las lecturas.....	122
Figura 4.5.5: Efecto del filtrado con Trimmomatic 0.33 sobre el número y la longitud de las lecturas.....	123
Figura 4.5.6: Agrupación jerárquica de las muestras tras el análisis de expresión.	124
Figura 4.5.7: Diferencias en el patrón de expresión de las muestras.....	125
Figura 4.5.8: Diagrama de Venn que contiene los genes expresados en común por las cuatro muestras.	125
Figura 4.5.9: Diagramas de Venn.	127
Figura 4.5.10: Abundancia de términos GO en los genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1.....	127
Figura 4.5.11: Análisis de enriquecimiento de términos GO en los genes SE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1.....	128
Figura 4.5.12: Análisis de enriquecimiento de términos GO en los genes IE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1.....	129
Figura 4.5.13: Manhattan plot.	129
Figura 4.5.14: Diferencias de expresión de los genes implicados en la ruta del etileno entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1 y de factores de transcripción relacionados con su regulación.	132
Figura 4.5.15: Abundancia de términos GO en los genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración.....	133
Figura 4.5.16: Análisis de enriquecimiento de términos GO en los genes IE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración.	134
Figura 4.5.17: Expresión de algunos genes de interés DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración.....	135
5. Discusión general	141
Figura 5.1: Análisis filogenético de las proteínas CmNAC y proteínas de la familia NAC de otras especies.	144
Figura 5.2: Expresión de los genes <i>CmNOR</i> , <i>MELO3C010632</i> , <i>MELO3C016536</i> y <i>MELO3C023195</i> durante la maduración del fruto de melón.	147

ÍNDICE DE TABLAS

3. Material y métodos	43
3.6. Genotipado	48
Tabla 3.2: Marcadores moleculares tipo SSR y CAPS utilizados en el mapeo fino de <i>eth6.3</i> y referencia donde fueron descritos.	49
Tabla 3.1: Diseño de amplicones para secuenciación por Sanger.....	49
Tabla 3.3: Diseño y posición de los marcadores moleculares tipo TaqMan y KASP utilizados en el mapeo fino de <i>eth6.3</i>	51
3.8. Detección de mutantes de TILLING.....	52
Tabla 3.4: “Primers” utilizados en las PCR N1 y N2 de los amplicones A1 y A2 en el cribado de la población de TILLING “CharMono”.....	53
3.9. Obtención de una construcción RNAi.....	54
Tabla 3.5: Secuencia y localización de los “primers” utilizados en la construcción RNAi.....	56
3.10. Análisis bioinformático de secuencias	56
Tabla 3.6: Lista de proteínas de la familia de factores de transcripción NAC de diversas especies y de función conocida con el código UniProt y la referencia del trabajo en el que fueron descritas.	57
4. Resultados.....	63
4.1. Clonaje posicional del QTL <i>eth6.3</i>	65
Tabla 4.1.1: Genotipo de los individuos utilizados para la generación de la población segregante 2012-F ₄	68
Tabla 4.1.2: Segregación de alelos para los marcadores flanqueantes en la población 2012-F ₄	69
Tabla 4.1.3: Genotipo con 24 SNPs de los 27 recombinantes en la región de <i>eth6.3</i> detectados durante la criba de la población 2012-F ₄	70
Tabla 4.1.4: Genotipado y fenotipado de los 17 recombinantes más informativos y mapeo fino de <i>eth6.3</i>	72
Tabla 4.1.5: Genes anotados en la región de 139 Kb comprendida entre los marcadores SNP-2.691.690 y SNP-2.826.073.....	75
Tabla 4.1.6: Genotipado y fenotipado de R24, R25 y R26 y mapeo fino de <i>eth6.3</i>	76
Tabla 4.1.7: Comparación entre tiempos de dehiscencia expresados en días tras la polinización (DAP) de las líneas GF31, GF35 y GF40 en las temporadas 2009, 2010, 2013 y 2014.....	78
4.2. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> mediante secuenciación.....	81
Tabla 4.2.1: Clasificación, genotipado y fenotipado de las variedades de melón del COMAV.....	88
Tabla 4.2.2: Estudio de asociación entre los 17 polimorfismos y el tipo de maduración.....	90

Tabla 4.2.3: Predicción del efecto de los polimorfismos G411T y G979A sobre la proteína <i>MELO3C016540</i>	91
Tabla 4.2.4: Tamaño de las familias de genes NAC descritas en plantas.....	95
4.3. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> por TILLING.....	99
Tabla 4.3.1: Listado de las familias M2 con mutaciones identificadas en el gen <i>MELO3C016540</i>	101
Tabla 4.3.3: Familias M2 cultivadas y fenotipadas en la campaña de verano de 2015.	105
Tabla 4.3.2: Familias M2 cultivadas y fenotipadas en la campaña de verano de 2014.	105
4.4. Validación del gen candidato para <i>eth6.3</i> por RNAi.	111
Tabla 4.4.1: Regiones homólogas a la diana de silenciamiento 200-NAC en el genoma del melón.....	114
4.5. Estudio transcriptómico de la maduración del fruto.	119
Tabla 4.5.1: Resumen de secuenciación, filtrado, mapeo y expresión génica.	122
Tabla 4.5.2: Análisis de expresión diferencial.	126
Tabla 4.5.3: Genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1.	130
Tabla 4.5.5: Comparativa de genes DE en este trabajo y en Saladié y colaboradores (2015).....	136
Tabla 4.5.4: Genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración	136

8. Anexo..... 183

Tabla A.4.1.1: Genotipado y fenotipado de la población PT-2013.....	185
Tabla A.4.1.2: Genotipado y fenotipado de las líneas GF31, GF35, GF40, SC y PS, utilizadas como controles de la población PT-2013.	190
Tabla A.4.1.3: Genotipado y fenotipado de la población PT-2014.....	191
Tabla A.4.1.4: Genotipado y fenotipado de las líneas GF31, GF35, GF40 y PS, utilizadas como controles de la población PT-2014.	192
Tabla A.4.1.5: Anotación de transposones entre los genes <i>MELO3C016538</i> y <i>MELO3C016540</i>	193
Tabla A.4.2.1: Localización y propiedades fisicoquímicas de las proteínas NAC en melón: tamaño, punto isoeléctrico y peso molecular.	193
Tabla A.4.3.1: Fenotipado de las familias M2 mutantes en la temporada 2014.....	195
Tabla A.4.3.2: Fenotipado de las familias M2 mutantes en la temporada 2015.....	196
Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (A).	199
Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (B).....	202
Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (C).	203
Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D).....	216
Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (E).	226

Tabla A.4.5.2: Resumen de términos GO en los genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1.	228
Tabla A.4.5.3: Análisis de enriquecimiento de términos GO de los genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1.	229
Tabla A.4.5.4: Resumen de términos GO en los genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración.	230
Tabla A.4.5.5: Análisis de enriquecimiento de términos GO de los genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración.	231
Tabla A.4.5.6: Genes de la ruta del etileno.	231

RESÚMENES

Resumen

La maduración del fruto es un proceso metabólico y fisiológico complejo, está altamente regulado e influye directamente sobre la calidad organoléptica y su valor económico. Un compuesto importante es el etileno, y en función de su patrón de síntesis los frutos pueden ser divididos en climatéricos y no climatéricos. En los frutos climatéricos ésta hormona vegetal coordina y acelera el proceso de maduración a través de la regulación a nivel transcripcional y traduccional de varios genes. Las rutas de regulación génica tanto dependientes como independientes de etileno coordinan el proceso en ambos tipos de maduración, aunque se conoce mucho menos sobre la maduración no climatérica. La existencia de variedades de melón con ambos tipos de maduración y el avanzado desarrollo de herramientas genéticas y genómicas convierten a esta especie en un buen modelo para el estudio de la maduración del fruto.

El QTL *eth6.3*, objeto de estudio de esta tesis doctoral, fue detectado junto con *eth3.5* durante la caracterización de la línea casi isogénica SC3-5-1 (portadora de los dos QTLs), obtenida a partir del cruzamiento entre “Piel de Sapo” (PS) y “Songwhan Charmi” (SC). Ambos QTLs son capaces de inducir una maduración climatérica por separado, pero cuando están juntos interaccionan produciendo un fenotipo climatérico más fuerte. En este trabajo se ha realizado el clonaje posicional de *eth6.3* a través del desarrollo de una población de mapeo obtenida a partir de un individuo con alelos de PS en homocigosis para *eth3.5* y segregante para *eth6.3*. El análisis fenotípico de 15 recombinantes en el intervalo del QTL permitió identificar el gen *MELO3C016540*, miembro de la familia de factores de transcripción tipo NAC en melón, como responsable de *eth6.3*. Para su validación se buscaron mutantes en una colección de TILLING con fondo climatérico, encontrándose dos familias con mutaciones dentro del dominio NAC que mostraron un retraso en el proceso de maduración respecto a frutos no mutados. El análisis de *MELO3C016540* en un panel con 54 variedades de melón, representativas de la variabilidad existente dentro de la especie, reveló una alta conservación en los haplotipos de este gen entre variedades con el mismo tipo de maduración que sugiere un papel central en la regulación de este proceso. Finalmente, también se inició una nueva aproximación para la caracterización de *MELO3C016540* mediante el desarrollo de construcciones genéticas para su silenciamiento mediante RNAi en líneas portadoras de *eth6.3*.

De forma complementaria, en la última parte de este trabajo de tesis se ha realizado un estudio transcriptómico del fruto de la línea SC3-5-1 y PS a lo largo de la maduración, observándose una reprogramación genética global entre frutos maduros de las dos líneas. Se encontró expresión diferencial de algunos genes implicados en procesos de maduración climatérica como la biosíntesis y señalización de etileno, el reblandecimiento de la pared celular y la biosíntesis de compuestos aromáticos, así como genes pertenecientes a las familias de factores de transcripción NAC, MADS-box, F-box y HD-zip.

En conjunto, este trabajo ha permitido profundizar en el estudio de la regulación de la maduración en melón y comenzar a entender las diferencias entre frutos climatéricos y no climatéricos de esta especie.

Summary

Fruit ripening is a complex and highly regulated metabolic and physiological process that has a great influence in the organoleptic quality and economical value of the fruit. Ethylene is the main plant hormone involved in ripening regulation and, depending on its expression pattern, fruits can be classified as climacteric and non-climacteric. In climacteric fruits, ethylene coordinates and accelerates ripening through gene regulation at the transcriptional and translational level. Ethylene-dependent and independent regulation pathways coordinate both kinds of ripening, but much less is known about non-climacteric ripening. The existence of both climacteric and non-climacteric genotypes and the advances in the development of genetic and genomic tools make melon a suitable model for fruit ripening studies.

The aim of this doctoral thesis in the study of QTL *eth6.3*, which was detected along with *eth3.5* during the characterization of near isogenic line SC3-5-1 (that harbors both QTLs), obtained from a cross between “Piel de Sapo” (PS) and “Songwhan Charmi” (SC). Both QTLs can induce climacteric ripening on their own, but together they interact producing a stronger climacteric phenotype. This work presents the positional cloning of *eth6.3* through the development of a mapping population obtained from an individual with PS homozygous alleles in *eth3.5* and segregant in *eth6.3*. Phenotypic analysis of 15 recombinant lines in the QTL interval allowed the identification of *MELO3C016540*, a NAC-domain transcription factor, as responsible of *eth6.3*. For validation, a TILLING collection in a climacteric background was screened for mutants. Two families with mutations in the well-conserved NAC-domain showed a delay in ripening when compared with wild-type individuals. The analysis of *MELO3C016540* in a collection of 54 melon varieties representing the existing variability within the species revealed that the haplotypes within this gene are highly conserved among varieties that show the same kind of ripening, suggesting a central role in its regulation. Finally, a new approach for the characterization of *MELO3C016540* was started by the development of genetic constructions for gene silencing mediated by RNAi in lines harboring *eth6.3*.

Complementarily, a fruit transcriptome study of lines SC3-5-1 and PS during ripening was performed, revealing a global genetic reprogramming between ripe fruits from both lines. Genes involved in climacteric ripening processes like ethylene biosynthesis and signaling, fruit softening, aroma biosynthesis, and transcription factor families NAC, MADS-box, F-box and HD-zip were differentially expressed.

In conclusion, this work has contributed to increase the knowledge of melon ripening regulation and to start uncovering the differences between climacteric and non-climacteric fruit ripening.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. El melón (*Cucumis melo* L.)

1.1.1. Taxonomía y filogenia

El melón (*Cucumis melo* L.) es una dicotiledónea perteneciente a la familia de las cucurbitáceas con un genoma diploide y un número cromosómico $2x=2n=24$. La familia de las cucurbitáceas contiene 130 géneros que incluyen alrededor de 800 especies (Kocyan *et al.* 2007). Algunas de las más comunes y que tienen mayor importancia económica son: dentro del género *Cucumis* el melón y el pepino (*C. sativus* L.); dentro del género *Citrullus* la sandía (*C. lanatus* L.) y dentro del género *Cucurbita* la calabaza (especies *C. moschata* L. y *C. máxima* L.) y el calabacín (*C. pepo* L.). En la Figura 1.1 se representa un árbol filogenético con 25 especies del género *Cucumis*, que en total contiene alrededor de 60 especies (Sebastian *et al.* 2010). En este género, el pepino es la única especie con un número cromosómico $2x=2n=14$ mientras que la mayoría son $2x=2n=24$, aunque hay algunas especies silvestres $2x=2n=48$ (Renner *et al.* 2007). La compatibilidad reproductiva entre especies es compleja (Singh & Yadava 1984) y no siempre depende del número cromosómico: por ejemplo *C. hystrix* ($2x=2n=24$) es compatible con pepino pero no con melón (Chen

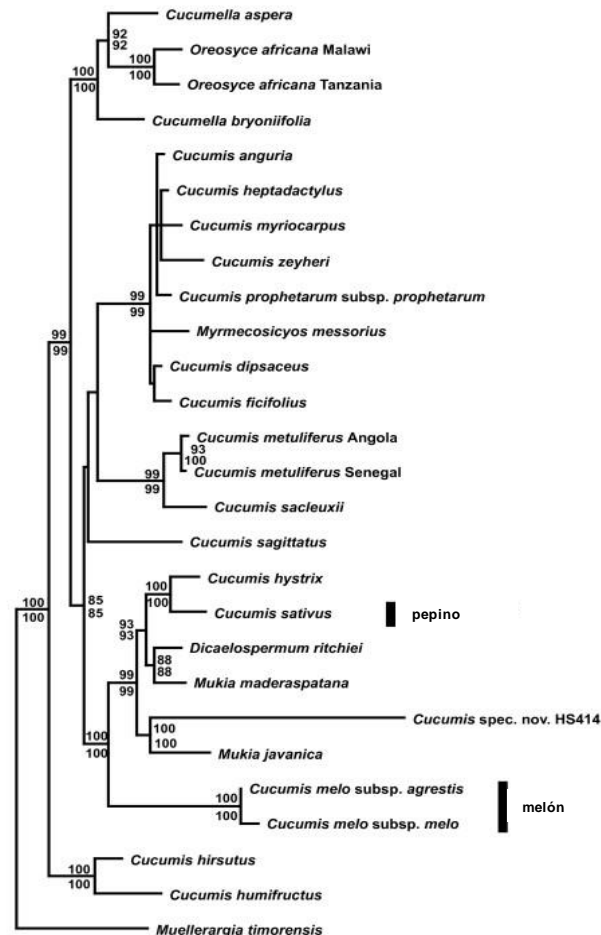


Figura 1.1: Reconstrucción filogenética del género *Cucumis*. Árbol construido a partir de la combinación de secuencias de DNA cloroplástico de 25 especies. El árbol está anclado en *Muellerargia timonensis*, la especie más cercana al género *Cucumis* (Renner *et al.* 2007). Los números indican el soporte del nodo mediante simulación bootstrap según el método de máxima parsimonia (superior, 1000 iteraciones) y máxima verosimilitud (inferior, 100 iteraciones). Adaptada de Renner *et al.* (2007).

Se han formulado varias hipótesis que apuntaban a un origen africano para la especie *C. melo* basadas en que el número cromosómico coincide con el de algunas especies silvestres africanas mientras que el pepino, de origen asiático, tiene un número cromosómico distinto (Kirkbride 1993; Chen *et al.* 1998). Tras el desarrollo de nuevas técnicas de genotipado y secuenciación esta hipótesis ha sido revisada y actualmente se considera que el origen del melón es asiático (Sebastian *et al.* 2010). El momento de divergencia entre los ancestros de pepino y melón se estima que sucedió aproximadamente hace 10 millones de años, y el origen de la especie *C. melo* hace 3 millones de años en la zona biogeográfica denominada Wallacea (formada por la confluencia de Australia y el sudeste asiático) (Sebastian *et al.* 2010). La diversificación de la especie comenzó en la India, considerada como el centro de diversificación primario, y continuó por zonas cercanas del sudeste asiático (Japón, China) y la región mediterránea (Afganistán, Irán, Iraq o Turquía), que son los centros secundarios de diversificación (Robinson & Decker-Walters 1997; Yi *et al.* 2009). La diversificación de la especie provocó una erosión genética observable en las variedades más lejanas al centro de origen (Kerje & Grum 2000; Monforte *et al.* 2003). Gran parte de la expansión que el melón muestra hoy en día se debe a las rutas comerciales entre los centros de diversificación y Europa a través de Europa del este, los Balcanes e Italia (Pitrat *et al.* 1999; Szabó *et al.* 2005). Actualmente se considera a España como un centro de diversificación secundario (Esteras *et al.* 2013). La llegada del melón a América se produjo durante el periodo colonial y desde entonces tanto su consumo como su cultivo han ido en aumento, promoviendo el desarrollo de nuevas variedades.

Tradicionalmente, el melón ha sido dividido en dos subespecies: *melo* y *agrestis*; y ambas contienen variedades tanto cultivadas y comestibles como totalmente silvestres (Jeffrey 1980). Las regiones en las que existe una mayor diversidad dentro de la especie son África y Asia, especialmente la India, donde también se concentran la mayor parte de las variedades silvestres. Las diferencias morfológicas en la hoja, planta y fruto dentro de la especie *C. melo* son tan grandes que en un principio se clasificaron algunas variedades de melón como especies distintas (como *C. flexuosus*, *C. conomon* o *C. momordica* entre otras que ahora se incluyen en *C. melo*). Actualmente se acepta la existencia de dos subespecies, originalmente clasificadas según la pubescencia del ovario, con un total de 16 grupos botánicos: subespecie *agrestis* (ovario glabro, grupos *conomon*, *makuwa*, *chinensis*, *momordica* y *acidulus*) y subespecie *melo* (ovario piloso, grupos *cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chate*, *tibish*, *dudaim* y *chito*) (Pitrat 2008).

La filogenia de estos grupos botánicos ha sido estudiada durante los últimos 25 años utilizando los marcadores moleculares disponibles en cada momento. En un trabajo utilizando 18 microsatélites (SSRs, “Simple Sequence Repeats”), Monforte y colaboradores (2003) estudiaron la variabilidad genética en una colección de 27 variedades incluyendo representantes de los principales grupos botánicos de las dos subespecies. El análisis de los resultados permitió la separación de las variedades en dos grandes grupos que en general se corresponden con su clasificación en dos subespecies (Figura 1.2). Recientemente, el desarrollo de una plataforma de genotipado masivo de polimorfismos de nucleótido simple (“Single Nucleotide Polymorphism”, SNP) permitió la construcción de un árbol filogenético con 74 accesiones de melón pertenecientes a 10 grupos botánicos, con una gran representación de variedades comerciales de los grupos *inodorus* y *cantalupensis* (Esteras *et al.* 2013). Tal y como puede verse en la Figura 1.3, los grupos botánicos más distantes entre sí son *inodorus* y *conomon*, mientras que otros grupos como *momordica*, *flexuosus* y *dudaim* ocupan una posición intermedia entre las subespecies. Dentro de la subsp. *melo* hay una clara separación genética entre los grupos *inodorus* y *cantalupensis*. Cabe destacar el hecho de

que la mayoría de *inodorus* presentan frutos no aromáticos, no climatéricos y con alto contenido en azúcar, mientras que los *cantalupensis* son aromáticos, climatéricos y con niveles más bajos de azúcar. Además, hoy en día la mayoría de las variedades comerciales y de alto interés económico pertenecen a estos dos grupos.

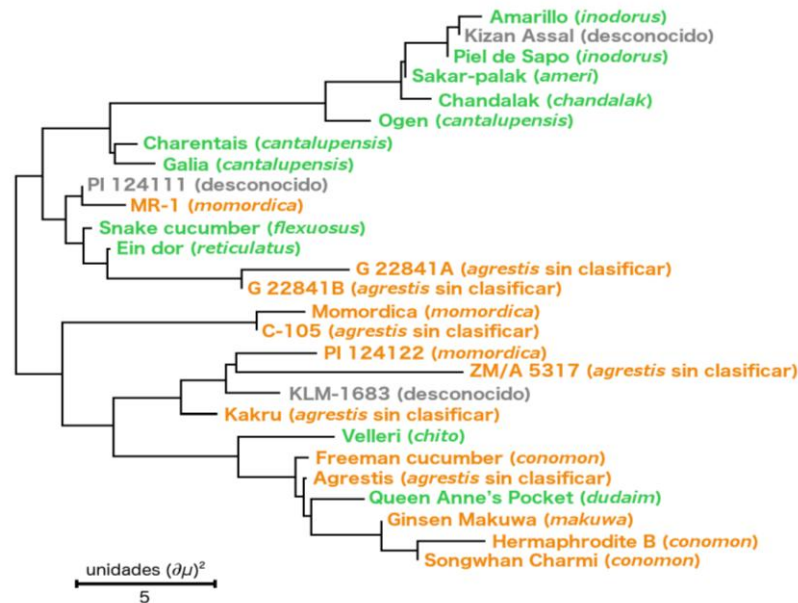


Figura 1.2: Filogenia de la especie *C. melo* L.: Árbol filogenético de 27 accesiones de melón construido a partir de su genotipado con 18 SSRs. La subespecie se indica mediante color (subsp. *agrestis*: naranja; subsp. *melo*: verde; desconocida: gris). En caso de estar disponible también se indica el grupo botánico según (Pitrat 2008): subespecie *agrestis* (grupos *conomon*, *makuwa*, *momordica* y sin clasificar) y subespecie *melo* (grupos *cantalupensis*, *reticulatus*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *dudaim* y *chito*). La distancia genética se indica mediante unidades $(\delta\mu)^2$ que son proporcionales al tiempo evolutivo. Adaptado de (Monforte *et al.* 2003).

1.1.2. Importancia económica de la especie

El melón es una especie hortícola muy importante económicamente a nivel mundial, su producción en el año 2013, último del que se tienen datos, fue de más de 29 millones de toneladas y su valor económico se estimó en 5.137 millones de dólares (FAO 2013, faostat3.fao.org). La cifra sigue creciendo de forma estable desde hace más de 25 años observándose una tendencia de aumento en el rendimiento gracias al desarrollo de nuevas variedades híbridas y a la mejora de los métodos de cultivo que compensa la disminución de la superficie cultivada en el mundo (cerca del millón de Ha en 2013). El rendimiento, junto con la calidad del fruto y la resistencia a plagas y enfermedades, son los principales objetivos de los programas de mejora de melón, de los que se hablará en detalle más adelante.

En la lista de mayores productores mundiales, China es el líder con más de 14 millones de toneladas, muy distanciado de Irán, Turquía, Egipto y la India, que producen entre 1,7 y 1 millón de toneladas al año. Por debajo del millón encontramos a Estados Unidos (980.000 toneladas) y a España, donde se cultivan 26.700 Ha y se producen 857.000 toneladas (FAO 2013). En cuanto a la exportación, España ocupa el primer lugar con 337.000 toneladas (el 61% de la producción mundial), principalmente a países como Francia, Alemania, Reino

Unido y Holanda. Los siguientes exportadores son Guatemala, Brasil, Estados Unidos y Holanda que exportan entre 157.000 y 118.000 toneladas al año (FAO 2012).

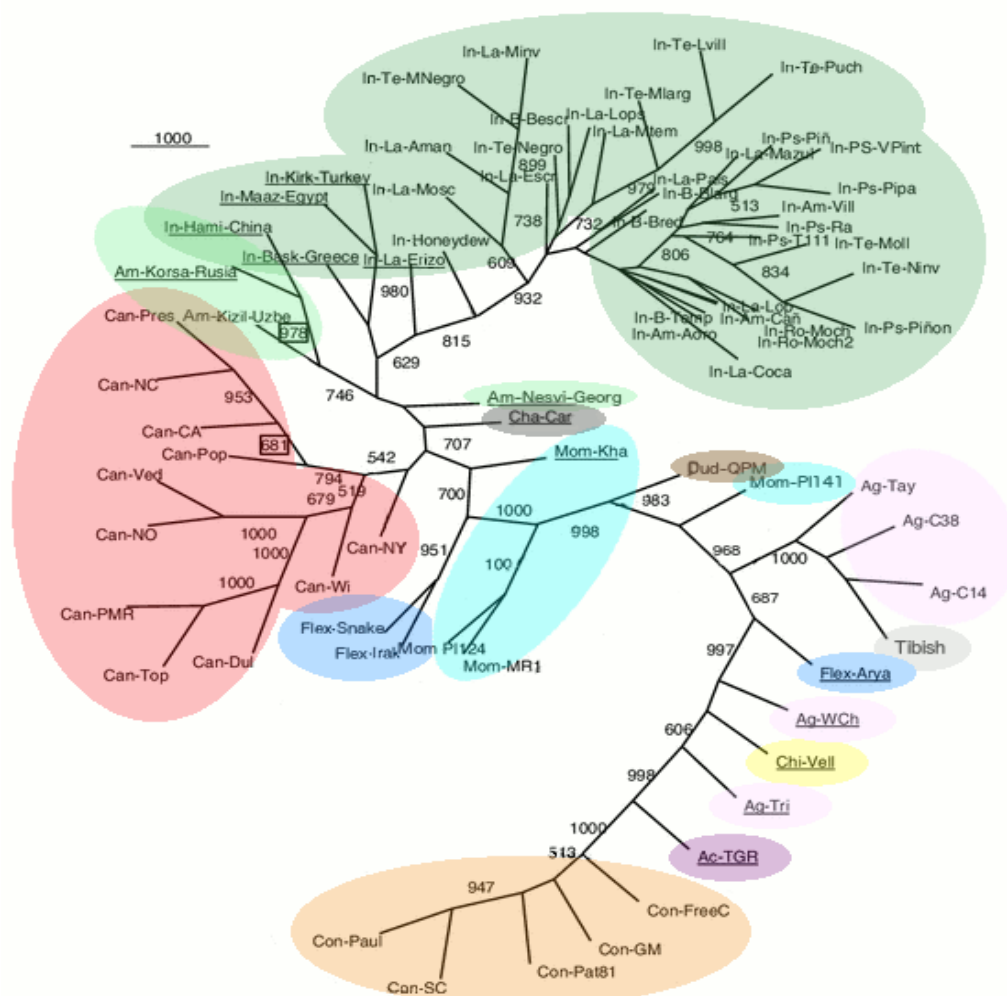


Figura 1.3: Filogenia de la especie *C. melo* L.: Árbol filogenético de 74 accesiones de melón a partir de su genotipado con 768 SNPs. El grupo botánico según (Pitrat 2008) se indica mediante color. Subsp. *agrestis*: *conomon* (5 accesiones, naranja), *momordica* (4 accesiones, azul claro), *acidulus* (1 accesión, morado) y *agrestis* sin clasificar (5 accesiones, magenta). Subsp. *melo* (*cantalupensis* y *reticulatus* (11 accesiones, rojo), *ameri* (3 accesiones, verde claro), *inodorus* (38 accesiones, verde oscuro), *flexuosus* (3 accesiones, azul oscuro), *chate* (1 accesión, gris oscuro), *tibish* (1 accesión, gris claro), *dudaïm* (1 accesión, marrón) y *chito* (1 accesión, amarillo). Adaptado de Esteras *et al.* (2013).

1.1.3. Herramientas genéticas y genómicas disponibles

Debido a la relevancia económica del melón durante los últimos 15 años se han desarrollado una serie de herramientas genéticas y genómicas que han ayudado a la comprensión de la biología de esta especie, así como a su mejora genética y el desarrollo de nuevas variedades.

Una de las primeras herramientas en ser desarrolladas fueron los marcadores moleculares. Se han desarrollado muchos tipos de marcadores moleculares en melón incluyendo SSRs y SNPs, que son actualmente los más utilizados ya que existen sistemas de detección de alto rendimiento automatizados y además son fácilmente transferibles a

programas de mejora vegetal. El desarrollo de marcadores moleculares es fundamental para la construcción de mapas genéticos, que en melón se construyen desde hace casi 20 años utilizando los distintos tipos de marcadores moleculares disponibles en cada momento. Actualmente, el mapa genético de referencia de melón es el publicado por Diaz y colaboradores (2011), que condensa en uno solo los diferentes mapas construidos a partir de varias poblaciones generadas con distintas variedades por distintos grupos de investigación. El mapa consenso contiene 1.592 marcadores moleculares (entre ellos 640 SSRs y 330 SNPs) distribuidos a lo largo de 12 grupos de ligamiento (GL). El último mapa de melón publicado ha sido desarrollado utilizando solamente SNPs (580 marcadores) y ha servido para mejorar el anclaje del genoma de referencia (Argyris *et al.* 2015b).

Uno de los avances más importantes para el estudio del melón es la secuenciación de su genoma (García-Mas *et al.* 2012). Se utilizó una línea doble haploide denominada DHL92 obtenida a partir del cruzamiento entre la variedad “Piel de Sapo” (PS) T111 (grupo *inodorus*) y la variedad exótica de origen coreano “Songwhan Charmi” (SC) PI 161375 (grupo *conomon*). El genoma secuenciado tiene un tamaño de 375 Mbp, que corresponde aproximadamente a un 83% del tamaño estimado (454 Mbp, Arumuganathan & Earle 1991). En la última versión disponible (v3.5.1) el 98% del genoma incluido en los “scaffolds” está anclado y el 90% de los “scaffolds” están orientados en los 12 pseudocromosomas del melón (Argyris *et al.* 2015b). La anotación del genoma de melón v3.5 contiene 27.427 genes, para los que se calcularon más de 22.000 árboles filogenéticos usando los genomas de otras 22 especies de plantas y algas, y que están depositados en la base de datos PhylomeDB (phylomedb.org, Huerta-Cepas *et al.* 2014). Recientemente han sido resecuenciadas siete variedades de melón, incluyendo los parentales de la DHL92, PS y SC (Sanseverino *et al.* 2015). Además de la secuencia de DNA genómico, también está disponible la secuencia del DNA cloroplástico (Rodríguez-Moreno *et al.* 2011) y el RNAoma de pequeño tamaño (“small RNAome”) (Gonzalez-Ibeas *et al.* 2011).

En melón fueron generadas varias genotecas de BACs (“Bacterial Artificial Chromosome”) (Luo *et al.* 2001; van Leeuwen *et al.* 2003; Boualem *et al.* 2008; Martin *et al.* 2009; Gonzalez *et al.* 2010) que fueron utilizadas para el clonaje posicional de algunos genes de interés y para la construcción del primer mapa físico de melón (Gonzalez *et al.* 2010), utilizado a su vez para asistir en el ensamblado del genoma de referencia.

Las colecciones de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) disponibles en melón (Gonzalez-Ibeas *et al.* 2007; Clepet *et al.* 2011) suman más de 129.067 entradas que corresponden a unos 24.440 unigenes que actualmente se encuentran recogidos en la base de datos de la “International Cucurbit Genomics Initiative” (ICuGI, www.icugi.org). Este recurso genómico sirvió de base para el diseño de una micromatriz de DNA con 17.510 unigenes representados (Mascarell-Creus *et al.* 2009), que ha sido utilizada en distintos estudios de raíz, fruto y resistencia a virus (Saladie *et al.* 2015; COMAV; CEBAS-CSIC). El transcriptoma también ha sido estudiado utilizando tecnología de secuenciación de alto rendimiento (RNA-seq) y ha servido para la identificación de marcadores polimórficos (Blanca *et al.* 2011; Blanca *et al.* 2012) y para análisis de expresión diferencial en distintos tejidos (Portnoy *et al.* 2011; Corbacho *et al.* 2013). En el capítulo 4.5 se describen con más detalle los estudios transcriptómicos, en especial aquellos llevados a cabo sobre el proceso de maduración del fruto en melón.

Una herramienta muy importante, especialmente para estudios de genética funcional, son las colecciones de mutantes. En melón han sido desarrolladas varias poblaciones de mutantes TILLING a partir de variedades comerciales de los grupos *reticulatus* (Tadmor *et*

al. 2007), *cantalupensis* (Dahmani-Mardas *et al.* 2010) e *inodorus* (Gonzalez *et al.* 2011), lo que facilita la identificación y la transferencia de mutantes interesantes hacia los programas de mejora vegetal. El TILLING se explica con más detalle en el capítulo 4.3, en el que se ha utilizado esta técnica para la validación del gen candidato para el QTL *eth6.3*.

1.1.4. Mapeado de QTLs

En los últimos 15 años se han desarrollado un gran número de poblaciones segregantes en melón incluyendo F₂, retrocruzamientos (“backcross”), líneas doble haploides (“double haploid lines”, DHLs) y líneas puras recombinantes (“recombinant inbred lines”, RILs). Los dos primeros tipos de población son los más sencillos de obtener pero los individuos no pueden ser perpetuados indefinidamente y son poco adecuadas para el análisis de caracteres cuantitativos de herencia compleja porque no se puede disponer de réplicas para el fenotipado, excepto en especies con reproducción vegetativa y árboles. Las poblaciones de DHLs y RILs, en cambio, son inmortales y permiten el mapeo de QTLs (“Quantitative trait *loci*”). Las variedades más frecuentemente utilizadas en la construcción de RILs pertenecen al grupo *cantalupensis* y han sido cruzadas con variedades tipo *conomon* (“Védrantais” x SC, Perin *et al.* 2002b), *momordica* (“Védrantais” x PI 124112, Perchepied *et al.* 2005a; “Harukei 3” x “AR 5”, Fukino *et al.* 2008), otras *cantalupensis* (“Védrantais” x “Isabelle”, Perchepied *et al.* 2005b) y líneas de mejora híbridas derivadas de cruzamientos exóticos (“Top Mark” x “USDA 846-1”, Cuevas *et al.* 2008). También se han cruzado variedades *reticulatus* por *momordica* (“Dulce” x PI 414723, Harel-Beja *et al.* 2010). Hasta la fecha no hay poblaciones de RILs con variedades tipo *inodorus* como parentales, pero sí se han utilizado la variedad PS (*inodorus*) y la variedad coreana SC (*conomon*) para la obtención de poblaciones F₂ (Oliver *et al.* 2001; Gonzalo *et al.* 2005) y una colección de DHLs (Monforte *et al.* 2004).

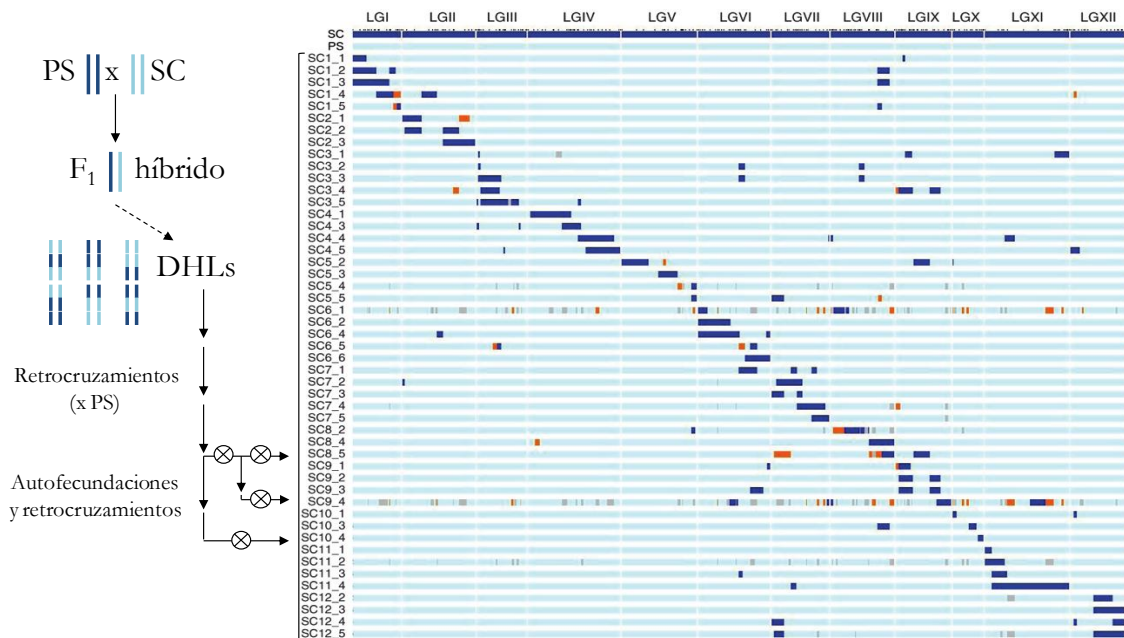


Figura 1.4: Construcción y genotipado de la población de NILs “Piel de Sapo” x “Songwhan Charmi”. Se resume el proceso de construcción de la colección detallado en (Eduardo *et al.* 2005): partiendo de 30 líneas doble haploides (DHLs) obtenidas a partir del cruzamiento de los dos parentales y tras cuatro generaciones de retrocruzamientos con PS y autofecundaciones, se obtuvo una colección de 57 líneas (de las cuales se representan 49

en esta figura) que contienen una introgresión del genoma de SC en el fondo genético de PS. A la derecha se representa gráficamente el genotipado de 49 NILs utilizando 978 SNPs (Argyris *et al.* 2015a) en el que las filas representan las líneas y las columnas los grupos de ligamiento (LG). El color azul claro representa el fondo genético de PS en homocigosis y los colores azul oscuro y naranja las introgresiones de SC en homocigosis y heterocigosis, respectivamente. En color gris se señalan las regiones en las que no hay datos de genotipado. Adaptado de Eduardo *et al.* (2005) y Argyris *et al.* (2015a).

Es especialmente relevante para este trabajo de tesis la colección de líneas casi isogénicas (“Near Isogenic Lines”, NILs) de melón (Eduardo *et al.* 2005). Este tipo de población consiste en un conjunto de líneas que contienen introgresiones en homocigosis de un parental donante en el fondo genético de un parental recurrente, y cuando la colección completa representa todo el genoma donante pueden ser consideradas como genotecas genómicas de introgresiones solapantes (Eshed & Zamir 1995). Las NILs son un recurso muy importante, ya que son líneas homocigotas que permiten el estudio de caracteres cuantitativos de herencia compleja como si tuvieran herencia simple, facilitando el mapeo de QTLs. La colección de NILs de melón contiene introgresiones de SC (parental donante) sobre el fondo genético de PS (parental recurrente) y está formada por 57 líneas que cubren el 85% del genoma de SC con un tamaño medio de 41 cM por introgresión (Eduardo *et al.* 2005). Recientemente la colección de líneas ha sido genotipada utilizando 978 SNPs, lo que supone una mejora sobre el original realizado con 62 SSRs, definiéndose como mayor precisión el tamaño de las introgresiones y encontrándose algunas introgresiones adicionales inicialmente no detectadas (Argyris *et al.* 2015a). En la Figura 1.4 se representa gráficamente el genotipo de 49 NILs y un resumen del proceso de obtención de la colección.

Gracias al desarrollo de poblaciones segregantes como RILs y NILs ha sido posible el estudio de numerosos caracteres de interés agronómico y, como se han utilizado variedades comerciales como parentales de dichas poblaciones, es posible que los resultados puedan ser aplicados en los programas de mejora genética. Un primer grupo de caracteres de interés agronómico serían aquellos relacionados con la calidad del fruto. En melón se han mapeado QTLs asociados con el peso y la forma (Perin *et al.* 2002b; Monforte *et al.* 2004; Eduardo *et al.* 2007; Zalapa *et al.* 2007; Paris *et al.* 2008; Diaz *et al.* 2014), la firmeza y la textura (Moreno *et al.* 2008), el contenido en azúcares y en ácidos orgánicos (Monforte *et al.* 2004; Eduardo *et al.* 2005; Sinclair *et al.* 2006; Eduardo *et al.* 2007; Paris *et al.* 2008; Obando-Ulloa *et al.* 2009; Park *et al.* 2009; Harel-Beja *et al.* 2010), el color de la pulpa (Monforte *et al.* 2004; Fukino *et al.* 2008; Paris *et al.* 2008; Cuevas *et al.* 2009; Harel-Beja *et al.* 2010), y la producción de compuestos volátiles y de otros metabolitos secundarios (Cuevas *et al.* 2008; Harel-Beja *et al.* 2010; Chaparro-Torres *et al.* 2015). En melón también se han caracterizado QTLs relacionados con la maduración climática, muy relevantes para este trabajo de tesis, que serán explicados en detalle en el apartado 1.3. Muchos de estos QTLs, junto con otros publicados antes de 2011 hasta un total de 370, fueron incluidos en el mapa genético consenso construido a partir de mapas anteriores realizados con clases comerciales de melón como “Charentais”, “Cantaloup”, “Piel de Sapo”, “Hami melon” y “U.S. Western Shipper” (Diaz *et al.* 2011).

Un segundo grupo de caracteres de interés agronómico serían los relacionados con la estabilidad y durabilidad del fruto postcosecha, para los que se también se han localizado QTLs en melón (Fernández-Trujillo *et al.* 2007).

Por último, el tercer grupo de caracteres de interés agronómico consistiría en las resistencias a plagas y enfermedades, muy demandadas tanto por productores como por mejoradores. En melón se han mapeado genes mayores de resistencia a varios virus (Perin *et al.* 2002b; Essafi *et al.* 2009; Guiu-Aragón *et al.* 2014), a hongos responsables de la fusariosis (Brotman *et al.* 2005; Perchepped *et al.* 2005b) y al oídio (Perchepped *et al.* 2005a; Fukino *et al.* 2008; Yuste-Lisbona *et al.* 2011).

1.1.5. Identificación de genes de interés mediante clonaje posicional

Tras la detección de QTLs o genes mayores y su mapeado a una región del genoma del melón, el siguiente paso para la comprensión genética de los caracteres es la identificación del gen o genes responsables de las diferencias fenotípicas. La estrategia del clonaje posicional se basa en la identificación de marcadores genéticos estrechamente ligados al gen y a la generación de eventos de recombinación próximos al mismo, de forma que tras varios eventos de recombinación e incrementando la resolución del mapa genético, los marcadores más ligados al gen son utilizados para la construcción de un mapa físico en el que será seleccionado el gen candidato.

Aunque en melón hay disponibles mapas genéticos saturados y una gran cantidad de marcadores moleculares, el proceso de clonaje posicional es difícil y, comparado con el número de caracteres estudiados el número de genes clonados sigue siendo bajo. Debido a la dificultad añadida de estudiar caracteres de herencia compleja, hasta la fecha en melón no ha sido clonado ningún QTL, aunque sí algunos genes mayores. En esta especie se han clonado los genes mayores *Fom-1* y *Fom-2* responsables de la resistencia a *Fusarium oxysporum* razas 0,2 y 0,1 respectivamente (Joobeur *et al.* 2004; Brotman *et al.* 2013); el gen *Vat*, responsable de la resistencia a la transmisión de virus por áfidos (Pauquet *et al.* 2004); el gen *nsv*, responsable de la resistencia al virus *MNSV* (Nieto *et al.* 2006). Relacionados con la fisiología de la flor, han sido clonados los genes *a* (*andromonoecious*) y *g* (*gynoecious*), responsables de la determinación sexual en melón y cuyas combinaciones dan lugar a los distintos tipos de flor: *AAGG* (monoicas, flores masculinas en el tallo principal y femeninas en las ramas laterales), *aaGG* (andromonoicas, flores masculinas en el tallo principal y hermafroditas en las ramas laterales) *AAgg* (ginoicas, sólo flores femeninas en ramas laterales) y *aagg* (hermafroditas, sólo flores hermafroditas en ramas laterales) (Boualem *et al.* 2008; Martin *et al.* 2009). Recientemente, también han sido clonados los genes *CmPH*, responsable de la acidez del fruto de melón (Cohen *et al.* 2014); *CmOR*, que gobierna la pigmentación de la pulpa del fruto (Tzuri *et al.* 2015); y *CmKFB*, involucrado en la pigmentación del exocarpo del fruto (Feder *et al.* 2015).

Tras la selección de un gen candidato mediante clonaje posicional hay varios métodos que pueden utilizarse para su validación. De los genes mayores clonados en melón *Fom-1* y *Fom-2* fueron validados mediante la evaluación de un panel de accesiones; *Vat*, *nsv* y *CmPH* y *CmKFB* mediante expresión heteróloga; *CmOR* mediante la evaluación de un panel de accesiones y expresión heteróloga; y finalmente *a* y *g* mediante la obtención de mutantes por TILLING. Hasta la fecha ningún gen mayor ha sido validado mediante transformación genética en melón debido a la dificultad que conlleva obtener plantas transgénicas en esta especie. En el presente trabajo se utilizan como métodos de validación del gen candidato la evaluación de un panel de variedades (cap. 4.2), el TILLING (cap. 4.3) y la transformación genética (cap. 4.4).

1.2. La maduración del fruto

Los frutos son una fuente indispensable de alimento para la humanidad y aportan una gran cantidad de nutrientes esenciales para la dieta y beneficiosos para la salud como azúcares, fibra, carotenoides, polifenoles, esteroides, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados (revisado por Seymour *et al.* 2013). Por eso, los frutos han suscitado un gran interés entre la comunidad científica que ha buscado entender los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo y maduración para mejorar la calidad del fruto y optimizar las técnicas de producción y de manipulación post cosecha (Handa *et al.* 2014).

Clásicamente, la maduración del fruto ha sido dividida en dos categorías: climatérica y no climatérica (McMurchie *et al.* 1972; Lelièvre *et al.* 1997). Esta clasificación está basada en la presencia de un aumento en la respiración en el fruto acompañada de una rápida producción de la hormona vegetal etileno al comienzo de la maduración climatérica. Por otro lado, en los frutos no climatéricos, la tasa de respiración y producción de etileno se mantienen bajas y el proceso de maduración es más lento. Algunas especies con frutos típicamente climatéricos son la manzana, el aguacate, el plátano, la pera, el melocotón y el tomate; y especies como la fresa, la uva y las naranjas serían ejemplos de frutos no climatéricos.

La maduración del fruto es un proceso complejo y altamente regulado durante el cual se producen una serie de cambios fisiológicos y metabólicos con el fin de proteger las semillas de las condiciones ambientales y favorecer su dispersión (Giovannoni 2001). Aunque existe una gran variabilidad entre especies, la mayoría de los cambios sucedidos en el proceso de maduración están relacionados con la síntesis de pigmentos, el desarrollo de sabor y olor, la acumulación de azúcares y la modificación de la textura (Hiwasa-Tanase & Ezura 2014). El hecho de que ambos tipos de maduración compartan ciertas características indica que existen procesos moleculares comunes a pesar de las diferencias en la síntesis de etileno y la respiración. En cuanto al sistema de regulación de la maduración, cabe destacar su complejidad ya que están implicadas hormonas vegetales, factores de transcripción y factores ambientales como la luz y la temperatura (Giovannoni 2004).

Gran parte del conocimiento actual sobre la maduración proviene de trabajos en tomate, especie modelo de la maduración climatérica (Alexander & Grierson 2002; Klee 2004). La maduración no climatérica, mucho menos estudiada, tiene como especie modelo la fresa. En el caso del melón se dan ambos tipos de maduración dentro de la especie, pudiendo encontrar frutos climatéricos de la variedad *cantalupensis* y no climatéricos de la variedad *inodorus*, por lo que esta especie representa un buen sistema para el estudio de ambos tipos de maduración (Ezura & Owino 2008). La maduración del fruto en melón, tema central de esta tesis, será explicada con más detalle en el apartado 1.3.

1.2.1. Biosíntesis de etileno durante la maduración del fruto

El etileno es una hormona vegetal que está implicada en una gran cantidad de procesos muy importantes para el desarrollo de la planta (como el desarrollo floral, la determinación sexual, la maduración y la abscisión del fruto y la senescencia en diversos órganos vegetales) y para los mecanismos de defensa frente a estrés biótico y abiótico (Abeles *et al.* 1992). Aunque todas las plantas sintetizan etileno a un nivel basal y como respuesta a estrés, en los frutos climatéricos el etileno juega un papel muy importante en la maduración. En estos tipos se produce un rápido incremento en la biosíntesis de etileno al inicio del proceso de maduración y, mediante una regulación autocatalítica, induce la

producción de más etileno, acelerando todos los cambios bioquímicos y fisiológicos que dan lugar al fruto maduro (McMurchie *et al.* 1972).

En las plantas, el etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina en tres reacciones consecutivas, representadas en la Figura 1.5: (1) la conversión de *L*-metionina en *S*-Adenosil-*L*-metionina (SAM); (2) la conversión de SAM en ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC); y (3) la conversión de ACC en etileno (Zarembinski & Theologis 1994).

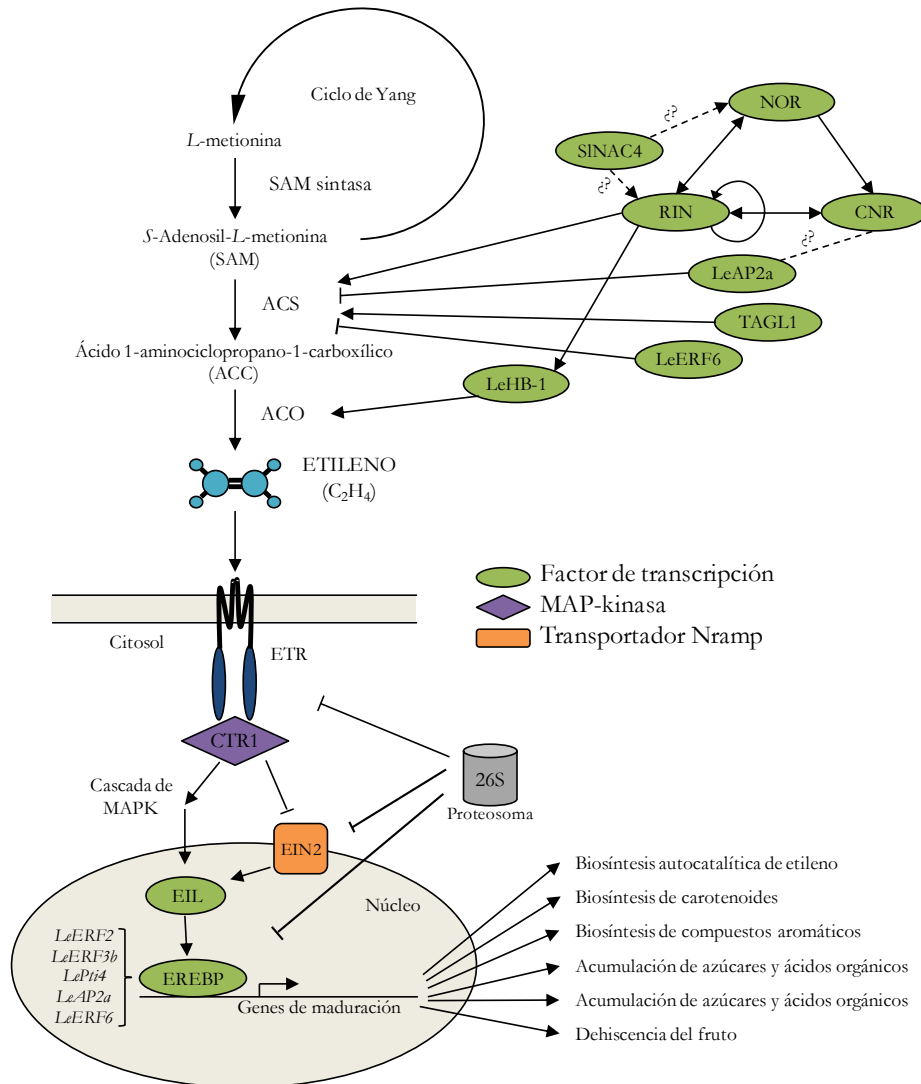


Figura 1.5: Esquema de la biosíntesis y señalización del etileno. Se representa su biosíntesis a partir de *L*-metionina, su percepción y la transmisión de señal hasta el núcleo, en donde desencadena una cascada de factores de traducción (se representan los más importantes en tomate) que regulan la expresión de los procesos de maduración del fruto. También se representa el control a nivel de estabilidad proteica llevado a cabo por el proteosoma 26S. En la parte superior se representan las interacciones entre los principales reguladores transcripcionales descritos en tomate (NOR, RIN, CNR, LeHB-1, LeAP2a, TAGL1, LeERF6 y SINAC4) y el control de la expresión que se ejercen entre ellos o sobre las dos principales enzimas biosintéticas de etileno: ACO y ACS. Las líneas con punta de flecha y punta roma indican activación e inhibición, respectivamente. Las líneas punteadas indican ausencia de evidencia experimental directa. Adaptado de Vegas (2014).

La síntesis de etileno a partir de metionina forma parte del ciclo de Yang, esquematizado en la Figura 1.6, que recicla la 5-metiliodenosina, producto secundario de la conversión de SAM en ACC, para volver a formar *L*-metionina (Yang & Hoffman 1984). Las tres enzimas que catalizan estas reacciones son, respectivamente: SAM sintasa, ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), y su regulación es uno de los puntos clave del control de la maduración climatérica. El proceso de biosíntesis de etileno en general fue estudiado en *Arabidopsis* aunque su implicación en la maduración del fruto se estudió en tomate (Klee 2004). En tomate, la familia ACS está compuesta por nueve genes, de los cuales solamente dos (*LeACS2* y *LeACS4*) están implicados en la síntesis climatérica de etileno (revisado por Lin *et al.* 2009). La familia ACO en tomate consta de cinco genes, de los cuales *LeACO1* es la que mayor expresión presenta durante la maduración del fruto, aunque *LeACO3* y *LeACO4* también podrían estar implicados en el proceso (Lin *et al.* 2009).

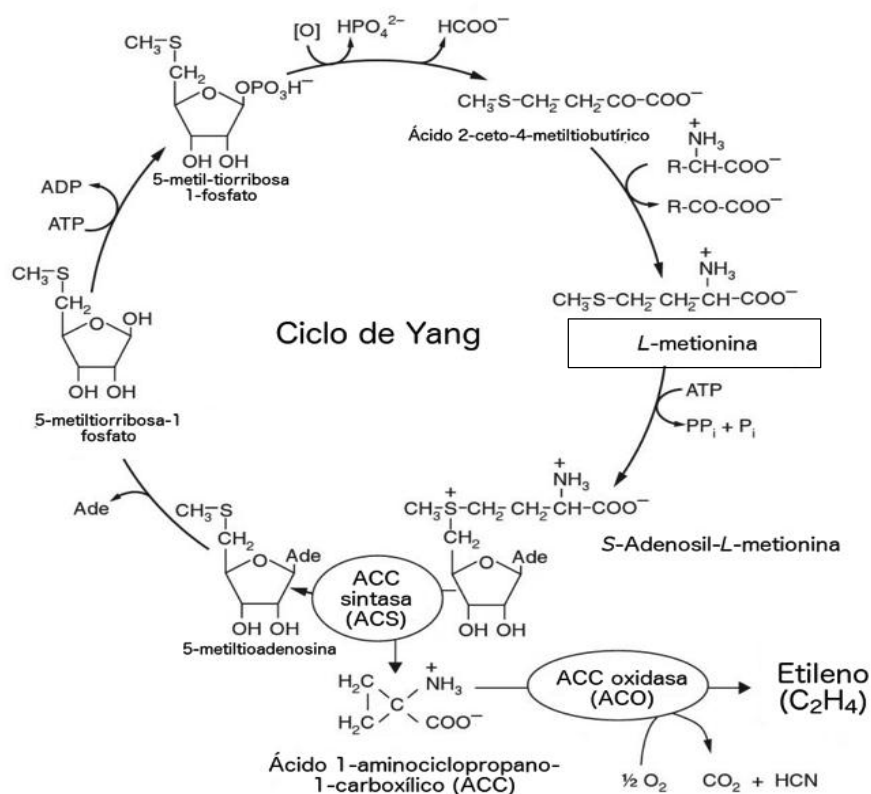


Figura 1.6 Ciclo de Yang. Se representan esquemáticamente las principales reacciones que forman parte del ciclo de Yang, o ciclo de la metionina, en el que el producto secundario de la conversión de *S*-Adenosil-*L*-metionina en ACC es reciclado en *L*-metionina a través de cuatro reacciones enzimáticas. Las principales enzimas biosintéticas de etileno (ACO y ACS) se destacan con círculos. Adaptado de Grierson (2014).

La biosíntesis de etileno está regulada a nivel transcripcional y postranscripcional. Tradicionalmente, numerosos trabajos han considerado la expresión de *ACS* como el principal punto de control sobre la síntesis de etileno, pero también se han encontrado evidencias de que un control similar existe sobre *ACO* a nivel transcripcional (Lin *et al.* 2009). Algunos factores de transcripción implicados son *RIN*, *TAGL1* y *LeHB-1*, de los que se hablará más adelante. La regulación postranscripcional, mediante el control de la estabilidad de las proteínas, se ha estudiado en el caso de las ACS, que son fosforiladas para

evitar su degradación por parte del proteosoma 26S (Liu & Zhang 2004; Joo *et al.* 2008), pero no se conoce si existen mecanismos similares en el control de las ACO.

Los componentes de la ruta de transducción de señal del etileno han sido descubiertos gracias al estudio de mutantes en la respuesta a etileno de *Arabidopsis* (Guo & Ecker 2003) pero también han sido identificados los genes implicados en tomate y que se encuentran representados en la Figura 1.5 (Giovannoni 2004). El primer paso de la señalización consiste en la percepción del etileno por parte de unos receptores de membrana denominados ETR (“Ethylene Receptor”). Estos receptores actúan como reguladores negativos de la señalización: en ausencia de etileno suprimen activamente la señal de etileno. En presencia de la hormona se elimina la supresión y son capaces de transmitir la señal al siguiente elemento de la ruta. En tomate se han descrito siete receptores ETR: *LeETR1*, *LeETR2*, *NR*, *LeETR4*, *LeETR5*, *LeETR6* y *LeETR7* (Klee & Giovannoni 2011). Una mutación en el receptor *NR*, el primero en ser caracterizado, es la responsable del fenotipo del mutante *Nr* (“*Never Ripe*”), que muestra una insensibilidad a etileno tanto endógeno como exógeno en todos los tejidos analizados, y que inhibe el proceso de maduración del fruto (Lanahan *et al.* 1994; Yen *et al.* 1995). La expresión de los receptores varía según el tejido, siendo *NR*, *LeETR4* y *LeETR6* los más abundantes durante la maduración del fruto (Klee & Giovannoni 2011). Al unirse a etileno, los ETR interactúan con el regulador negativo CTR (“Constitutive Triple Response”), inactivándolo. Los genes *CTR* pertenecen a la familia de MAP-kinasa kinasa kinasa (MAPKKK) y forman parte de la cascada de señalización de la hormona (Gao *et al.* 2015). En tomate la familia *CTR* consta de cuatro genes, de los cuales *LeCTR1*, *LeCTR3* y *LeCTR4* muestran expresión específica en tejidos del fruto durante el proceso de maduración (Leclercq *et al.* 2002; Adams-Phillips *et al.* 2004). El resultado de la inactivación de *CTR* es la activación de un regulador positivo llamado *EIN2* (“Ethylene Insensitive 2”) (Hirayama & Alonso 2000). *EIN2* pertenece a familia de transportadores de metales *Nramp*, su expresión es independiente de etileno y no muestra diferencias entre los distintos estadios de desarrollo y maduración del fruto (Roman *et al.* 1995). Algunos autores han propuesto que podría ser un centro de integración de la señal de varias hormonas durante el desarrollo en plantas (Cara & Giovannoni 2008). El siguiente paso en la ruta de señalización es la activación por parte de *EIN2* de miembros de la familia de factores de transcripción *EIL* (“*EIL3-like*”). En tomate, la familia *EIL* consta de cuatro genes (Tieman *et al.* 2001), de los cuales solamente *LeEIL4* muestra expresión dependiente de etileno y las otras tres (*LeEIL1-3*) son reguladores positivos de la respuesta a etileno (Cara & Giovannoni 2008; Yokotani *et al.* 2009). Las proteínas *EIL* controlan la expresión de genes *ERF* (“*Ethylene Response Factor*”) a través del reconocimiento de motivos PERE (“*Primary Ethylene Response Elements*”) en sus regiones promotoras (Solano *et al.* 1998). Las proteínas *EIL* inician una cascada de factores de transcripción que incluyen a las proteínas *ERF* y que tiene como resultado la expresión de genes relacionados con la maduración climatérica del fruto. Los genes *ERF* (también referidos como *EREBP* de “*Ethylene-Response Element-Binding Factor*”) contienen un dominio muy conservado de unión a DNA denominado AP2/*ERF* a través del cual regulan la expresión de genes relacionados con los procesos de maduración climatérica del fruto. En tomate se han caracterizado varios *ERF* como *LeERF1-6*, *LePti4-6* y *LeAP2a* (Tournier *et al.* 2003; Klee & Giovannoni 2011; Lee *et al.* 2012), de los cuales *LeERF2*, *LeERF3b*, *LePti4*, *LeAP2a* y *LeERF6* muestran acumulación en el fruto maduro. Sharma y colaboradores (2010) detectaron 85 genes *ERF*, de los cuales 57 mostraron expresión deferencial entre las diferentes etapas del desarrollo y maduración del fruto en tomate.

En la transducción de señal del etileno la regulación gira en torno a los receptores ETR. Su naturaleza de regulador negativo de la maduración y el hecho de que la unión a etileno

provoque su degradación sugiere un papel central en la determinación del inicio de la maduración y en la sensibilidad a la hormona (Kevany *et al.* 2007).

1.2.2. Regulación genética de la maduración del fruto

El control del proceso de maduración ha sido objeto de muchos estudios que apuntan hacia el etileno como el principal regulador en los frutos climatéricos a través del control de la expresión de genes que contribuyen al proceso de maduración, incluida la propia síntesis de etileno (Giovannoni 2004; Barry & Giovannoni 2007). Sin embargo, algunos aspectos de la maduración del fruto en especies climatéricas no están exclusivamente regulados por etileno. En melón, papaya y pera se ha estudiado la relación entre la hormona y los diferentes procesos de maduración encontrándose diferencias remarcables entre las tres especies. Por ejemplo, el reblandecimiento de la pulpa es totalmente dependiente de etileno en pera mientras que en papaya y melón el proceso lo es tan solo parcialmente (Flores *et al.* 2001; Hiwasa *et al.* 2003; Moya-León *et al.* 2004). La complejidad de los procesos llevados a cabo durante la maduración del fruto sugiere la presencia de un sistema de regulación a nivel transcripcional que coordine la producción de la hormona dentro del programa de desarrollo del fruto (Giovannoni 2004; Klee & Giovannoni 2011).

Gracias al estudio de mutantes para la maduración en tomate, se han podido clonar tres factores de transcripción que actúan como reguladores clave del proceso: *RIN* (“ripening-inhibitor”), *CNR* (“Colorless non-ripening”) y *NOR* (“non-ripening”) (Vrebalov *et al.* 2002; Manning *et al.* 2006; Klee & Giovannoni 2011). Las mutaciones *rin*, *Cnr* y *nor* dan lugar a frutos completamente desarrollados y con semillas fértiles pero que no inician la maduración y permanecen en estadio “mature green”. Esto se debe a que se produce una inhibición de los procesos característicos de la maduración climatérica del fruto como la transición hacia una biosíntesis autocatalítica de etileno, el incremento de la tasa de respiración, la degradación de clorofilas y síntesis de pigmentos, el reblandecimiento de la pulpa y el desarrollo de aromas (Robinson & Tomes 1968; Tigchelaar *et al.* 1973; Tigchelaar & McGlasson 1978; Thompson *et al.* 1999; Kovacs *et al.* 2009). Además, los frutos de los tres mutantes no maduran tras la aplicación externa de etileno pero sí se produce un aumento de expresión de los genes de respuesta a esta hormona tanto en el fruto como en otros tejidos (Giovannoni 2007). Estas características sugieren que el control de estos tres factores de transcripción sobre el proceso de maduración climatérica está situado por encima del ejercido por el etileno, del que también controlan su biosíntesis, y que probablemente sean elementos reguladores muy conservados tanto en frutos climatéricos como no climatéricos (Klee & Giovannoni 2011). En la Figura 1.5 se esquematiza el control ejercido por estos tres factores de transcripción, junto con el de otros descritos más adelante, sobre el proceso de maduración.

RIN (también denominado *LeMADS-RIN*) codifica para un factor de transcripción de la familia MADS-box cuya expresión se localiza en el núcleo y solo se acumula a partir del inicio de la maduración (Vrebalov *et al.* 2002). La proteína *RIN* forma dímeros y es capaz de unirse a motivos *CArG* en los promotores de más de 200 genes, entre los que se incluyen los factores de transcripción *NOR*, *CNR*, *TDR4* y *HB-1*, además del propio promotor de *RIN*, y de otros genes relacionados con la biosíntesis de etileno, la producción de compuestos aromáticos y la degradación de la pared celular (Ito *et al.* 2008; Fujisawa *et al.* 2011; Martel *et al.* 2011; Osorio *et al.* 2011). Estudios de interacción entre *RIN* y varios genes implicados en la síntesis de etileno sugieren que *RIN* sería el responsable de la transición hacia la biosíntesis climatérica de etileno induciendo directamente la expresión de *LeACS2* e indirectamente la de otros genes como *LeACS4* (Barry *et al.* 2000; Yokotani *et*

al. 2009; Fujisawa *et al.* 2011). Estudios en fresa, especie de frutos no climatéricos, revelaron que un ortólogo de *RIN* (*FaMADS9*) se expresa durante la maduración y que su silenciamiento mediante RNAi provoca un retraso en el proceso de maduración, por lo que este gen podría representar un mecanismo de control muy conservado entre ambos tipos de maduración (Vrebalov *et al.* 2002; Seymour *et al.* 2011). En silenciamiento de un miembro de la misma familia que *RIN* también produce un fenotipo similar en arándano (especie de maduración no climatérica) (Jaakola *et al.* 2010).

El mutante *Cnr* está causado por una mutación epigenética que aumenta el nivel de metilación en el promotor de un factor de transcripción de la familia SBP-Box (“SQUAMOSA promoter binding protein”) denominado *CNR*, disminuyendo su expresión (Manning *et al.* 2006). La proteína *CNR* es capaz de unirse a promotores de la familia de genes *SQUAMOSA*, que son factores de transcripción de la familia MADS-box (Huijser *et al.* 1992). Las proteínas *RIN* y *CNR* interactúan controlándose la expresión mutuamente, aunque no se conoce el mecanismo, demostrando la gran complejidad de la red de regulación de estos factores de transcripción (Martel *et al.* 2011).

Una mutación en el gen *NOR* (también denominado *SINAC-NOR*), perteneciente a la familia NAC de factores de transcripción, es la responsable del fenotipo del mutante *nor*, el menos estudiado de los tres (patente US 6.762.347 B1, Giovannoni 2007). Los genes NAC forman una de las familias de factores de transcripción más grandes en *Arabidopsis* y están relacionados con una gran variedad de procesos biológicos como el crecimiento y el desarrollo de la planta, la defensa frente a estrés biótico y abiótico, la senescencia y la maduración del fruto (revisión por Puranik *et al.* 2012). Cabe destacar la existencia de otro mutante natural en el *locus* *NOR* (Patente WO 2009/112546 A1) denominado *dfd* (“delayed fruit deterioration”) en algunas publicaciones, que presenta una larga vida postcosecha y una reducción en el reblandecimiento de la pulpa del fruto respecto a los frutos sin mutar. La mutación provoca que en los frutos *dfd* el depósito de cutina continúe durante toda la maduración, en contraste con los frutos sin mutar donde el proceso disminuye en las últimas fases, reduciendo la pérdida de agua mediante transpiración y manteniendo una alta turgencia celular, que a su vez reducen el reblandecimiento de la pulpa (Saladie *et al.* 2007).

Los factores de transcripción *RIN*, *CNR* y *NOR* juegan un papel central en el control global del proceso de maduración pero las interacciones entre ellos y el modo en el que actúan es todavía objeto de estudio. La principal hipótesis es que *NOR* y *RIN* actúan conjuntamente en la regulación de la maduración (Giovannoni *et al.* 1995; Thompson *et al.* 1999) en algún punto por encima del control de *CNR* (Cara & Giovannoni 2008). Recientemente, Osorio y colaboradores (2011) sugirieron que *NOR* podría regular en un orden superior a *RIN* porque tiene un mayor control sobre la síntesis de etileno y la expresión de genes relacionados con la maduración.

Otros factores de transcripción que también están involucrados en la regulación de la maduración en tomate son *TAGL1*, *LeHB-1*, *SINAC4*, *LeAP2a* y *LeERF6*.

TAGL1 (“TOMATO AGAMOUS-LIKE 1”) es otro factor de transcripción de la familia MADS-box que regula positivamente la maduración interaccionando físicamente con el promotor de *LeACS2* (Itkin *et al.* 2009; Vrebalov *et al.* 2009). Sorprendentemente, la sobreexpresión de *TAGL1* da lugar a una gran variedad de alteraciones fenotípicas en las flores incluyendo la formación de sépalos carnosos en los que se acumula licopeno. La inserción de un elemento T-DNA en la región 5'-UTR del gen (mutante *Arlequin* o *Alq*) causa su expresión ectópica y también da lugar a la formación de sépalos carnosos

(Gimenez *et al.* 2010). Curiosamente, la expresión ectópica de *TAGL1* en los mutantes *rin* y *nor* causa una recuperación parcial de la maduración del fruto, sugiriendo que *TAGL1* es un factor de transcripción situado por debajo de *RIN* y *NOR* en la cascada de regulación, aunque también pone de manifiesto la complejidad de las relaciones entre estos factores de transcripción (Vrebalov *et al.* 2009).

LeHB-1 es un factor de transcripción perteneciente a la familia HD-zip y es necesario, a través de su interacción con el promotor, para la expresión de *LeACO1* en tomate. La expresión de *LeHB-1* es alta durante el desarrollo del fruto pero disminuye al inicio de la maduración, y su silenciamiento provoca una disminución de la expresión de *LeACO1* junto con un descenso en la síntesis de etileno que retrasa en la maduración del fruto (Lin *et al.* 2009).

El factor de transcripción *SNAC4* es el que ha sido descubierto más recientemente y pertenece a la familia de genes NAC (Zhu *et al.* 2014). Este gen está relacionado con la regulación de la acumulación de carotenoides en tomate, es un regulador positivo de la maduración del fruto y también juega un papel importante en la respuesta a estrés abiótico. En la escala de regulación, *SNAC4* estaría situado por encima del nivel del etileno aunque su relación con los demás factores de transcripción no es todavía clara aunque podría interactuar físicamente con las proteínas *RIN* y *NOR*.

Los factores de transcripción *LeAP2a* y *LeERF6* pertenecen a la familia de genes *AP2/ERF* y ambos son reguladores negativos del proceso de maduración que de algún modo compensan la regulación positiva ejercida por los anteriores. En el caso de *LeAP2a*, su expresión es específica de fruto y estaría situado por debajo de *RIN*, *NOR* y *CNR* en la escala de regulación y sería capaz de interactuar físicamente con el promotor de *CNR* (Chung *et al.* 2010; Karlova *et al.* 2011). Por otro lado, *LeERF6* está involucrado en la regulación de la biosíntesis de carotenoides y de etileno a través de la interacción directa con los promotores de algunas enzimas implicadas en el proceso, pudiendo actuar como un integrador de ambas rutas metabólicas (Lee *et al.* 2012).

Además del etileno se han encontrado evidencias de que otras hormonas influyen sobre el proceso de maduración, entre las que cabe destacar el ácido abscísico (ABA) y las auxinas. En el primer caso, la producción de ABA aumenta durante la maduración en frutos de especies tanto climatéricas como no climatéricas (revisado en Hiwasa-Tanase & Ezura 2014). En tomate, el silenciamiento del gen *LeNCED1* (9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa), fundamental en la síntesis de ABA, produce una inhibición del reblandecimiento de la pulpa y un aumento de la vida post cosecha del fruto pero no inhibe la síntesis de etileno ni la síntesis de pigmentos (Sun *et al.* 2012). En el caso de las auxinas, durante la maduración del fruto de tomate se produce una eliminación del efecto de esta hormona a través de su conjugación (Karlova *et al.* 2011) y de la supresión de los genes de respuesta a auxinas *ARF* mediada por *RIN* (Kumar *et al.* 2011).

1.2.3. Otros factores implicados en la regulación de la maduración del fruto

Respecto a la regulación de la maduración no climatérica, actualmente no hay ningún candidato como regulador principal análogo al etileno en las especies climatéricas aunque este tipo de maduración ha sido mucho menos estudiado. Algunos estudios sugieren que ambos tipos de maduración comparten los mismos componentes de la ruta de señalización de etileno y que, en fresa, esta hormona parece ser necesaria para la maduración aunque su papel no es tan relevante como en frutos climatéricos (Osorio *et al.* 2013). También se han

encontrado elementos reguladores en común, como el factor de transcripción MADS-box *FaMADS9* análogo al *RIN* de tomate, que controla la maduración en fresa (Seymour *et al.* 2011). En especies no climatéricas como la fresa y la vid se han encontrado evidencias de que la fitohormona ácido abscísico tiene un efecto sobre la regulación de la maduración (Davies *et al.* 1997; Jia *et al.* 2011). Otras fitohormonas que también podrían estar involucradas son los brasinoesteroides, auxinas, citoquininas, ácido giberélico y poliaminas, pero su relación con la maduración tanto climatérica como no climatérica ha sido poco estudiada (revisado por Davies & Böttcher 2014).

En los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas experimentales ha despertado el interés en el estudio de la maduración desde otros puntos de vista como el de los miRNAs y el epigenoma. Los miRNAs, un tipo de moléculas cortas de RNAs no codificantes involucradas en la regulación postranscripcional, han sido vinculados con el control de la maduración en tomate, probablemente a través del control de la expresión de *RIN* (Gao *et al.* 2015). La epigenética, definida como un fenómeno que cambia el resultado de un gen sin alterar su secuencia de DNA, generalmente a través de la modificación de la cromatina pero también a causa de la inserción de transposones o la recombinación de DNA, ha generado un interés creciente en los últimos años (Goldberg *et al.* 2007). La modificación epigenética mejor estudiada y más importante es la metilación de residuos de citosina y es una modificación estable y hereditaria, aunque, con el tiempo, puede producirse una desmetilación pasiva (Law & Jacobsen 2010).

El primer vínculo que se ha encontrado entre la epigenética y la maduración del fruto de tomate tuvo lugar durante la caracterización del mutante *Cnr*, en el que diferencias en la metilación del promotor del gen *CNR* impedían su unión al promotor de *RIN* inhibiendo su expresión (Manning *et al.* 2006). Recientemente, Chen y colaboradores (2015a) han descrito que la base de la heredabilidad de la mutación epigenética en *Cnr* es una metilasa, *LeCMT3*, que es necesaria para el mantenimiento del alelo *Cnr* y de su fenotipo. A lo largo del desarrollo del fruto se lleva a cabo una desmetilación progresiva global de los sitios de inicio de la transcripción (TSS), mientras que en los mutantes *Cnr* y *rin* los niveles de metilación se mantuvieron siempre altos (Zhong *et al.* 2013). Las regiones diferencialmente metiladas de los genes controlados por *RIN* están situadas muy cerca o se solapan con los sitios de unión del factor de transcripción, y la expresión de dichos genes aumenta al disminuir el nivel de metilación, lo que sugiere un papel fundamental de las dinámicas del epigenoma en el control del proceso de maduración en tomate. Liu y colaboradores (2015) demostraron que la desmetilación es un requerimiento para la maduración del fruto y que existe una relación causa-efecto entre la hipermetilación de algunos promotores específicos y la represión de la expresión génica. En ese contexto, la demetilasa *SIDML2* parece ser el principal elemento regulador del proceso de desmetilación, y el modelo de interacción entre los factores de transcripción y la metilación sería el representado en la Figura 1.7.

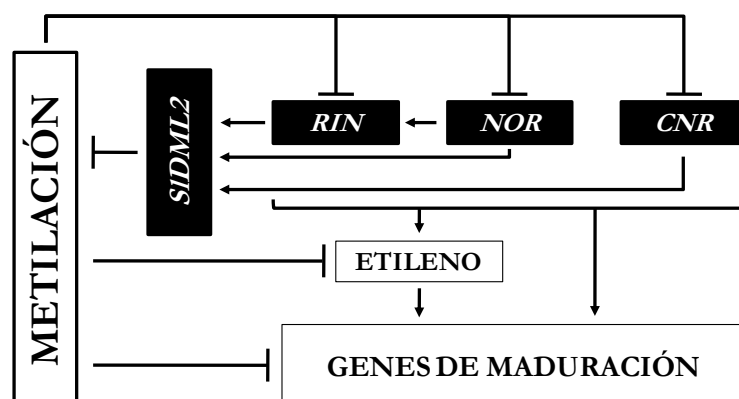


Figura 1.7: Modelo de regulación epigenética sobre la maduración en tomate y su relación con el control genético de *RIN*, *NOR* y *CNR*. La demetilasa *SIDML2* es necesaria para la desmetilación de los promotores de los tres factores de transcripción y por tanto permite su expresión. La expresión de *SIDML2* es inhibida en los tres mutantes, sugiriendo una regulación tipo “feedback” negativo. Las flechas entre los factores de transcripción y *SIDML2* indican regulación positiva, aunque se desconoce si es directa o indirecta. Los factores de transcripción también regulan positivamente la síntesis de etileno y la maduración del fruto. Las líneas con punta roma representan la inhibición de la expresión que la metilación produce sobre los factores de transcripción y los genes relacionados con la síntesis de etileno y la maduración del fruto. Modificado de Liu *et al.* (2015).

1.2.4. Procesos relacionados con la maduración del fruto

A pesar de la división de los frutos en climatéricos y no climatéricos según el tipo de maduración, muchos de ellos comparten una serie de procesos que tienen lugar en el fruto durante la maduración. A continuación se detallan brevemente las rutas metabólicas relacionadas con estos procesos, utilizando el conocimiento adquirido en el estudio del tomate como especie modelo. En el siguiente apartado (1.3) se volverá a hablar sobre los avances realizados durante los últimos años en el estudio de los mismos procesos en melón.

Biosíntesis de carotenoides

El desarrollo o cambio de color de los frutos durante la maduración se debe principalmente a la biosíntesis de carotenoides. En cada fruto se acumula uno o varios tipos de derivados de carotenoides y el mayoritario es el que dictamina el color del mismo: el licopeno en tomates, sandías y papayas; el β -caroteno en melones *cantalupensis*, mango y calabaza; la zeaxantina en naranja; y capsantina y capsorrubina en pimiento rojo (Pech *et al.* 2014). El primer paso en la ruta de biosíntesis (Figura 1.8) consiste en la condensación de dos moléculas de GGPP (geranilgeranil pirofosfato) en fitoeno por acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY). Posteriormente la acción secuencial de las enzimas ZDS (ζ -caroteno desaturasa) y PDS (fitoeno desaturasa) convierte el fitoeno en licopeno, el primer compuesto pigmentado de la ruta. Los α - y β -carotenos derivan de la ciclación del licopeno mediada por enzimas licopeno ϵ - o β -ciclasas, respectivamente. A través de una serie de reacciones secuenciales, los α - y β -carotenos pueden ser convertidos en luteína, β -criptoxantina, zeaxantina, capsantina y capsorrubina, entre otros carotenoides. Durante la maduración del fruto de tomate se ha encontrado sobreexpresión de los transcritos de *LePSY-1*, *LePDS* y de ambos tipos de ciclasa (Pecker *et al.* 1992; Giuliano *et al.* 1993; Pecker *et al.* 1996; Ronen *et al.* 2000).

A pesar de que la ruta de síntesis de carotenoides ha sido bien caracterizada todavía no se dispone de una visión de conjunto de su regulación, sobre la que influyen factores de transcripción como *RIN* en tomate y *AtRAP2.2* en *Arabidopsis* (Welsch *et al.* 2007), la luz (Cookson *et al.* 2003; Liu *et al.* 2004; Gupta *et al.* 2014); las interacciones entre proteínas (Luo *et al.* 2013) y la epigenética (Cazzonelli *et al.* 2009).

Biosíntesis de compuestos aromáticos

El aroma es uno de los principales determinantes de la calidad del fruto y es el resultado de una combinación de diversos compuestos volátiles como aldehídos, alcoholes, ésteres, cetonas, lactonas y terpenoides (Goff & Klee 2006). Generalmente el contenido en compuestos volátiles en el fruto aumenta desde el inicio de la maduración y alcanza su

máximo al final de la maduración o poco después (Goff & Klee 2006). La regulación de la biosíntesis de compuestos aromáticos depende de factores ambientales como la luz y la temperatura, pero también de factores endógenos como la biosíntesis de etileno (revisado en Zhang & Chen 2014). Aunque los compuestos aromáticos contienen una gran variedad de grupos químicos y derivan de rutas metabólicas diferentes, las principales fuentes de carbono para su biosíntesis son los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos (Figura 1.8) (Schwab *et al.* 2008).

Los compuestos volátiles derivados de carbohidratos son sintetizados a partir de la condensación de varios terpenoides, formando moléculas más largas que posteriormente son transformados para dar lugar al producto final (revisión de Dudareva *et al.* 2004). Las enzimas implicadas en el proceso son las terpeno sintasas (TPS), de las que se distinguen varias familias en función del sustrato que utilicen (Chen *et al.* 2011). En tomate se han encontrado 44 TPS de las cuales solamente 29 son potencialmente funcionales (Falara *et al.* 2011). Además de terpenoides, otro tipo de compuestos aromáticos que derivan de carbohidratos son los apocarotenoides, que se obtienen a partir de la ruptura oxidativa de carotenoides por medio de una enzima dioxigenasa (CCD), aunque el conocimiento actual sobre su biosíntesis es muy limitado. En tomate se ha demostrado la implicación de *LaCCD1* en la síntesis de algunos apocarotenoides aromáticos (Simkin *et al.* 2004).

Los ácidos grasos saturados e insaturados son los precursores más importantes para la mayoría de compuestos aromáticos entre los que se incluyen aldehídos, alcoholes, ésteres, lactonas y cetonas, que son biosintetizados a través de la lipooxidación y la β -oxidación de los ácidos grasos (revisión de Schwab *et al.* 2008). Las enzimas lipooxigenasas (LOX) junto con las hidropéroxido liasas (HPL), catalizan la conversión de los ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3) en los aldehídos hexanal y hexenal, respectivamente. Se ha encontrado una asociación entre la expresión y actividad de las enzimas LOX y HPL con la maduración del fruto y con el desarrollo del perfil aromático en varias especies (Defilippi *et al.* 2009). A su vez, los aldehídos pueden ser reducidos a sus alcoholes correspondientes y finalmente ser convertidos a ésteres a través de dos reacciones enzimáticas catalizadas por alcohol deshidrogenasas (ADH) y alcohol aciltransferasas (AAT) respectivamente (Speirs *et al.* 1998; Wyllie & Fellman 2000). En tomate se ha caracterizado la familia de genes ADH, observándose una correlación entre los cambios en su actividad y el contenido de alcoholes en el fruto, relacionados con su sabor (Longhurst *et al.* 1994; Speirs *et al.* 1998). Las enzimas AAT han sido identificadas como responsables de la biosíntesis de ésteres en frutos maduros de varias especies, incluyendo tomate y melón (Zhang & Chen 2014). En este punto cabe destacar el control directo sobre la síntesis de compuestos volátiles que ejerce el factor de transcripción RIN a través de su interacción con los promotores de genes *LOX*, *HPL* y *ADH* en tomate (Qin *et al.* 2012).

La β -oxidación produce la rotura de ácidos grasos y la liberación de lactonas volátiles (revisión de Baker *et al.* 2006). Aunque la implicación de las lactonas en el desarrollo del aroma es importante, el estudio de su ruta de biosíntesis es todavía escaso, debido en parte a que la mayoría de especies modelo como *Arabidopsis*, arroz y tomate no producen lactonas. Una de las pocas enzimas implicadas en la β -oxidación que ha sido caracterizada en *Arabidopsis* y también tomate es la acil-CoA oxidasa (ACX) y está considerada como el punto clave en la regulación del proceso (Arent *et al.* 2008).

La tercera vía de producción de compuestos volátiles es a partir de aminoácidos, especialmente leucina, isoleucina, valina, alanina, fenilalanina, tirosina y triptófano (Defilippi *et al.* 2009). Estos aminoácidos son sintetizados en plantas a través de la ruta del

shikimato y actúan de precursores de alcoholes, aldehídos, ésteres, lactonas, ácidos y compuestos organosulfurados (Tzin & Galili 2010). La mayoría del conocimiento sobre esta ruta se debe a trabajos en *Arabidopsis*, aunque la caracterización de las enzimas implicadas y su regulación no son completas. En tomate, las enzimas *L*-aminoácido descarboxilasa (AADC) están implicadas en la síntesis de compuestos aromáticos a partir de *L*-fenilalanina (Tiemann *et al.* 2006). En otras especies, como el melón y el plátano, enzimas transaminasas AAT han sido relacionadas con la síntesis de compuestos aromáticos de cadena ramificada (Gonda *et al.* 2010; Yang *et al.* 2011b).

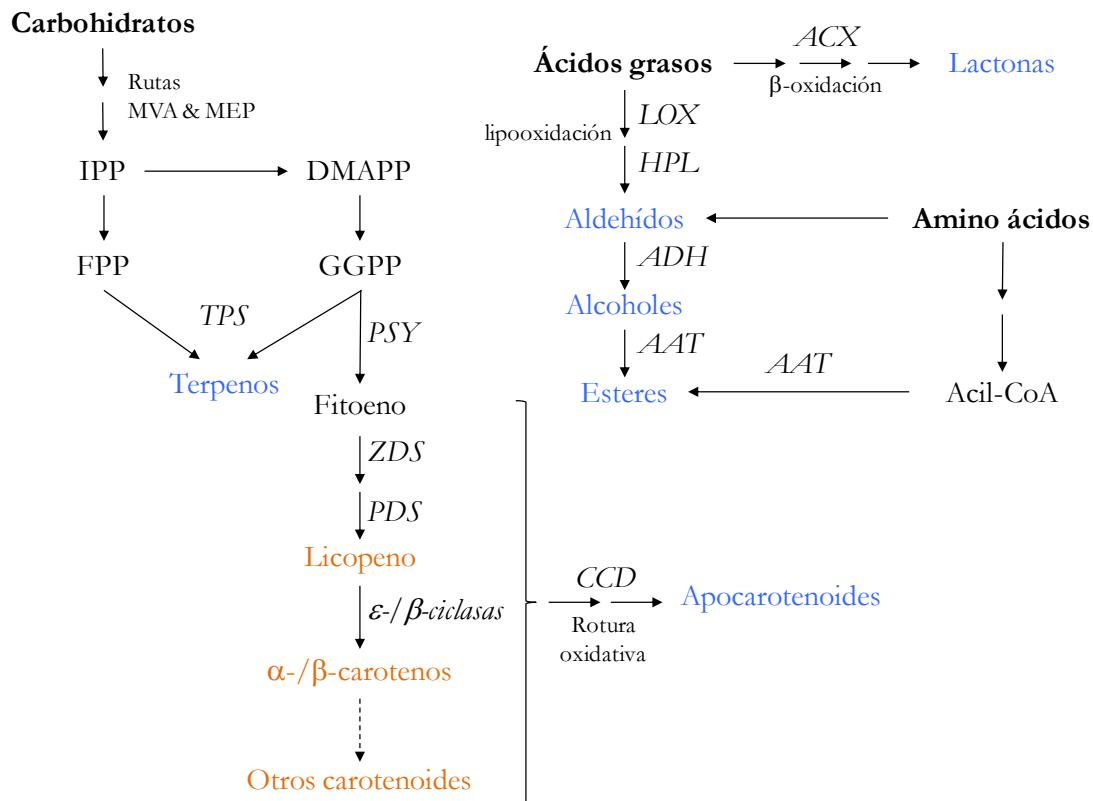


Figura 1.8: Esquema simplificado de las principales rutas de síntesis de carotenoides y compuestos aromáticos a partir de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Se destacan en naranja los carotenoides y en azul los volátiles aromáticos. Los nombres de las enzimas están en cursiva. Abreviaturas: TPS: terpeno sintasa; PSY: fitoeno sintasa; ZDS: ζ -caroteno desaturasa; PDS: fitoeno desaturasa; CCD: dioxigenasa de ruptura de carotenoides; ACX: acil-CoA oxidasa; LOX: lipooxigenasa; HPL: hidroperóxido liasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; AAT: alcohol acil transferasa; MVA: ácido mevalónico; MEP: metileritritol fosfato; IPP: isopentenil fosfato; FPP: farnesil pirofosfato; GGPP: geranilgeranil pirofosfato; DMAPP: metilalil pirofosfato; Adaptado de Schwab *et al.* (2008).

Acumulación de azúcares y ácidos orgánicos

Además de los compuestos volátiles, los otros dos factores más influyentes sobre el sabor del fruto son el contenido de azúcares, de ácidos orgánicos y el balance entre ambos (Sweeney *et al.* 1970). Durante su desarrollo y maduración, el fruto es el destino de una gran cantidad de fotoasimilados procedentes de los órganos fotosintéticos transportados a través del floema y que actúan como precursores de muchos metabolitos secundarios.

Los azúcares transportados al fruto tienen distintas finalidades dependiendo de la especie: pueden ser convertidos en almidón (en mango, banana y kiwi), almacenados como azúcares reductores (en tomate y fresa), almacenados como sacarosa (en tomate salvaje, melón, sandía y uva) o convertidos y almacenados como lípidos (como en el olivo) (Osorio & Fernie 2014). Los tres principales carbohidratos presentes en los frutos son la glucosa, la fructosa y la sacarosa, y las diferencias en su contenido se debe a la acción de varias enzimas implicadas en su síntesis y degradación como las invertasas (INV) y las sacarosa sintasas (SUS). El papel de las invertasas en el balance hexosas/fructosa y también en el tamaño del fruto se ha puesto de manifiesto en especies como la fresa y el tomate (Fait *et al.* 2008; Zanon *et al.* 2009). Otro de los carbohidratos modificados durante la maduración del fruto es el almidón, que generalmente es degradado en glucosa y fructosa (Ho *et al.* 1982). En tomate, el almidón juega un papel importante en la concentración de sólidos solubles del fruto maduro (Schaffer & Petreikov 1997) siendo la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa la responsable de su biosíntesis.

Los otros metabolitos importantes para la percepción del sabor del fruto son los ácidos orgánicos que provienen de las principales rutas metabólicas de la célula como la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la respiración. Los ácidos más abundantes son citrato, malato, quinato, oxalato, succinato, isocitrato, cumarato y aconitato. Algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de estos ácidos son la malato deshidrogenasa mitocondrial (mMDH), ADP-glucosa pirofosforilasa, fumarasa e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD. Los cambios en la expresión de estas enzimas afectan a la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos en el fruto, la durabilidad postcosecha, la susceptibilidad a patógenos y el rendimiento de frutos. (Nuñez-Paleniús *et al.* 2007; Nunez-Paleniús *et al.* 2008; Sienkiewicz-Porzucek *et al.* 2010; Centeno *et al.* 2011).

El control del metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos ha sido poco estudiado, aunque en tomate algunos ácidos orgánicos podrían controlar la síntesis de azúcares a través de la regulación de las enzimas implicadas. Por ejemplo, el ácido málico influencia el contenido en almidón a través del control de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (Centeno *et al.* 2011).

Metabolismo de la pared celular

Los cambios metabólicos que afectan a la integridad celular durante la maduración del fruto incluyen variaciones en el grosor de la pared celular, permeabilidad de la membrana plasmática, hidratación de la pared celular, disminución de la integridad estructural e incremento en los espacios intercelulares (revisado en Tucker 2014). En el fruto, el reblandecimiento de la pulpa es debido a la combinación de cambios en la firmeza y en la textura provocados principalmente por modificaciones en la pared celular (Brookfield *et al.* 2011) y, atendiendo a su estructura, podemos distinguir procesos que afectan a la lamela, la celulosa, los xiloglucanos y las proteínas.

Uno de los principales procesos implicados en el reblandecimiento de la pulpa es la solubilización de la lamela (Ordaz-Ortiz *et al.* 2009). La lamela, que actúa de pegamento entre la pared celular de las distintas células, está compuesta principalmente por pectinas y β -lactanos. Durante la maduración, los polímeros de pectina (poligalacturonanos) son degradados por la acción de las poligalacturonasas (PG). El estudio de *LePG2a* en tomate sugiere que la acción de las PG no es suficiente para producir los cambios en la firmeza del fruto que ocurren durante la maduración, y que es necesaria la acción combinada de varias enzimas (Langley *et al.* 1994; Brummell & Labavitch 1997). Una de las enzimas que pueden afectar la estructura y polimerización de la pectina son las pectina metil esterasas (PME)

(Rose *et al.* 2004) y la desesterificación mediada por esta enzima podría ser necesaria para proveer de sustrato a las PG (Tieman *et al.* 1992). Otra de las enzimas implicadas en la degradación de los componentes de la lamela y que podría actuar junto a las PG y PME son las β -galactosidasas (GAL), que degradan los β -galactanos. En tomate la supresión de *GALA* incrementa la firmeza del fruto maduro (Smith *et al.* 2002).

El principal grupo de enzimas modificadores de la celulosa son las celulasas (CEL), aunque no se conoce su verdadero sustrato. En tomate, las celulasas *Cel1* y *Cel2* se expresan durante la maduración del fruto (Lashbrook *et al.* 1994) pero la supresión de su expresión por separado no produce cambios en la firmeza del fruto sugiriendo cierta redundancia en este tipo de actividad enzimática en la célula (Lashbrook *et al.* 1998; Brummell *et al.* 1999a). Las expansinas (EXP) son proteínas de las que no se conoce su actividad específica aunque juegan un papel en la elongación de la pared celular en varias especies, probablemente rompiendo puentes de hidrógeno entre las microfibras de celulosa (Cosgrove *et al.* 2002) y podrían ser necesarias para el acceso de PG a su sustrato (Brummell & Harpster 2001). En tomate, la supresión o mutación mediante TILLING de *LeEXP1* causa un incremento en la firmeza del fruto maduro (Brummell *et al.* 1999b; Minoia *et al.* 2016).

Los elementos que entrelazan las microfibras de celulosa, anclándolas y dotando de mayor rigidez a la pared celular, son unos polisacáridos denominados xiloglucanos (Carpita & Gibeaut 1993). La polimerización y despolimerización de los xiloglucanos es llevada a cabo por un grupo de enzimas denominadas xiloglucano endotransglucosilasas hidrolasas (XTH) (Rose *et al.* 2004). En tomate se han identificado 25 XTH (Ohba *et al.* 2011) y, aunque se ha demostrado que durante la maduración del fruto se produce una despolimerización de los xiloglucanos (Brummell 2006) y que esta familia de enzimas está implicada (Saladie *et al.* 2006; Ohba *et al.* 2011), no se conoce si la actividad XTH aumenta o disminuye la firmeza de la pulpa durante la maduración (Miedes & Lorences 2009). Otro grupo de enzimas, las β -xilosidasas (XIL), son inducidas por el etileno y también han sido relacionadas con las modificaciones de la pared celular en tomate (Rose *et al.* 2004).

El componente proteico de la pared celular es el menos estudiado aunque puede llegar a suponer hasta el 20% del contenido en peso (Carpita & Gibeaut 1993). En tomate, se ha encontrado asociación entre las modificaciones sobre la glicosidación de las proteínas y la forma de las células y su desarrollo (Knox 1995), aunque ni la transcripción ni el contenido de proteínas estructurales de la pared celular varía durante el proceso de maduración (Osorio *et al.* 2011). Según los autores, esto podría indicar que las proteínas de la pared celular son simplemente modificadas y que eso sería suficiente para afectar a la firmeza del fruto, aunque es tan sólo una hipótesis que tendría que ser comprobada.

Dehiscencia del fruto

La abscisión del fruto es un proceso fundamentalmente relacionado con las modificaciones de la pared celular que se llevan a cabo en una estrecha franja de tejido, denominada capa de abscisión, que une el fruto con el pedúnculo (revisado por Tucker & Kim 2015). Se pueden distinguir cuatro fases básicas en el proceso que son comunes para la mayoría de las especies: (1) diferenciación de la zona de abscisión; (2) adquisición de la competencia para responder a las señales de abscisión; (3) señalización y activación de la abscisión; y (4) formación de una capa de protección.

La diferenciación de la zona de abscisión (fase 1) afecta solamente a unas pocas capas celulares y se conoce poco acerca de su regulación. La fase 2 consiste en una disminución de la concentración de auxinas que permite que la zona de abscisión responda a otras

señales hormonales. En especies como el olivo, el melocotonero y el melón, el etileno juega un papel importante como señal activadora de la abscisión (Perin *et al.* 2002a; Rasori *et al.* 2002; Ruperti *et al.* 2002; Parra-Lobato & Gomez-Jimenez 2011). Durante la fase 3, se ha observado en especies como el tomate y la manzana un aumento de expresión de las principales familias modificadoras de celulosa, hemicelulosa y pectina descritas anteriormente que degradan la pared celular primaria y la lamela (Meir *et al.* 2010; Botton *et al.* 2011). En la mayoría de los casos, la abscisión no produce la rotura de las células implicadas, sino que mantienen su integridad y posteriormente se reconstruyen las estructuras de pared celular formando una barrera protectora frente a la pérdida de agua y patógenos (fase 4). Sin embargo, en especies como el tomate la dehiscencia también se ha relacionado con la muerte celular programada aunque su papel en el proceso no es claro (Lers *et al.* 2006; Tucker & Kim 2015). De la abscisión en melón, considerado por algunos autores como especie modelo para el estudio de la abscisión de frutos carnosos (Corbacho *et al.* 2013), se tratará en el siguiente apartado.

1.3. La maduración del fruto en melón

Como se ha explicado en los apartados anteriores, el melón es un buen modelo para el estudio de la maduración porque se pueden encontrar variedades de melón, especialmente de los grupos *reticulatus* y *cantalupensis*, que durante el desarrollo del fruto muestran un aumento de la producción de etileno y de la respiración característicos de la maduración climatérica, mientras que otras variedades, como el grupo *inodorus*, presentan una maduración típicamente no climatérica (Ezura & Owino 2008). Es importante destacar que existen variedades comerciales climatéricas (*cantalupensis* como “Védrañtais”, *reticulatus* como “Dulce”) y no climatéricas (*inodorus* como “Piel de Sapo”).

En los siguientes apartados se resumen los avances realizados en el estudio de los procesos de maduración, en la biosíntesis y señalización de etileno, y también en los sistemas de control que gobiernan la maduración del fruto en melón.

1.3.1. El etileno y la maduración del fruto

Mediante la obtención de líneas transgénicas en las que se silenció la expresión del gen *CmACO1*, que codifica la principal enzima implicada en la biosíntesis de etileno, en frutos de la variedad climatérica “Védrañtais” se ha podido estudiar el papel de la hormona sobre el control de los distintos procesos relacionados con la maduración según se representa en la Figura 1.9 (Guis *et al.* 1997; revisado por Pech *et al.* 2008). En el fruto de melón, la dehiscencia (a través del desarrollo de una capa de abscisión), el cambio de color externo (debido a la degradación de clorofilas) y la biosíntesis de compuestos aromáticos son procesos estrictamente dependientes de etileno. Por otro lado, el reblandecimiento de la pulpa causado por modificaciones en la pared celular no está completamente regulado por etileno, aunque sí en su mayor parte. En el otro extremo se encuentran la biosíntesis de carotenoides y la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos, que son procesos independientes de etileno en melón.

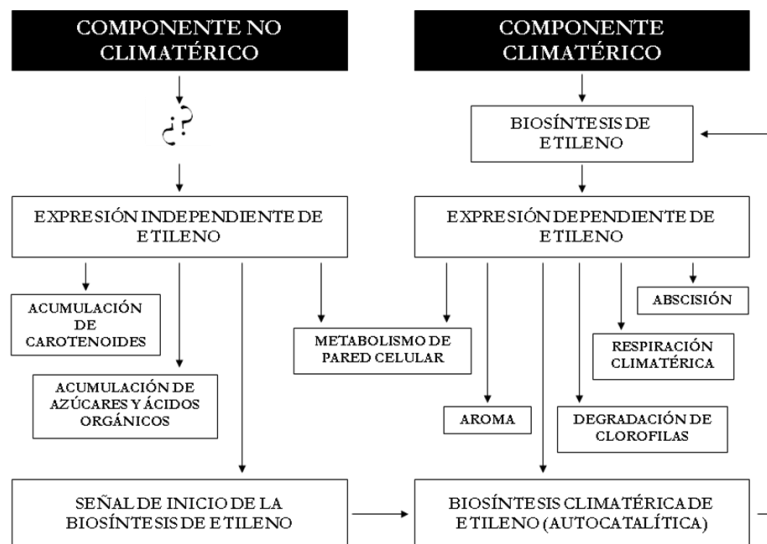


Figura 1.9: Esquema general de los procesos de maduración del fruto de melón y su división en función del papel del etileno en su regulación. Los procesos independientes de etileno son el cambio de color de la pulpa del fruto (a través de la acumulación de carotenoides), la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos y una parte del reblandecimiento de la pulpa debido al metabolismo de la pared celular. Por otro lado,

los procesos dependientes de etileno son la mayor parte del reblandecimiento de la pulpa, la biosíntesis de compuestos aromáticos, el desarrollo de una capa de abscisión, el cambio de color externo (debido a la degradación de clorofilas) y la respiración climatérica. La biosíntesis de etileno es autocatalítica, y su inicio podría ser regulado por el componente no climatérico. Adaptado de Pech *et al.* (2008).

La sensibilidad al etileno también forma parte de los mecanismos de control sobre los procesos de maduración total o parcialmente dependientes de esta hormona en melón. Flores y colaboradores (2001) investigaron la cantidad necesaria de etileno exógeno para inducir el reblandecimiento de la pulpa del fruto, el desarrollo de la capa de abscisión y el cambio de color externo en el fruto, que resultó ser 1, 2,5 y 1 ppm respectivamente. Además, hay que destacar que en general el tratamiento exógeno de etileno induce la maduración del fruto en las variedades climatéricas de melón pero no en las no climatéricas (Guis *et al.* 1997; Perin *et al.* 2002a; Saladie *et al.* 2015).

1.3.2. Control genético de la maduración

El primer estudio de los sistemas de control genético de la maduración del fruto en melón se realizó utilizando una población de RILs derivada del cruzamiento entre la variedad climatérica “Védrañtais” y la variedad exótica SC, no climatérica (Perin *et al.* 2002a). Se determinó que dos *loci* o genes mayores, *Al-3* y *Al-4* en los LG VIII y IX, controlan el desarrollo de la capa de abscisión y la producción autocatalítica de etileno en dicha población, y que la concentración de etileno en el fruto estaba controlada por cuatro QTLs en los LG I, II, III y XI. Posteriormente, en la población de NILs con parentales PS y SC (Eduardo *et al.* 2005) se detectó una línea con maduración climatérica a pesar de que ambos parentales no son climatéricos (Moreno *et al.* 2008). Esta línea, denominada SC3-5-1 fue analizada en más detalle fenotípica y genotípicamente encontrándose dos QTLs en los LG III y VI, *eth3.5* y *eth6.3*, que son capaces de inducir la maduración climatérica por separado y que cuando se combinan producen una mayor cantidad de etileno y aceleran la abscisión del fruto (Vegas *et al.* 2013). Cabe destacar que no hay solapamiento entre los QTLs encontrados en ambas poblaciones, lo que sugiere un complejo sistema de regulación en melón y grandes diferencias entre las variedades. El clonaje posicional de *eth6.3*, inicialmente mapeado en un intervalo de 4,5 Mbp en la región centromérica del LG VI, es uno de los principales objetivos de este trabajo de tesis y será abordado en el capítulo 4.1.

A la vista de estos resultados, se ha propuesto la existencia en melón de un control transcripcional en un nivel superior al ejercido por el etileno, equivalente al descrito en tomate, y que sería responsable de la intensa reprogramación transcriptómica observada en el proceso (Saladie *et al.* 2015). La hipótesis más extendida es que, en general, los frutos no climatéricos podrían ser mutantes en genes implicados en la biosíntesis y señalización de etileno o en factores de transcripción análogos a los caracterizados en tomate *RIN*, *NOR* y *CNR* (Giovannoni 2004), también en el caso del melón (Saladie *et al.* 2015). A favor de esta hipótesis está el hecho de que tanto PS como SC, variedades no climatéricas, no maduran en respuesta a la aplicación de etileno exógeno como tampoco lo hacen los tres mutantes de tomate, aunque SC es una variedad no climatérica atípica. Recientemente, Saladié y colaboradores (2015) observaron que los patrones de expresión de genes relacionados con la maduración en frutos de SC ocupaban un lugar intermedio entre PS y las variedades climatéricas “Védrañtais” y “Dulce”. Además, aunque la aplicación de etileno exógeno en frutos inmaduros de PS y SC no indujo la biosíntesis endógena de etileno, sí se detectaron diferencias entre las dos variedades en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de la hormona (*CmACO1*) o implicados en el proceso de maduración (*CmPG1*, *CmXTH1*,

CmETR1). Por último, el nivel basal de etileno durante la maduración es más elevado en los frutos de SC que en los de PS, aunque no se produce el pico climatérico (Vegas *et al.* 2013; Saladie *et al.* 2015).

1.3.3. Biosíntesis y señalización de etileno

En melón se han identificado los principales genes implicados en la ruta de biosíntesis de etileno como ACS y ACO. La familia ACS en melón consta de ocho miembros (*CmACS1-8*), de los cuales *CmACS1* está altamente expresado durante el proceso de maduración en fruto y se ha descrito como el principal responsable de la síntesis climatérica de etileno (Miki *et al.* 1995; Yamamoto *et al.* 1995; Shiomi *et al.* 1999; Garcia-Mas *et al.* 2012; Saladie *et al.* 2015). La expresión de *CmACS5* es también alta durante la maduración del fruto en variedades climatéricas, coincidiendo con el aumento en la síntesis de etileno (Saladie *et al.* 2015). Recientemente se ha descubierto que *CmACS5* está implicado en la determinación sexual de las flores femeninas en melón (Boualem *et al.* 2015). *CmACS2* y *CmACS3* están regulados por auxinas y se expresan principalmente durante el desarrollo del fruto (Ishiki *et al.* 2000). Los genes *CmACS4-6* están anotados en el genoma de referencia pero son los menos estudiados de la familia (Saladie *et al.* 2015). *CmACS7* es el gen *a* (*andromonoecious*) y por tanto también está implicado en la determinación sexual en melón (Boualem *et al.* 2008). Respecto a las ACO, en melón han sido identificados cinco miembros, de los cuales *CmACO1* muestra expresión diferencial a lo largo de la maduración climatérica (Lasserre *et al.* 1996; Garcia-Mas *et al.* 2012; Saladie *et al.* 2015).

Varios componentes de la ruta de señalización del etileno han sido descritos en melón, entre los que se encuentran los receptores *CmETR1*, *CmETR2* y *CmERS1* (Sato-Nara *et al.* 1999; Ezura & Owino 2008). Los tres muestran expresión diferencial en distintos tejidos y estadios del desarrollo del fruto, aunque *CmETR2* es el único regulado por etileno y relacionado con el proceso de maduración. La expresión de factores de transcripción de los tipos EIL, EREBP, AP2/ERF, MADS-box, NAC, F-Box y HD-zip durante la maduración ha sido descrita por Saladié y colaboradores (2015), encontrando diferencias entre variedades climatéricas y no climatéricas de melón en algunos genes de estas familias.

1.3.4. Biosíntesis de carotenoides

El primero de los procesos de la maduración del fruto de melón independiente de etileno es la biosíntesis de carotenoides, responsables del cambio de color de la pulpa del fruto. En melón, este proceso está controlado genéticamente por los *loci* “green flesh” (*gf*) y “white flesh” (*wf*) (Clayberg 1992), que dan lugar a frutos de pulpa naranja, verde o blanca tanto climatéricos como no climatéricos (Watanabe *et al.* 1991). Recientemente ha sido identificado el gen *CmOr* como responsable del *locus gf* (Tzuri *et al.* 2015), aunque históricamente algunos autores defienden que hay una confusión en las nomenclaturas y podría tratarse de *wf* (Monforte *et al.* 2004). El color de la pulpa del fruto está determinado por la combinación de clorofilas y carotenoides, que da lugar a los colores verde y naranja, mientras que el blanco es debido a la ausencia de ambos (Burger *et al.* 2009; Saladie *et al.* 2014; Saladie *et al.* 2015). En los de pulpa naranja, el color y su intensidad se deben principalmente a la acumulación de β -caroteno (Nunez-Paleniús *et al.* 2008; Burger *et al.* 2009; Saladie *et al.* 2015). Una de las principales enzimas implicadas en la biosíntesis de este y otros carotenoides en melón es *CmPSY1*, cuya expresión en frutos de pulpa naranja es mayor que en frutos de pulpa blanca (Karvouni *et al.* 1995; Saladie *et al.* 2015).

El cambio de color externo durante la maduración es un proceso dependiente de etileno y, por tanto, específico de frutos con maduración de tipo climatérica (Flores *et al.* 2001). Sin embargo, en este caso el cambio de color no se debe a la síntesis de carotenoides sino a la degradación de las clorofilas, de un modo similar a lo que ocurre en las hojas de los árboles caducifolios en otoño (Matile *et al.* 1999). Además de carotenoides y clorofilas, también se ha vinculado la coloración amarilla del exocarpo de algunas variedades de melón como la *inodorus* “Noy Amid” con la acumulación de flavonoides, especialmente de naringenina-chalcona (Tadmor *et al.* 2010). La acumulación de este pigmento es independiente de la degradación de las clorofilas y recientemente ha sido clonado el gen *CmKFG*, un factor de transcripción de la familia “Kelch Domain-Containing F-Box”, que regula negativamente la biosíntesis de este flavonoide en melón (Feder *et al.* 2015).

1.3.5. Biosíntesis de compuestos aromáticos

La biosíntesis de compuestos aromáticos volátiles es una característica propia de las variedades climatéricas de melón y presenta una clara regulación dependiente de etileno. En esta especie, los principales componentes del aroma del fruto maduro son los ésteres, seguidos por alcoholes y aldehídos, aunque más de 240 compuestos distintos han sido identificados (Nunez-Palenius *et al.* 2008). En un estudio comparativo entre dos variedades con distinto tipo de maduración, Shalit y colaboradores (2001) encontraron grandes diferencias en la composición del aroma: en la climatérica los ésteres representaban más del 83% de los volátiles, seguidos por alcoholes (4%) y aldehídos (0,4%); mientras que en la no climatérica los compuestos más abundantes fueron los alcoholes (60%), seguidos de aldehídos (20%) y solamente un 7% de ésteres. Dentro de las variedades climatéricas también existe una gran variación en la producción de volátiles, observándose una reducción de entre un 49 y un 87% de compuestos volátiles totales en cultivares “Charentais” de larga vida postcosecha respecto a cultivares de vida postcosecha reducida (Lucchetta *et al.* 2007). Cabe destacar que el perfil aromático de las líneas climatéricas (SC3-5 y derivadas) pertenecientes a la población de NILs (PS x SC, Eduardo *et al.* 2005), es más parecido al de variedades climatéricas aromáticas como “Védrantais” y “Fado” (tipo *reticulatus*) que al de sus parentales no climatéricos (Obando-Ulloa *et al.* 2008).

En un estudio de biosíntesis de terpenoides en un panel de 11 variedades climatéricas de melón se encontró que la composición de este tipo de volátiles varía mucho entre ellas e incluso algunas, como “Védrantais” y “PI 414723”, presentan una cantidad indetectable (Portnoy *et al.* 2008). El estudio de los perfiles muy diferenciados de las variedades “Dulce” y “Noy Yizre’el” dio lugar a la identificación de los genes *CmTpsDul* y *CmTpsNY*, que se sobreexpresan en el exocarpo del fruto maduro en la primera y la segunda variedad respectivamente, y que están implicadas en la síntesis de distintos sesquiterpenos. En el mismo trabajo, no se detectaron terpenoides en ninguna de las cinco variedades *inodorus* analizadas.

En melón se han caracterizado dos familias de enzimas implicadas en la biosíntesis de ésteres a partir de ácidos grasos: ADH y AAT. Se han encontrado dos miembros en la familia ADH en melón: *CmADH1* y *CmADH2*, que muestran ambos una expresión específica en el fruto, dependiente de etileno y relacionada con la maduración (Manriquez *et al.* 2006). Respecto a las AAT, se han encontrado cuatro miembros en melón (*CmAAT1-4*), todos ellos se expresan durante la maduración del fruto y están regulados por etileno (Yahyaoui *et al.* 2002; El-Sharkawy *et al.* 2005). Tres proteínas (*CmAAT1*, *CmAAT3* y *CmAAT4*) muestran actividad aciltransferasa, pero no *CmAAT2*, que habría perdido la actividad enzimática por una mutación (El-Sharkawy *et al.* 2005). La variedad de los

sustratos que son capaces de utilizar también varía entre ellas *in vitro*, siendo CmAAT4 la que tiene un rango más limitado (Lucchetta *et al.* 2007).

Dos familias de enzimas transaminasas han sido relacionadas con la ruta de biosíntesis de volátiles de cadena ramificada a partir de aminoácidos en melón: las transaminasas de aminoácidos aromáticos (ArAT) y las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT) (Gonda *et al.* 2010). La expresión de *CmArAT1* y *CmBCAT1* es mayor en frutos climatéricos que en no climatéricos durante la maduración, y además muestra correlación con la acumulación de volátiles. Otra enzima implicada en la síntesis de compuestos aromáticos a partir de aminoácidos en melón es la metionina- γ -liasa (MGL) y su expresión ha sido correlacionada con la concentración de volátiles organosulfurados en el fruto (Gonda *et al.* 2013).

La producción de apocarotenoides también ha sido objeto de estudio en melón y se ha caracterizado una CCD (*CmCCD1*) cuya expresión aumenta durante el desarrollo y maduración del fruto tanto en variedades aromáticas (“Védrantais” y “Dulce”) como en no aromáticas (“Tam Dew” y “Tendral Verde”, tipo *inodorus*) aunque en estas últimas no se producen apocarotenoides volátiles debido, según los autores, a la ausencia de sustrato para esta enzima (Ibdah *et al.* 2006).

1.3.6. Acumulación de azúcares y ácidos orgánicos.

El balance entre azúcares y ácidos, determinante para el dulzor del fruto y su valor comercial, varía mucho entre variedades aunque generalmente las variedades dulces tienden a acumular mayor cantidad de azúcares y menor cantidad de ácidos (Burger *et al.* 2003). Aunque se conocen las vías de síntesis de ambos tipos de compuestos, el conocimiento sobre su regulación durante la maduración es muy escaso aunque parecen estar controlados por dos *loci*: *suc* (“sucrose”) y *So* (“sour”) de forma independiente de etileno (Silva *et al.* 2004; Nuñez-Paleniús *et al.* 2007). Recientemente se ha clonado el gen *CmPH* como responsable del gen mayor *So*, que controla la acidez en melón y muestra una gran conservación a nivel de proteína entre diversas especies vegetales (Cohen *et al.* 2014). Aunque se desconoce el modo en el que regula el pH, este gen presenta gran homología con transportadores de protones, proteínas transmembrana localizados en el retículo endoplasmático, y se ha encontrado una duplicación de 4 aminoácidos muy conservada entre variedades con niveles bajos de acidez.

El azúcar mayoritario en la pulpa de fruto maduro es la sacarosa y es considerado como el principal contribuyente al dulzor del fruto, siendo también importantes la glucosa y la fructosa (Stepansky *et al.* 1999). Entre el desarrollo del fruto y el final de la maduración los niveles de glucosa y fructosa varían poco tanto en variedades climatéricas como no climatéricas, pero los de sacarosa, que son muy bajos en el fruto en desarrollo, aumentan rápidamente al inicio de la maduración y alcanzan su punto álgido en el fruto maduro (Saladie *et al.* 2015). En melón se ha detectado actividad invertasa (INV) y sacarosa sintasa (SUS) durante la maduración del fruto, observándose diferencias de expresión de varias *CmINV* entre variedades climatéricas y no climatéricas (Hubbard *et al.* 1989; Saladie *et al.* 2015). Tras estudiar la correlación entre las dos actividades y la concentración de sacarosa en distintas variedades de melón, se han relacionado las altas concentraciones de sacarosa en el fruto maduro con una alta actividad SUS y una baja actividad INV (Stepansky *et al.* 1999). Los patrones de expresión de inhibidores de invertasa (*CmINVINH*) e invertasas también podrían ser un factor importante en el mantenimiento de estas altas concentraciones en frutos de la variedad PS, incluso tras su cosecha (Saladie *et al.* 2015).

Los ácidos orgánicos mayoritarios en fruto de melón son el ácido cítrico y el málico. En las primeras etapas del desarrollo del fruto la concentración de azúcares solubles es baja y la de ácidos es alta, pero desde el inicio de la maduración la concentración de azúcares incrementa a medida que disminuye la de ácidos (Lingle & Dunlap 1987; Hubbard *et al.* 1989).

1.3.7. Metabolismo de pared celular

Tal y como se ha descrito anteriormente, la mayor parte del reblandecimiento de la pulpa del fruto de melón durante la maduración está regulada de forma dependiente de etileno, aunque una fracción también lo está de forma independiente. En esta especie se han caracterizado genes implicados en el metabolismo de la pared celular como PG, GAL, XTH, XIL y EXP.

Se han encontrado seis genes de PG en melón, de los cuales tres (*CmPG1*, *CmPG2* y *CmPG3*) se expresan durante la maduración del fruto (Hadfield *et al.* 1998). *CmPG1* es la principal enzima modificadora de pectina de las reguladas por etileno ya que es la más abundante en la pulpa del fruto de la variedad “Védrantais”, su expresión es dependiente de etileno y alcanza su máximo entre los 43 y los 46 días tras la polinización (dap) coincidiendo con el pico de la hormona (Nishiyama *et al.* 2007). La expresión de *CmPG2* es independiente de etileno pero muy similar a la de *CmPG1*. En el caso de *CmPG3*, el patrón de síntesis también es parecido al de *CmPG1* y muestra una regulación tanto dependiente como independiente de etileno. Varias *CmPG* sin caracterizar muestran mayor expresión en la pulpa de fruto maduro de “Védrantais” que en PS (Saladie *et al.* 2015). Otra familia de genes que codifican para proteínas implicadas en la modificación de la pared celular son las GAL, responsables de la degradación de los β -galactanos, de las que se han encontrado tres miembros cuya expresión está relacionada con la maduración del fruto en “Védrantais”. La expresión de *CmGal2* comienza a aumentar alrededor de los dos días después del pico de etileno y *CmGal1* le sigue con un desfase de dos días. Por otro lado *CmGal3* muestra una expresión inferior a las otras dos pero constante desde el inicio del desarrollo del fruto hasta el final de la maduración (Nishiyama *et al.* 2007). Dos XTH, *CmXTH1* y *CmXTH3*, guardan relación con el reblandecimiento de la pulpa en melón y están reguladas de forma independiente de etileno. La expresión de la primera aumenta durante el desarrollo del fruto de “Védrantais” pero comienza a disminuir a los 36 dap, manteniéndose baja durante la maduración; y la segunda sigue un patrón similar pero retrasado en el tiempo, alcanzando su máximo de expresión a los 43 dap (Nishiyama *et al.* 2007). En un estudio transcriptómico comparativo entre PS y “Védrantais” se encontraron genes *CmXIL* más expresados en frutos maduros de cada una de las dos líneas, sugiriendo que los cambios en la firmeza del fruto de las variedades climatéricas y no climatéricas podría estar regulados por diferentes conjuntos de enzimas (Saladie *et al.* 2015). Por último, el homólogo en melón de *LeEXP1*, *CmEXP1*, aumenta su expresión durante la maduración del fruto bajo un control parcial por parte del etileno (Nishiyama *et al.* 2007).

1.3.8. Dehiscencia del fruto

La dehiscencia del fruto de melón, proceso característico de las variedades climatéricas y cuya regulación es dependiente de etileno, ha sido estudiada desde un punto de vista transcriptómico (Corbacho *et al.* 2013). En este trabajo, en el que se comparó la expresión génica en la capa de abscisión en distintas fases de desarrollo en la variedad “Védrantais”, se detectó la inducción de genes relacionados con el metabolismo de pared celular, el

tráfico de vesículas, la fosforilación de proteínas, la biosíntesis y señalización de fitohormonas (principalmente etileno y ácido abscísico, pero también auxinas, ácido jasmónico, ácido salicílico, poliaminas, brasinoesteroides, citoquininas y giberelinas) y el flujo de iones. Respecto al metabolismo de pared celular, se encontraron diferencias de expresión en genes de las familias PG, GAL, XTH, EXP, alpha- y beta-glucanasa, pectato liasa, pectín esterasas (PE), extensinas, celulosa sintasa (CEL) y quitinasa. Los autores observaron grandes cambios transcriptómicos que sugieren una regulación muy compleja del proceso de abscisión del fruto en el que estarían implicadas miembros de distintas familias de factores de transcripción, entre las que se encuentran MADS-box, AP2/ERF, Aux/IAA, homeobox, “zinc finger”, bZIP, WRKY y MYB, y varias fitohormonas.

2. OBJETIVOS

El objetivo central de esta tesis doctoral es el estudio de la regulación de la maduración en melón ejercida por el QTL *eth6.3*, que es capaz de inducir una maduración de tipo climatérica en un fondo genético no climatérico como el de PS. Con este objetivo se pretende profundizar en la comprensión de las diferencias entre frutos climatéricos y no climatéricos de esta especie. Para el estudio de *eth6.3* se ha dividido este objetivo general en tres objetivos específicos que serán abordados a lo largo de los cinco capítulos de resultados:

1. Clonaje posicional de *eth6.3* mediante el desarrollo de una población segregante para el QTL y la búsqueda de recombinantes en la región. Caracterización fenotípica de los recombinantes y la identificación de un gen candidato.
2. Validación del gen candidato a través de tres aproximaciones complementarias: mediante el estudio de su secuencia en una colección de variedades de melón; mediante la búsqueda de mutantes TILLING en una población de fondo genético climatérico y su caracterización fenotípica; y mediante su silenciamiento génico por RNAi en líneas portadoras de *eth6.3*.
3. Estudio transcriptómico mediante RNA-seq del fruto de la línea SC3-5-1 (con *eth3.5* y *eth6.3*) y PS a lo largo de la maduración como complemento a las aproximaciones genéticas anteriores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y cultivo

El material vegetal utilizado en el clonaje posicional del QTL *eth6.3* (cap. 4.1) deriva de una colección de líneas casi isogénicas (NILs) desarrolladas a partir del cruzamiento entre el cultivar élite “Piel de Sapo” T111 (PS, tipo *inodorus*, parental recurrente) y la accesión exótica de origen coreano “Songwhan Charmi” PI 161375 (SC, tipo *conomon*, parental donante) (Eduardo *et al.* 2005). Aunque los dos parentales presentan una maduración de tipo no climatérico, una NIL (SC3-5) mostró una maduración climatérica y fue descrito un QTL (*eth3.5*) en el GL III implicado en el proceso (Moreno *et al.* 2008). Posteriormente en SC3-5 se descubrió una segunda introgresión en el GL VI con un nuevo QTL también implicado en la maduración climatérica (*eth6.3*, Vegas *et al.* 2013) por lo que la línea que contiene ambas introgresiones fue rebautizada como SC3-5-1.

Para el clonaje posicional del QTL *eth6.3* (cap. 4.1) se desarrolló una población segregante a partir de dos individuos pertenecientes a la población 7M80, que es una F₂ del cruzamiento entre SC3-5-1 y PS (Figura 4.1.3 en el cap. 4.1). Los dos individuos seleccionados, 7M80-11 y 7M80-231 contienen introgresiones en homocigosis para PS en el GL III (*eth3.5*) y en heterocigosis en el GL VI (*eth6.3*). La nueva población, denominada 2012-F₄, consta de 1.300 individuos que tienen alelos de PS fijados para *eth3.5* y que segregan para *eth6.3*. En el cap. 4.1 también se utilizan los denominados genotipos fijos (GF) que representan las cuatro combinaciones posibles entre los dos QTL en homocigosis: la línea SC3-5-1 con los dos QTL (GF31), la línea con *eth3.5* (GF35), la línea con *eth6.3* (GF40) y la línea parental PS. En trabajos anteriores, las líneas GF31, GF35 y GF40 eran referidas como 8M31, 8M35 y 8M40, respectivamente (Vegas *et al.* 2013).

Para la validación del gen candidato mediante secuenciación (cap. 4.2) se utilizó una selección de 54 variedades de melón (Tabla 4.2.1 en el cap. 4.2) procedentes de la colección del COMAV (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana) descrita en Esteras *et al.* (2013) y Leida *et al.* (2015).

El material vegetal utilizado en la validación del gen candidato mediante TILLING (cap. 4.3) consta de nueve familias (246, 432, 2923, 4933, 3717, 2503, 4321, 502 y 503; ver Tabla 4.3.1 en el cap. 4.3) que provienen de una colección de mutantes generados a partir de la variedad climatérica “CharMono” por la URGV-INRA (Evry, Francia), descrita en Dahmani-Mardas *et al.* (2010).

Todas las plantas de este trabajo de tesis han sido germinadas y cultivadas siguiendo las mismas prácticas todos los años. Para la germinación de las semillas, primero fueron desinfectadas con fungicida captan (3 g/l) durante 5 minutos y, tras un lavado con agua, se envolvieron en papel de filtro húmedo y se pusieron a germinar en placas de Petri a 28°C y 12 horas de luz al día. Las plántulas fueron sembradas 24 horas después de su germinación en tiestos de fibra vegetal con tierra (composición 3:1:1 turba:vermiculita:perlita) en los invernaderos del CRAG. Cuando las plántulas crecieron hasta desarrollar dos hojas, a las dos semanas aproximadamente, fueron trasladadas a los invernaderos de Torre Marimón (Caldes de Montbui, Barcelona). Todas las plantas fueron cultivadas entre los meses de abril y octubre en sacos de plástico con fibra de coco (Pelemix) en un régimen de un mínimo de 16 horas de luz al día, a una temperatura mínima de 20°C y fertirrigación por goteo, utilizando luz artificial y/o calefacción en caso necesario. Se plantaron cuatro plantas por saco dejando solamente una rama principal por planta.

3.2. Micropropagación de melón *in vitro*

La micropropagación *in vitro* realizada en este trabajo de tesis sirvió para la reproducción vegetativa de los genotipos 7M80-11 y 7M80-231 en el cap. 4.1. El proceso duró aproximadamente 2 meses desde la introducción del material vegetal *in vitro* hasta la aclimatación de 20 esquejes por planta inicial y fue realizado en el laboratorio de cultivo *in vitro* del CRAG.

Se utilizaron los entrenudos como material de partida, por lo que se dejaron crecer las plantas durante un mes desde su germinación para contar con entre 5 y 10 entrenudos por planta. Se cortaron los extremos de los entrenudos dejando un margen de 3 cm a cada lado y se introdujeron en tubos Falcon de 50 ml para su desinfección con lejía (NaOCl 0,5%) durante 20 minutos. Después se realizaron entre tres y cinco lavados de 10 minutos con agua estéril para eliminar la lejía y se cortó 1 cm más de los extremos del entrenudo para retirar el tejido dañado.

Manipulando el material vegetal en condiciones de esterilidad dentro de cabinas de flujo laminar, los entrenudos fueron cultivados en medio MS (Murashige & Skoog 1962) complementado con Cu (1 mg/ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$). El cultivo se realizó en tubos de cristal de 15 ml a una temperatura de 28°C y 12 horas de luz/oscuridad. Semanalmente se realizaron controles para eliminar contaminaciones y cada tres semanas se realizaron subcultivos, dividiendo el nuevo brote en sus entrenudos y sembrándolos en medio fresco. Cuando se alcanzó el número de 20 brotes por genotipo se mantuvieron otras dos semanas *in vitro* para permitir el desarrollo de raíces antes del trasplante a tierra y el comienzo de la fase de aclimatación y endurecimiento.

La aclimatación de las plántulas tuvo lugar dentro de un incubador en el que se pulverizó agua para obtener unas condiciones de alta humedad. Durante los primeros 10 días tras el trasplante se fue abriendo la abertura del incubador para que la humedad disminuyera progresivamente hasta retirar por completo la tapa del incubador el décimo día. Por último, durante los siguientes 10 días las plántulas se dejaron crecer y endurecer en condiciones de 80% de humedad, 22°C y 18 horas de luz antes de ser trasladadas a los invernaderos de Torre Marimón, donde fueron cultivadas según se especifica en el apartado anterior.

3.3. Evaluación fenotípica de la maduración del fruto

Todas las plantas fueron autofecundadas de forma manual permitiendo un máximo de un fruto por planta. Para ello se emascularon flores femeninas retirando previamente la corona y se recogió polen de las flores masculinas de la misma planta con ayuda de una espátula. Tras depositar el polen de varias flores masculinas sobre el estigma femenino, se etiquetaron y embolsaron durante al menos tres días para evitar polinizaciones cruzadas. Transcurrido este tiempo se retiraron las bolsas y, si los frutos habían cuajado, se dejaron crecer y madurar hasta su dehiscencia o su cosecha entre los 65 y 70 días tras la polinización. Cada fruto fue fenotipado en base a tres aspectos relacionados con la maduración climaterica: el desarrollo de una capa de abscisión, el cambio en el color externo y la producción de compuestos aromáticos.

De estos tres marcadores fenotípicos el más importante es el relacionado con la capa de abscisión ya que permite distinguir los frutos climatericos de los no climatericos en melón (Pech *et al.* 2008). Se estudió la dehiscencia de todos los frutos, anotando los días transcurridos entre la fecha de polinización y la de dehiscencia o de cosecha en el caso de

frutos no dehiscentes. Para el fenotipado de los mutantes de TILLING (cap. 4.3) se anotó el grado de desarrollo de la capa de abscisión en los frutos no dehiscentes en una escala de 0 a 4, siendo 0: sin capa de abscisión; 1: capa de abscisión visible pero sin rotura de tejido; 2: fractura parcial del epicarpio (“half-slip”); 3: fractura total del epicarpio pero sin dehiscencia (“full-slip”); y 4: fruto dehiscente. El segundo marcador fenotípico utilizado fue el cambio de color externo del fruto de verde a amarillo durante la maduración, que tiene lugar en algunas variedades climatéricas y también en las líneas portadoras de los QTL *eth3.5* y *eth6.3* (Pech *et al.* 2008; Vegas *et al.* 2013). Cada fruto fue evaluado visualmente en el punto de dehiscencia o de cosecha para este carácter, teniendo en cuenta el área afectada por el cambio de color. Para el fenotipado de los mutantes TILLING (cap. 4.3) se midieron también los días transcurridos desde la polinización hasta el viraje de color, antes de la dehiscencia. El último marcador fenotípico utilizado en este trabajo consistió en la evaluación olfativa de cada fruto para la detección de los aromas característicos de la maduración climatérica, principalmente ésteres, frente a la baja producción de compuestos aromáticos en las variedades no climatéricas (Pech *et al.* 2008; Obando-Ulloa *et al.* 2010). Cabe destacar que, aunque el método de fenotipado se basa en el olfato, este carácter es muy claro y evidente.

El fenotipado del panel de variedades utilizado en el cap. 3.2 fue realizado por el COMAV en dos localizaciones para los caracteres de firmeza de la pulpa y de desarrollo de la capa de abscisión, tal y como se describe en Leida *et al.* (2015). La capa de abscisión fue valorada en una escala de 1 a 4: 1 sin rotura de tejido, 2: fractura parcial del epicarpio (“half-slip”); 3: fractura total del epicarpio pero sin dehiscencia (“full-slip”); y 4: fruto dehiscente. La firmeza de la pulpa expresada en Kg/0,5 cm² fue medida mediante un penetrómetro. Además una tercera variable indica el tipo de maduración o grado de climaterio según la experiencia de las personas responsables del fenotipado, y tiene en cuenta, además de las dos variables anteriores, el conjunto de los procesos que ocurren en el fruto durante el proceso de maduración y la intensidad de los mismos. Utilizaron una escala entre 0 y 4, siendo 0 una maduración completamente no climatérica como la de PS y 4 una muy climatérica como la de “Védrantais”, distinguiendo con puntuaciones de 1, 2 y 3 los fenotipos intermedios.

Todos los análisis estadísticos de los datos fenotípicos han sido realizados en R 3.2.1 (Team 2000) salvo que se especifique lo contrario. Los tiempos de cosecha de todos los frutos no dehiscentes fueron normalizadas a 70 días. Las comparaciones entre dos medias se realizaron mediante pruebas t de Student (función *t.test*). Las comparaciones múltiples de medias de los tiempos de dehiscencia o cambio de color externo (prueba de Dunnett) se calcularon tomando como referencia el parental PS (cap. 4.1) o “CharMono” (cap. 4.3) respectivamente, construyendo primero una matriz de contrastes (función *contrMat*) y posteriormente haciendo pruebas simultáneas para hipótesis lineales generalizadas (función *glht*) con el paquete multcomp 1.4-1 (Hothorn *et al.* 2008). Los estudios de asociación entre el fenotipo (capa abscisión, firmeza de la pulpa y grado de climaterio) y los polimorfismos se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA, función *aov*) ajustando un modelo lineal generalizado (función *glm*).

3.4. Manipulación de ácidos nucleicos

3.4.1. DNA

Todas las extracciones de DNA se realizaron a partir de hojas jóvenes con el método CTAB (Doyle 1990) con modificaciones para mejorar la calidad (García-Mas *et al.* 2000). Las extracciones fueron realizadas en tubo Eppendorf de 1,5 ml, excepto cuando el

número de muestras fue muy elevado y se utilizaron placas de 96 pocillos (ref. 409004, Deltalab, Barcelona, España) adaptando ligeramente el protocolo. Tras la extracción de DNA todas las muestras fueron tratadas con RNasa (200 ng/μl, Panreac, Barcelona) y cuantificadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Agarose D1 low EEO, Laboratorios Conda, Madrid, España) con tampón TAE (40 mM Tris-base, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA). Tras una tinción con EtBr (5 ng/ml) se visualizaron las muestras en un transiluminador con luz UV. Complementariamente, se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) cuando se necesitó una cuantificación más precisa.

3.4.2. RNA

Las extracciones de RNA para la secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq, cap. 4.5) se realizaron conjuntamente con el Dr. Juan Vegas y están descritas en su tesis doctoral (Vegas 2014), por lo que a continuación se ha incluido solamente una versión resumida.

Tras la recolección del fruto se troceó la pulpa, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su utilización. La extracción de material genético comenzó con la homogenización de una cantidad suficiente de material sin descongelar como para obtener 1,5 g de polvo fino de pulpa de fruto, del que se extrajo RNA total con TRI Reagent (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) adaptando el protocolo a un volumen de 20 ml. Tras la extracción, las muestras fueron purificadas con NH₄OAc (7,5 M) y 2,5 V de etanol absoluto. La cuantificación del producto de la extracción se realizó mediante electroforesis y Nanodrop, tal y como se describe en el ap. 3.4.1. Por último se eliminaron restos de DNA genómico con el kit Turbo DNA Free (Ambion, Foster City, USA) y se analizó la cantidad y calidad del RNA con Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). La purificación de la fracción de mRNA se realizó con el kit Dynabeads mRNA DIRECT (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) a partir de 75 μg de RNA total. De nuevo se asesoró la calidad del material purificado con Bioanalyzer 2100 y las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su secuenciación.

3.5. Secuenciación de ácidos nucleicos

3.5.1. Secuenciación de DNA por Sanger

La secuenciación de DNA de las regiones de interés requirió primero de una amplificación mediante PCR. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μl a partir de entre 40 y 100 ng de DNA molde. La composición de la mezcla de PCR fue 2 mM de MgCl₂, tampón Reaction Buffer (NH₄) de Bioline (Londres, Reino Unido), 1 mM de dNTPs, 0,13 mM de cada uno de los “primers” y 2 U de DNA polimerasa (Taq). La temperatura de hibridación (T_m) óptima para cada par de “primers” fue determinada mediante un ensayo de PCR en gradiente de temperatura entre 45 y 60°C. El diseño de los distintos amplicones secuenciados en este trabajo, así como las condiciones de amplificación se pueden consultar en la Tabla 3.1. El programa de amplificación del termociclador fue: un ciclo inicial a 94°C durante 1', 35 ciclos de 94° durante 30", T_m durante 30" y 72 durante 1', y un ciclo final de 72° durante 5'. El producto de PCR fue purificado para eliminar los “primers” y las sales del tampón de PCR mediante el filtrado a través de una columna de Sephadex G50 (Buckinghamshire, Reino Unido) en placa de filtro de 96 pocillos Multiscreen-HV (Millipore, Billerica, USA) o en tubo Eppendorf de 0,5 ml en función del número de muestras. Tras su cuantificación mediante Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA), se prepararon mezclas del producto de PCR y de los “primers” utilizados para la secuenciación según los requerimientos del Servicio de Secuenciación Capilar del CRAG (menos de 48 muestras) o de la empresa Macrogen Europe (Ámsterdam,

Países Bajos) (más de 48 muestras y secuenciación en placas de 96 pocillos). Los primers utilizados para secuenciar fueron los mismos que para la amplificación por PCR salvo que se indique lo contrario. Las secuencias fueron analizadas con el programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Estados Unidos).

3.5.2. Secuenciación masiva de mRNA

La secuenciación masiva de las muestras de mRNA (extraídas según se indica en el ap. 3.4.2) fue realizado en un equipo Roche 454 y usando química GS-FLX (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) por el Servicio de Secuenciación Masiva del CRAG. El proceso está explicado en el trabajo de tesis del Dr. Juan Vegas (Vegas 2014) y puede resumirse en tres pasos: la preparación de genotecas de cDNA, la PCR en emulsión y la secuenciación.

Para la síntesis de cDNA se fragmentó el mRNA hasta obtener secuencias de entre 50 y 2000 bp, que fueron utilizadas como molde de la primera cadena. Tras la síntesis de la segunda cadena, se ligaron dos adaptadores cuya función es formar uniones estables entre el cDNA y varios soportes físicos. Los adaptadores fueron utilizados para la purificación de las genotecas, eliminando aquellas moléculas de cDNA sin secuencias adaptadoras. Estos adaptadores también contienen motivos identificadores (denominados MID, “Molecular Identifier”) que se utilizan para identificar las muestras tras la secuenciación. Además, los adaptadores son fundamentales para el siguiente paso, la PCR en emulsión (emPCR), que consiste en una serie de reacciones de PCR individuales que tienen lugar dentro de microgotas de agua en el seno de una emulsión oleosa. La emPCR está diseñada de tal modo que cada gota contenga en su interior una microesfera magnética revestida con sondas homólogas a uno de los adaptadores y una sola molécula de cDNA. Gracias al confinamiento de las reacciones se consigue una disminución de las interacciones competitivas y una cantidad homogénea de producto de PCR que recubre la esfera al final de la reacción. Finalmente, las muestras son purificadas magnéticamente antes de su preparación para la secuenciación según las instrucciones del fabricante. A partir de este punto el proceso es prácticamente automático, y cuando finaliza genera archivos de lecturas cuyo análisis es explicado en el ap. 3.10.2.

3.6. Genotipado

En este trabajo se han utilizado marcadores moleculares basados en microsatélites o SSRs (“Simple Sequence Repeat”) y en SNPs, éstos últimos con sistemas de detección basados en la digestión de un producto de PCR con enzimas de restricción como CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”) o en PCR con discriminación alélica como las técnicas TaqMan y KASP. A continuación se describe el proceso de genotipado y, cuando corresponde, también el del diseño del marcador.

3.6.1. SSRs

Todos los microsatélites o SSRs utilizados en este trabajo ya habían sido desarrollados con anterioridad y se encuentran publicados (Morales *et al.* 2004; Gonzalo *et al.* 2005; Fukino *et al.* 2008; Deleu *et al.* 2009; Vegas *et al.* 2013). Los marcadores, “primers” y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3.2. El proceso de genotipado está descrito en (Vegas *et al.* 2013) y, brevemente, consiste en la amplificación de la región polimórfica mediante PCR con “primers” específicos marcados con sondas fluorescentes (IRD700 e IRD800), en la separación de los amplicones por electroforesis y en la visualización de las diferencias de tamaño por medio de la fluorescencia. Las reacciones de PCR se realizaron

Tabla 3.1: Diseño de amplicones para secuenciación por Sanger. Se indican las características de los amplicones así como las condiciones de reacción de PCR.

- a: Utilizado para la secuenciación de la colección de variedades del COMAV (cap. 4.2).
 b: Utilizado para el genotipado de las familias TILLING 5388, 246, 432 y 2923 (cap. 4.3).
 c: Utilizado para el genotipado de las familias TILLING 3717, 4933 y 2503 (cap. 4.3).
 d: Utilizado para el genotipado de las familias TILLING 502, 503 y 4321 (cap. 4.3).
 e: Utilizados para el mapeo fino de *eth6.3* (cap. 4.1).

Amplicón	Tamaño (bp)	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Tm (°C)	[MgCl ₂] (mM)
PRO40.1 ^a	613	TACTTTGAGTTTCACACGCGG	GGAAAGCTCCCAAAGGATCGAA	60	2
CDS40.1 ^{ab}	665	ATGGAGAGCACCCGACTCATC	AGGTGTAATTCAGAGCCCGTAAAA	60	2
CDS40.2 ^{bc}	591	CTCCTGGCTATGATTTGGCC	TGGAAGTAGAAGCCCCATCA	60	2
CDS40.3 ^{ad}	603	TCAAAACGTCCTGCCCTCTCT	TGGCCTCCTTTCAAAATGGGT	60	2
SEQ-1 ^e	394	TCCTTACTGAAAGTTACCCAAA	CACCTTCACGTGTCAACC	60	2
SEQ-2 ^e	240	GCAGGAAATGGTAICTTAGCCA	ACAACAAAATGGCAATAGCAGAAACG	60	2
SEQ-3 ^e	392	TGCCCAACCTTATCCCATGT	GGTATGAGGGGTTTTGAGTGG	60	2
SEQ-4 ^e	356	TCACGTTGGAAACTTTGGAC	CTCAGCAAAGTAATTCCTACCA	60	2
SEQ-5 ^e	249	AGCTTTTCATTCGGCAGGTG	TGGGAGTCATTCAATCTAACCT	60	2
SEQ-6 ^e	300	CGATCCTATTTC AACACACA AACT	ATCTCCAAACCGCGGATTCCTTG	60	2

Tabla 3.2: Marcadores moleculares tipo SSR y CAPS utilizados en el mapeo fino de *eth6.3* y referencia donde fueron descritos. Se indican las características de cada marcador así como las condiciones de PCR.

Marcador	Tipo	GL	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Tm (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Enzima res.	Referencia
A_16-C12	SSR	III	ATAAATGGGTGTCATCGGAGGAG	GGTGGTGAATTAATGGAAAGC	51	2	-	Fernandez <i>et al.</i> 2010
PS_18-D10	SSR	III	GATTCCTTGGGCTGTGACCTC	GCTAAGGAAAGGGTTTGTTCG	51	2	-	Fernandez <i>et al.</i> 2010
PSI_41-H06	SSR	VI	CAACCAATCCTCCCAATTCAT	CACCACCTGTGACATTTGTACG	59	2	-	Fernandez <i>et al.</i> 2010
AP2/ERF	SSR	VI	GCTGCTGTCAAAGATGACCA	GTCGGTTTGA CTGTCGGAAAT	45	2	-	Vegas <i>et al.</i> 2013
FR14-P22	CAPS	VI	AGGAAAGGAAAGTACCCAAATG	TTCCGGATAATACCCAAATCATC	60	1,5	<i>Bgl</i>	Deleu <i>et al.</i> 2009
CMCTN41	SSR	VI	CCCCAAGATTCGTATTAAATC	TGGTAGTAGAGATGATATAC	51	2	-	Gonzalo <i>et al.</i> 2005
CMN61_14	SSR	VI	TGCAGGATCAAGAATCAAGTTC	ACGAACTCCGGCATAATCAC	56	2	-	Fukino <i>et al.</i> 2008
TJ14	SSR	VI	TTCCAATGCCCTAAAGTTGC	CAAGCAAACCAAAGACATGC	56	2	-	Morales <i>et al.</i> 2004
CL_23-F08	SSR	VI	CATAGAGCATTTCGCCGGAGT	TGAAAAGCTAGCATGGATTGG	59	2	-	Fernandez <i>et al.</i> 2010

en un volumen de 15 μ l con tampón Reaction Buffer (NH_4) de Bioline (Londres, Reino Unido), entre 1,5 y 2 mM MgCl_2 , 166 μ M dNTPs, 2 pmol de cada *primer*, 0,66 pmol de sonda fluorescente, 2 U de DNA polimerasa y 20 ng de DNA. El programa del termociclador es idéntico al descrito en el ap. 3.5.1. Tras la cuantificación del producto de PCR se desnaturalizaron las muestras a 94°C con el buffer de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% cianol xileno). Finalmente se separaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de acrilamida (6% acrilamida, AA:BIS 19:1) en condiciones desnaturalizantes a 50°C con buffer TBE (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, 7,5 M de urea y pH 8) en un secuenciador automático Li-COR (Li-Cor Inc, Lincoln, USA). Las imágenes tomadas por el equipo fueron analizadas utilizando el software GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Program, www.gimp.org).

3.6.2. SNPs

El genotipado de SNPs mediante técnica CAPS se basa en la amplificación mediante PCR de la región polimórfica y la posterior digestión específica de uno de los dos alelos por parte de una enzima de restricción (Konieczny & Ausubel 1993). En este trabajo solamente se utiliza un marcador CAPS, FR14-P22, cuyo diseño y condiciones de PCR pueden consultarse en la Tabla 3.2. La región de interés fue amplificada tal y como se indica en el apartado 3.6.1 pero en un volumen de 25 μ l. La digestión con la enzima de restricción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l con 10 μ l de producto de PCR, 2,5 U de enzima y el buffer de reacción según las instrucciones del fabricante. Tras la digestión se separaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Los dos ensayos TaqMan (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) desarrollados para el clonaje posicional de *eth6.3* (cap. 4.1) se basan en una reacción de PCR con discriminación alélica con dos sondas marcadas fluorescentemente y dos “primers” comunes. Las sondas son moléculas de DNA unidas a una molécula fluorescente y a un desactivador de la fluorescencia, y están diseñadas para hibridar específicamente con la secuencia de uno de los dos alelos del polimorfismo a genotipar. El ensayo TaqMan consiste en utilizar dos sondas marcadas con moléculas fluorescentes distintas que durante la PCR hibridan con la cadena molde entre los dos “primers” comunes, de forma que en la fase de extensión la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa degrada la sonda y separa el desactivador de la molécula fluorescente. Al final de la PCR, la intensidad de la fluorescencia indica la presencia de uno o ambos alelos en la muestra genotipada. Para el diseño de los marcadores se buscaron SNPs entre las líneas PS y SC utilizando los datos de la resecuenciación de las dos variedades parentales y la herramienta SUPER (Sanseverino *et al.* 2015), escogiendo dos SNPs de alta calidad en las regiones de interés y sin otros polimorfismos a menos de 50 bp de distancia. La posición respecto al inicio de la pseudomolécula del GL VI de la versión 3.5.1 del genoma y los alelos de estos dos SNPs pueden consultarse en la Tabla 3.3. Los primers y las sondas fueron diseñados utilizando el sistema automático de la página web del fabricante (www.lifetechnologies.com/snpcadt), sus secuencias no están disponibles para el usuario y son proporcionadas ya mezcladas en un “assay mix”. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 5 μ l añadiendo 2,5 μ l de 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos), 2,375 μ l de DNA genómico (40 ng/ μ l) y 0,125 μ l de “assay mix”. Se utilizaron placas de 96 pocillos opacas (ref. 900113B, Deltalab, Barcelona, España) y un equipo LightCycler 480 del Servicio de Genómica del CRAG (Roche, Basel, Suiza) con el siguiente programa de PCR: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 1’; 10 ciclos de amplificación en gradiente de temperatura consistentes en 95°C durante 20” y 61° durante 1’, disminuyendo la temperatura desde 61°C hasta 57°C en intervalos de 0,8°C por ciclo; y 26

Tabla 3.3: Diseño y posición de los marcadores moleculares tipo TaqMan y KASP utilizados en el mapeo fino de *eth6.3*. La posición es relativa al inicio de la pseudomolécula del GL VI según el genoma de referencia v3.5.1 (Argyris *et al.* 2015b). PS: ‘Piel de Sapo’. SC: ‘Songwhan Charmi’. Los cebadores A1 y A2 son específicos de alelo y C es el cebador común.

Marcador	Tipo	GL	Posición (bp)	Alelos (PS/SC)	Primer A1	Primer A2	Primer C
SNP-64658	TaqMan	VI	24,226,183	CG/AA	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACAGGTTAGTGTGAGCTCATCA	AGGTCCGAGTCAACGGATATCTAAAAGCTCTAAGCATCTCAAAAATK	GGGTGATATTTTAAACTCTGGCACTGAA
SNP-193229	KASP	VI	24,354,754	CC/TT	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATATGCGACGCTCTAAATTTGCCA	AAAGTCCGAGTCAACGGATTTGATGGCGATATGTAAGAGGATGAC	CATCTGACAACTCTTTGAGATTTGTATGACAA
SNP-305343	KASP	VI	24,466,868	CC/TT	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCGCAAAATCCGGCAAATCT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTTATCTATTTATCTGTTATTTACTAAA	GCAGAAAAGTGAATTTGAGGTTTATTTATA
SNP-423732	KASP	VI	24,585,257	AA/GG	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAGTACCTCTTAAGATGCAACAATGG	GGTCCGAGTCAACGGATTTGTTCCAAATTTAGTCAAAATTAATGATC	CCAGAGGAMTAGTTAAACTGTAGCTTATTT
SNP-551712	KASP	VI	24,713,237	AA/GG	GAAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTTATATATACAAAGAACCCCTTACATTC	GTTCGGAGTCAACGGATTTCTCAATAAATATCATAAATGTTTTATTTGAT	CTTTTCTTTTATGATGATGATATATATTTCTCA
SNP-719040	KASP	VI	24,880,565	GG/AA	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTCTTCCG	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGAAGGATCAAGTAC	CCTATTTGATCTTCCACATTTTTCGACAAA
SNP-833872	KASP	VI	24,995,397	CC/GG	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTCTTCCG	AAGTCCGAGTCAACGGATTTCTCAATAAATGATGAGGATTTGGTTTC	TATGATGTTGGGAAGCAAACTAGTAGCTT
SNP-911281	KASP	VI	25,072,806	CC/AA	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAA	AAGTCCGAGTCAACGGATTTCTCAATAAATGATGAGGATTTGGTTTC	GTACAAATATCTAGTCTCAAAAACATATATA
SNP-1249717	KASP	VI	25,158,626	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GAGCCAATCTCTATCTCAAGATGAAATA
SNP-1121435	KASP	VI	25,282,960	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GAGCCAATCTCTATCTCAAGATGAAATA
SNP-1249717	KASP	VI	25,411,242	GG/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GGATCCCATCCACCTTCAATTTGTCAAA
SNP-1326612	KASP	VI	25,488,137	GG/TT	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	AAAGTGTGGAAGCAAAAGGGTGGAGTTA
SNP-1412559	KASP	VI	25,574,084	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GGGGGACAAAAGAAATCATCAATCCCAT
SNP-1497449	KASP	VI	25,658,974	AA/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GTTCAGTTTACTGTAGGAGATCAAGTTTA
SNP-1631731	KASP	VI	25,793,256	AA/GG	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GGTGTTTTCCAGAACAGAACCTACAAA
SNP-1773082	KASP	VI	25,934,607	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GCATAAAGGCACAAATCTACATTTGCAGAA
SNP-1839795	KASP	VI	26,001,320	AA/TT	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	CTTCCCTTCAACAGTCTGCTCCAAA
SNP-1986139	KASP	VI	26,147,664	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	CTTTTTCATGGAAAATCTCCCTGAAAGCTA
SNP-2100593	KASP	VI	26,261,918	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	CAATGCAAAAAGGATTTGAGGAGATTTGCAA
SNP-2102884	KASP	VI	26,354,409	CC/TT	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	CGCCACTTTCTTAAATCCGAGATTAATA
SNP-2319007	KASP	VI	26,480,532	CC/AA	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	TTTTTCCCTCTCTTTGTTGGAAACCTTAT
SNP-2424110	KASP	VI	26,585,635	GG/AA	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	TGAACCTTCTATTTGCGAGGAAGTCTACTT
SNP-2520741	KASP	VI	26,682,266	TT/AA	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	GGTCCAGTAATGAAAATCTAGTCACTT
SNP-2609965	KASP	VI	26,771,490	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	ACTCAAAAAGGACTAAGCGGGTTGGTT
SNP-2691690	KASP	VI	26,853,215	TT/CC	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	CAGAGCATACCTCTCTTTTGGACATAAAT
SNP-2826073	TaqMan	VI	26,987,598	CG/AA	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTTGTGCTGAGTTGCTGAGTTGAGAAAT	GAAGTCCGAGTCAACGGATTTCTGATAATGAGGATTTGGTTTC	CAGAGCATACCTCTCTTTTGGACATAAAT

ciclos de amplificación a temperatura constante (95°C durante 20" y 57°C durante 1'). Finalmente se cuantificó la fluorescencia a 37°C y se utilizó la opción "Endpoint Genotyping" del software LightCycler 480 1.5 (Roche, Basel, Suiza) para extraer el genotipo de cada muestra.

Para el genotipado de los recombinantes (cap. 4.1) se diseñaron 24 marcadores con química KASP (LGC, Teddington, Reino Unido). En resumen, esta técnica consiste en una reacción de PCR con discriminación alélica utilizando dos "forward primer" (denominados A1 y A2) que se unen específicamente a un alelo del polimorfismo cada uno y un "reverse primer" común (C). Cada "forward primer" incorpora una secuencia que se hibrida con una molécula fluorescente incluida en el buffer de reacción, que queda permanentemente unida al producto de PCR y que sirve para la detección de los alelos en la muestra. Los SNPs entre PS y SC fueron obtenidos del mismo modo que para las sondas TaqMan y el diseño de los primers se realizó utilizando el software Kraken (LGC, Teddington, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los tres primers así como la posición de los SNPs respecto al inicio de la pseudomolécula correspondiente al GL VI del genoma de referencia (v3.5.1) se pueden consultar en la Tabla 3.3. Tanto las reacciones de PCR como el análisis de resultados fueron realizados por el Servicio de Genómica del CRAG en un equipo Fluidigm (San Francisco, Estados Unidos) a partir de 5 µl de DNA (40 ng/µl). Para facilitar la visualización de los resultados, se desarrolló el "script" `fluidigm2tab.py` que ordena las muestras y genotipos según los parámetros fijados por el usuario (código en el Anexo).

3.7. Clonaje posicional del QTL *eth6.3*

De la progenie de los individuos F₂ 7M80-11 y 7M80-231 se buscaron dos individuos F₃ (7M80-11-4 y 7M80-231-5, representados en la Figura 4.1.3 del cap. 4.1) que fueran idénticos a sus progenitores a través del genotipado con SSRs para su micropropagación *in vitro* mediante esquejes. Los marcadores utilizados fueron: A_16-C12 y PS_18-D10 en el GL III; y PSI_41-H06, AP2/ERF, FR14-P22, CMCTN41, CMN61_14, TJ14 y CI_23-F08 en el GL VI (Tabla 3.2). Veinte plántulas obtenidas a partir del individuo 7M80-11-4 fueron cultivadas, autofecundadas y produjeron frutos al final de la primavera de 2012. Durante el verano del mismo año se germinaron alrededor de 1.100 semillas de esos frutos, que dieron lugar a la población segregante 2012-F₄. Para el clonaje posicional del QTL *eth6.3* se cribó la población 2012-F₄ con dos marcadores flanqueantes tipo TaqMan SNP-64.658 y SNP-2.826.073 (Tabla 3.3) para la detección de recombinantes. Posteriormente se utilizaron 24 marcadores adicionales diseñados con química KASP (Tabla 3.3) para el genotipado fino del punto de recombinación de cada uno de ellos. Todos los recombinantes fueron cultivados y se obtuvo suficiente cantidad de semillas para un fenotipado mediante análisis de progenie de entre 15 y 20 individuos por recombinante. Del total de recombinantes se seleccionaron 17 según su punto de recombinación y sus progenies fueron fenotipadas en los veranos de 2013 y 2014. Finalmente fue necesario el desarrollo de otros seis marcadores basados en secuenciación (indicados en la Tabla 3.1) para la selección de un gen candidato.

3.8. Detección de mutantes de TILLING

El cribado de la población "CharMono" (6.200 mutantes) se llevó a cabo dividiendo la secuencia del gen en dos fragmentos de 1.155 y 955 bp denominados A1 y A2 respectivamente, que fueron amplificados mediante PCR con los "primers" A1-2F y A1-3R (A1) y A2-11F y A2-12R (A2). El producto de estas reacciones fue utilizado como molde

para una segunda PCR anidada con “primers” internos portando colas M13 marcadas con sondas fluorescentes M13F700 y M13R800. El amplicón A1 fue amplificado con los “primers” A1-6F y A1-8R (dando lugar a un fragmento de 920 bp) y el A2 con A2-14F y A2-17R (807 bp). La secuencia de los “primers” para la amplificación de A1 y A2, así como las T_m específicas de las PCR, pueden consultarse en la Tabla 3.4. La primera PCR (denominada N1) se realizó en un volumen de 25 μ l con tampón NEB, 200 μ M de dNTPs, 0,4 μ M de cada primer, 1 μ l de DNA polimerasa y 4 ng de DNA de “pools” de 8 mutantes. El programa de amplificación consistió en un primer ciclo de 94°C durante 2’, 30 ciclos de 94°C durante 15”, T_m durante 30” y 72°C durante 1’, y un último ciclo a 72°C durante 5’. Se verificó y cuantificó el producto de PCR mediante gel de agarosa al 1%. La segunda PCR (N2) se realizó en el mismo volumen y variando ligeramente la composición: tampón NEB, 200 μ M de dNTPs, 0,1 μ M de cada primer, 0,1 μ M de cada sonda fluorescente (M13F700 y M13R800), 1 μ l de DNA polimerasa y 1 μ l del producto de la PCR N1. El programa de amplificación consistió en 94°C durante 2’, 10 ciclos de 94°C durante 15”, T_m durante 30” y 72°C durante 1’, 25 ciclos de 94°C durante 15”, 50°C durante 30” y 72°C durante 1’, y 72°C durante 5’. La detección de mutantes se realizó siguiendo el mismo protocolo que Dahmani-Mardas *et al.* (2010) y que brevemente consiste en una digestión enzimática del producto de N2 con la endonucleasa *EndoI* y la separación de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en un gel de acrilamida. Las condiciones de electroforesis son idénticas a las del genotipado de SSRs (ap. 3.6.1). Para determinar la mutación exacta de los mutantes identificados se secuenció el producto de la PCR N1 con los “primers” indicados en la Tabla 3.4 y se predijo el efecto de las mutaciones observadas sobre la función proteica con la herramienta PROVEAN (Choi *et al.* 2012). Se pidieron semillas M2 de aquellas familias portadoras de mutaciones con cambio de aminoácido al banco de semillas del INRA (GAFL, Montfavet, Francia) que fueron sembradas y genotipadas mediante secuenciación (ver amplicones utilizados en la Tabla 3.1), eligiendo preferentemente individuos homocigotos para su fenotipado en las temporadas de 2014 y 2015.

Tabla 3.4: “Primers” utilizados en las PCR N1 y N2 de los amplicones A1 y A2 en el cribado de la población de TILLING “CharMono”. Se indican, además, la T_m y el diseño de los “primers” utilizados para la verificación por secuenciación de los mutantes encontrados. Los nucleótidos subrayados indican las colas M13 utilizadas para marcar los “forward primer” (CACGACGTTGTAAAACGAC) y “reverse primer” (TAACAATTTTCACACAGG).

Amplicón	Primer	Uso	Secuencia (5'-3')	T_m (°C)
A1	A1-2F	PCR N1	GATCAGCTTTGCCTGTTTTGTGCAA	55
A1	A1-3R	PCR N1	ATTGTTGGCCACTATTCCTTGAAGC	55
A1	A1-6F	PCR N2 y secuenciación	<u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CTTCCTCCTCTCTTC	50/60
A1	A1-8R	PCR N2	<u>TAACAATTTTCACACAGG</u> CTTCATTGAATCTTCCC	50/60
A1	A1-9R	Secuenciación	GAAATAATATTGAAATAGGGATTTA	46
A2	A2-11F	PCR N1	AATATAGGTTGGCGGATAATAAGCC	55
A2	A2-12R	PCR N1	TACCAAACATAAAACCCCTCAATACC	55
A2	A2-14F	PCR N2	<u>ACGACGTTGTAAAACGAC</u> CGGCTCTGAATACACCT	50/60
A2	A2-17R	PCR N2 y secuenciación	<u>TAACAATTTTCACACAGG</u> CTAAAACCCCTCAATACC	50/60
A2	A2-16F	Secuenciación	<u>ATAACAATTTTCACACAGG</u> GGGTTGAATTGAACTGG	62

3.9. Obtención de una construcción RNAi

La obtención de una horquilla de RNA (hpRNA) para el experimento de RNAi (cap. 4.4) se realizó en tres fases: primero se construyó el casete de expresión del hpRNA utilizando el vector pKANNIBAL (Wesley *et al.* 2001) en *E. coli*, después se clonó el casete en el vector binario pART27 (Gleave 1992) y por último se transformó *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción final pART27-HP.

3.9.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las bacterias utilizadas en la construcción del hpRNA fueron *E. coli* cepa JM109 (Promega, Madison, USA) y *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL0. Las dos cepas son competentes y pueden ser transformadas mediante choque térmico tal y como se indica más adelante.

El cultivo de bacterias se realizó en medio LB (Bertani 1951) al que se le añadieron agentes de selección como kanamicina (kana, 50 mg/l), espectinomicina (spec, 50 mg/l) y rifampicina (rif, 50 mg/L). En algunos casos también se añadió IPTG (0,1 mM) y X-gal (20 mg/l) para utilizar el sistema “reporter” LacZ. Para el cultivo en placa de Petri se añadieron 15 g/l de agar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) para obtener un medio sólido. La temperatura de crecimiento fue de 37°C para *E. coli* y 28°C para *Agrobacterium*.

3.9.2. Técnicas específicas utilizadas en la obtención del RNAi

A continuación se describen las técnicas utilizadas únicamente en el proceso de construcción del hpRNA.

Digestiones enzimáticas

Todas las digestiones enzimáticas de este apartado fueron realizadas en un volumen de 50 µl ajustando la cantidad de DNA según las características de cada enzima. Para asegurar una digestión completa se incubaron las muestras durante 3 horas a la temperatura indicada, añadiendo 1 µl de enzima al término de la segunda hora. Después de cada digestión enzimática se purificaron las muestras mediante el filtrado a través de una columna de Sephadex G50 (Buckinghamshire, Reino Unido).

Ligaciones

Las ligaciones fueron realizadas utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Antes de la reacción se calculó la concentración molar tanto del inserto como del vector mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se realizaron dos reacciones de ligación en paralelo con unos ratios inserto/vector distintos y específicos para cada caso. El periodo de incubación fue de 10 horas a 16°C.

PCR de colonias

Las condiciones de las PCR de colonias fueron las mismas que para el genotipado de SSRs (ap. 3.6.1) con la excepción de que, en lugar de añadir DNA, se resuspendieron en la mezcla de reacción bacterias muestreadas directamente de cada colonia. Las parejas de “primers” utilizadas se especifican más adelante. El resultado de la PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa.

Minipreparaciones

Las minipreparaciones de DNA de plásmido fueron realizadas a partir de 3 ml de cultivo de bacterias que se dejaron crecer durante 12 horas. Tras una precipitación mediante centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm, se lisaron las células y se purificaron los plásmidos con el kit Gene Jet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos). El resultado de la minipreparación fue cuantificado mediante electroforesis y con Nanodrop.

Transformación bacteriana

Para la transformación de la cepa JM109 de *E. coli* se siguió el protocolo recomendado por el proveedor (Promega, Madison, USA). Brevemente, consiste en precipitar el plásmido sobre la pared celular bacteriana con hielo y provocar su desestabilización mediante un choque térmico a 42°C de forma que el plásmido se introduzca en el interior. Posteriormente se dejaron crecer las bacterias en medio LB líquido durante una hora antes de ser sembradas en placas con medio LB sólido con el agente de selección adecuado. Las primeras colonias transformantes comenzaron a ser visibles a partir de las 12 h desde el cultivo. Por otro lado la transformación de la cepa AGL0 de *Agrobacterium* consistió en: (1) mezclar células competentes con DNA plasmídico en una proporción 2:1 v/v y mantenerlo 5 minutos en nitrógeno líquido, (2) realizar un choque térmico a 37°C durante 30 minutos, (3) añadir 1 ml de medio de cultivo líquido e incubar durante 1 hora y (4) cultivar alícuotas de 300 µl en placas con medio selectivo. Entre las 48 - 72 horas comenzaron a crecer las primeras colonias transformantes.

Glicerinado

El glicerinado de bacterias consistió en diluir una alícuota de 850 µl de cultivo líquido con 150 µl de glicerina seguido de su congelación inmediata con nitrógeno líquido y su conservación a largo plazo a -80°C.

3.9.3. Proceso de construcción del hpRNA

El proceso de construcción comenzó con la amplificación del fragmento denominado 200-NAC, entre los nucleótidos 1.003 y 1.203 del gen *MELO3C016540*, mediante PCR con los “primers” HP-2F y HP-2R. Las características de todos los “primers” utilizados en este apartado pueden consultarse en la Tabla 3.5. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µl a partir de 200 ng de DNA del parental SC utilizando el kit Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase según las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) y utilizando el mismo programa de amplificación que para el genotipado de SSRs (ap. 3.6.1). A continuación el fragmento 200-NAC y el vector pKANNIBAL fueron digeridos por separado con las enzimas *EcoRI* y *KpnI*, purificados y cuantificados para calcular los ratios molares de la ligación (5x y 10x en este caso). El producto de ligación fue utilizado para transformar *E. coli* y las bacterias con la construcción pKan-200-NAC fueron seleccionadas mediante el cultivo en medio LB + kana. Se cribaron las colonias resistentes mediante PCR de colonias con los “primers” 35S-F y HP-2R y se confirmó la construcción de las colonias positivas mediante la digestión de la minipreparación con *EcoRI* y *KpnI* y su secuenciación con el “primer” 35S-F. Para la inserción de la segunda copia de 200-NAC se repitió el mismo proceso. En este caso, en lugar de pKANNIBAL se utilizó pKan-200-NAC, las enzimas de restricción fueron *XbaI* y *HindIII*, y los “primers” utilizados int4-F y HP2-F (para la PCR de colonias) y 35S-F y int2-F (para la secuenciación de la minipreparación).

Una vez completada la construcción del vector pKan-HP, se separó el casete de expresión mediante digestión enzimática con *NotI*. El aislamiento del casete (3.366 bp) del resto del

vector (3.882 bp) se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa recuperando la banda de interés del gel con una hoja de bisturí bajo luz UV y purificando el DNA con el kit High Pure PCR Purification (Roche, Basel, Suiza). El vector binario pART27 también fue digerido con la misma enzima y se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina (rSAP, New England Biolabs, Ipswich, USA) para prevenir su recircularización. El casete y pART27 fueron ligados con unos ratios inserto/vector de 10x y 15x y la ligación fue utilizada para la transformación de *E. coli*. En este caso las bacterias fueron cultivadas en el medio LB + spec + IPTG + X-gal para utilizar el sistema LacZ en la selección de colonias transformantes. Se verificó la presencia de pART27-HP mediante PCR de colonias con los “primers” OCS-F y pARTlac-3R y se extrajo el plásmido de las colonias positivas mediante minipreparación para su confirmación mediante digestión con la enzima *NotI* y secuenciación con los “primers” indicados en la Tabla 3.5.

Finalmente, el vector binario pART27-HP fue introducido en *Agrobacterium tumefaciens* y las bacterias transformadas fueron cultivadas en medio líquido LB + rif + spec hasta la aparición de las primeras colonias. Las colonias se verificaron mediante PCR con los “primers” OCS-F y pARTlac-3R y después se conservaron a -80°C mediante glicerinado.

Tabla 3.5: Secuencia y localización de los “primers” utilizados en la construcción RNAi. Los nucleótidos subrayados indican las dianas de restricción: *EcoRI* (GAATTC) y *KpnI* (GGTACC). En negrita se indican las dianas de restricción: *XbaI* (TCTAGA) y *HindIII* (AAGCTT).

a: “primers” utilizados en la verificación por secuenciación de pKan-HP.

b: “primers” utilizados en la verificación por secuenciación de pART27-HP.

Primer	Localización	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
HP-2F	MELO3C016540	CGGTCTAGAGAAATTCAGCAATGCTACCAATTCAAAAC	60
HP-2R	MELO3C016540	CGGAAGCTTGGTACCGTGAGTAGAGTGGTGAAGGA	60
35S-F ^{a,b}	Promotor CaMV 35S (pKANNIBAL)	TCATTGCGATAAAGGAAAGGC	60
35S-R ^b	Promotor CaMV 35S (pKANNIBAL)	GGGATGAAGTTCAACCTGTC	55
int-1R ^b	Intrón <i>pdk</i> (pKANNIBAL)	TCATACTAATTAACATCACTTA	44
int-2F ^{a,b}	Intrón <i>pdk</i> (pKANNIBAL)	AATATAACAAAGCGCAAGATC	60
int-4F ^b	Intrón <i>pdk</i> (pKANNIBAL)	GTATAAAATAGTTAAGTGATGTT	60
OCS-F ^b	Terminador <i>ocs</i> (pKANNIBAL)	ATCTACGACACACCGAGCG	60
pARTlac-F ^b	Gen <i>LacZ</i> (pART27)	AATACGCAAACCGCCTCTCC	62
pARTlac-2R ^b	Gen <i>LacZ</i> (pART27)	GGCCTCTTCGCTATTACGC	58
pARTlac-3R	Gen <i>LacZ</i> (pART27)	ATGTGCTGCAAGGCGATTAA	60

3.10. Análisis bioinformático de secuencias

3.10.1. Análisis comparativo y filogenético de secuencias

En este trabajo de se han realizado análisis comparativos y filogenéticos de secuencias, tanto de DNA como de proteínas, para la validación del gen candidato mediante secuenciación (cap. 4.2) y en el diseño de la construcción de RNAi (cap. 4.3). La

procedencia de las secuencias analizadas es diversa y se detalla a continuación. La lista de secuencias de DNA de los genes NAC de melón se obtuvo mediante la predicción de dominios NAC en el genoma de referencia (García-Mas *et al.* 2012) utilizando la herramienta *hmmscan* del software HMMER3 (Finn *et al.* 2011). El perfil del dominio NAC (código PF02364) fue descargado de la base de datos Pfam (Finn *et al.* 2014) en mayo de 2015. El punto isoeléctrico y peso molecular de las proteínas NAC de melón fueron calculadas con la herramienta Sequence Manipulation Suite (Stothard 2000). Las proteínas NAC de diversas especies y con función conocida se obtuvieron a través de una búsqueda bibliográfica y la consulta de las bases de datos “The Arabidopsis Information Resource” (TAIR, www.arabidopsis.org) y “Universal Protein Resource” (UniProt, www.uniprot.org). La relación completa de genes utilizados se encuentra en la Tabla 3.6. Las secuencias de DNA de *MELO3C016540* en una colección de variedades de melón se obtuvieron a partir de la secuenciación de cuatro amplicones (Tabla 3.1) en las 54 variedades del COMAV.

Tabla 3.6: Lista de proteínas de la familia de factores de transcripción NAC de diversas especies y de función conocida con el código UniProt y la referencia del trabajo en el que fueron descritas.

Especie	Proteína	Función	Código UniProt	Referencia
<i>Oryza sativa</i>	OsNAC1	Crecimiento y desarrollo	Q8H0I5_ORYSA	Hu <i>et al.</i> 2006
<i>Oryza sativa</i>	OsNAC2	Crecimiento y desarrollo	Q8H0I4_ORYSA	Chen <i>et al.</i> 2015b
<i>Oryza sativa</i>	OsNAC6	Estrés	NAC48_ORYSJ	Nakashima <i>et al.</i> 2007
<i>Solanum lycopersicum</i>	SINAC1	Estrés	Q6RH27_SOLLC	Selth <i>et al.</i> 2005
<i>Solanum lycopersicum</i>	SINAM1	Estrés	B8XS01_SOLLC	Yang <i>et al.</i> 2011a
<i>Solanum lycopersicum</i>	SINAC2	Estrés	K4BWV2_SOLLC	Uppalapati <i>et al.</i> 2008
<i>Solanum lycopersicum</i>	SINAC3	Estrés	K4CH25_SOLLC	Han <i>et al.</i> 2012
<i>Solanum lycopersicum</i>	SINAC4	Maduración	K4D6Q0_SOLLC	Zhu <i>et al.</i> 2014
<i>Solanum lycopersicum</i>	SINAC-NOR	Maduración	Q56UP7_SOLLC	Patente US 6.762.347 B1
<i>Glycine max</i>	GmNAC2	Estrés	Q52QR4_SOYBN	Jin <i>et al.</i> 2013
<i>Capsicum annuum</i>	CaNAC1	Estrés	Q3ZN85_CAPAN	Oh <i>et al.</i> 2005
<i>Solanum tuberosum</i>	StNAC	Estrés	Q948Z2_SOLTU	Collinge & Boller 2001
<i>Citrus sinensis</i>	CsNAC	Senescencia	A2IB55_CITSI	Liu <i>et al.</i> 2009b
<i>Petunia hybrida</i>	PhNAM	Crecimiento y desarrollo	Q40880_PETHY	Souer <i>et al.</i> 1996
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PvNAP	Senescencia	Q93XA6_PHAVU	Tucker <i>et al.</i> 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATAF1	Estrés	Q2HIR8_ARATH	Wu <i>et al.</i> 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATAF2	Estrés	NAC81_ARATH	Delessert <i>et al.</i> 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CUC1	Crecimiento y desarrollo	NAC54_ARATH	Takada <i>et al.</i> 2001
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CUC2	Crecimiento y desarrollo	NAC98_ARATH	Aida <i>et al.</i> 1997
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CUC3	Crecimiento y desarrollo	NAC31_ARATH	Vroemen <i>et al.</i> 2003
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NAC1	Crecimiento y desarrollo	B2CUT4_ARATH	Xie <i>et al.</i> 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NAC2	Senescencia	NAC56_ARATH	Balazadeh <i>et al.</i> 2010
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NST1	Pared Celular	NAC43_ARATH	Mitsuda <i>et al.</i> 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NST2	Pared Celular	NAC66_ARATH	Mitsuda <i>et al.</i> 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NST3	Pared Celular	NAC12_ARATH	Hussey <i>et al.</i> 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NAP	Senescencia	NAC29_ARATH	Guo & Gan 2006
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TIP	Estrés	Q9LKG8_ARATH	Ren <i>et al.</i> 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtNAM	Crecimiento y desarrollo	NAC18_ARATH	Duval <i>et al.</i> 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	VNI1	Pared Celular	NAC82_ARATH	Kubo <i>et al.</i> 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	VNI2	Pared Celular	NAC83_ARATH	Yamaguchi <i>et al.</i> 2010
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FEZ	Crecimiento y desarrollo	FEZ_ARATH	Willemsen <i>et al.</i> 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BRN1	Crecimiento y desarrollo	BRN1_ARATH	Bennett <i>et al.</i> 2010
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BRN2	Crecimiento y desarrollo	BRN2_ARATH	Bennett <i>et al.</i> 2010
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SMB	Crecimiento y desarrollo	SMB_ARATH	Bennett <i>et al.</i> 2010
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ORE1	Senescencia	NAC92_ARATH	Qiu <i>et al.</i> 2015
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ORS1	Senescencia	NAC59_ARATH	Balazadeh <i>et al.</i> 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	JUB1	Estrés	NAC42_ARATH	Wu <i>et al.</i> 2012

Los alineamientos múltiples de secuencias (DNA y proteínas) se realizaron a partir de archivos en formato *fasta* con la herramienta Clustal Omega (ClustalO, Sievers *et al.* 2011). Para la visualización de alineamientos se utilizó la aplicación Jalview 2.8 (Waterhouse *et al.* 2009) estableciendo un límite de conservación de 75% para la coloración de los residuos. El sombreado de los subdominios NAC se corresponde con las regiones indicadas en Zhu *et al.* (2014). El cálculo de conservación de cada base respecto al resto de secuencias alineadas se realizó con Jalview. Para la reconstrucción de la filogenia de las secuencias se utilizó el método “Neighbor-joining” en MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013) realizando 1.000 iteraciones “Bootstrap” para comprobar su fiabilidad. La representación gráfica de la filogenia en forma de cladograma se realizó con el paquete ape (Paradis *et al.* 2004) para R.

3.10.2. Análisis del RNA-Seq

El análisis del estudio transcriptómico de la maduración del fruto mediante RNA-Seq (cap. 4.5) precisó de una gran variedad de programas y “scripts” diferentes especializados en llevar a cabo cada uno de las partes del análisis. A continuación se describe en detalle cada paso del proceso, representado en la Figura 3.1, excepto la secuenciación y el primer filtro de calidad, que fueron realizados por el Servicio de Secuenciación Masiva del CRAG. El análisis se puede resumir en: la preparación de las lecturas para el mapeado, el mapeado utilizando el genoma de melón como referencia, el recuento de lecturas mapeadas en cada uno de los genes, el análisis de expresión diferencial y por último la caracterización de los genes diferencialmente expresados.

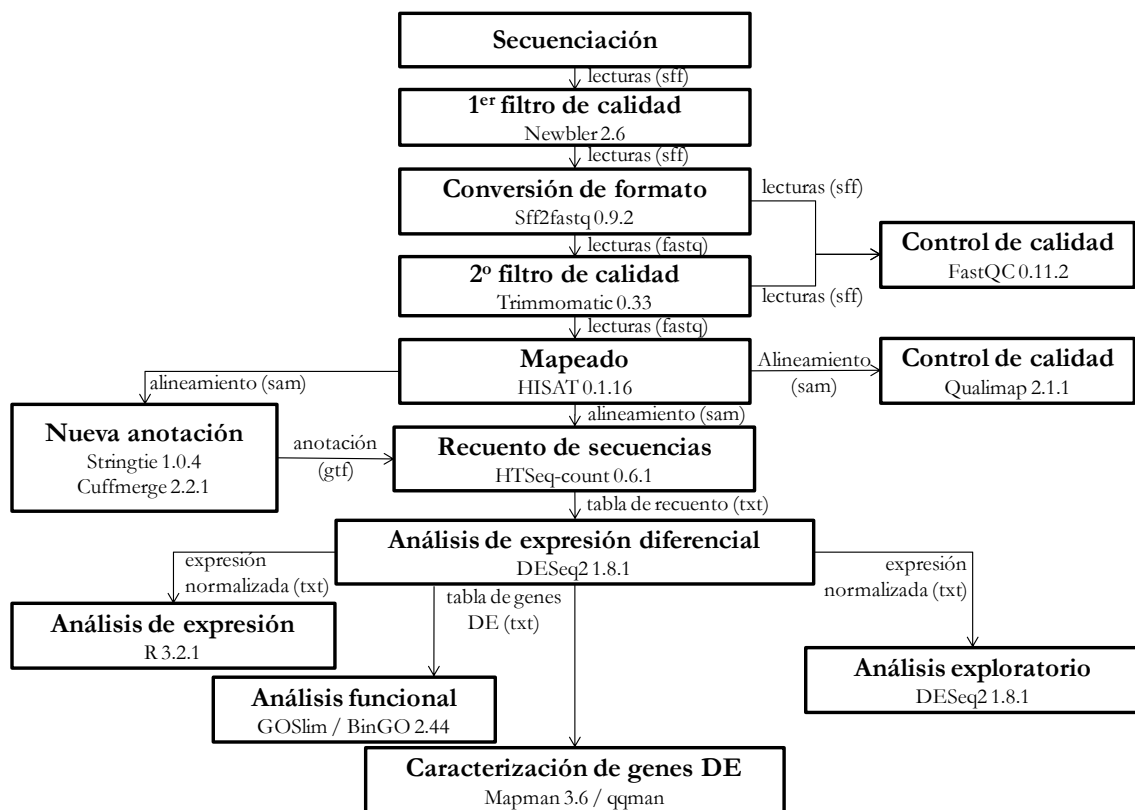


Figura 3.1: Análisis de un experimento de RNA-Seq. Flujo de trabajo o “pipeline” en el que las cajas representan procesos y las flechas indican el sentido del análisis. Se especifican los archivos de salida de cada proceso, con el formato entre paréntesis, que sirven como punto de partida para el proceso siguiente.

Preparación de las lecturas para el mapeado

La preparación de las lecturas para el mapeado consistió en unir los archivos de las dos carreras de secuenciación para ser analizados conjuntamente, adaptar su formato para los análisis posteriores y realizar un segundo filtrado de calidad, más exhaustivo, para asegurar un buen mapeado.

Para unir los archivos obtenidos en las dos carreras de secuenciación se utilizó la función *sfffile* del programa Newbler 2.6 (Roche, Basel, Suiza). Se realizó una conversión de formato *sff* a *fastq* con el programa *sff2fastq* 0.9.2 (github.com/indraniel/sff2fastq) para hacer compatibles los archivos de lecturas con las herramientas utilizadas más adelante y se exploró por primera vez la calidad de las lecturas mediante el programa FastQC 0.11.2 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc).

El segundo filtrado de calidad se realizó con el programa Trimmomatic 0.33 (Bolger *et al.* 2014) con el objetivo de que el promedio de la calidad (“Phred score”, que varía entre 0 y 40) de las lecturas fuera superior a 20. Primero se eliminaron los primeros 15 bp de cada lectura por la presencia de secuencias adaptadoras. Seguidamente se acortaron las lecturas desde el extremo 5’ hasta encontrar una base con un “Phred score” superior a 24. Después se utilizó el sistema “sliding window” para comprobar la calidad a lo largo de cada lectura comenzando en el extremo 5’ en bloques de 30 bp, cortando el extremo 3’ cuando el “Phred score” promedio fuera inferior a 23. Finalmente se estableció el tamaño mínimo de lectura en 40 bp y se comprobó la eficacia del filtrado mediante un control de calidad con FastQC.

Mapeado y recuento de las lecturas

El mapeado de las lecturas se realizó utilizando HISAT 0.1.16 (Kim *et al.* 2015) para lo que se generó un índice de sitios de “splicing” de la anotación del genoma v3.5.1 con el programa *extract_splice_sites.py* para guiar el mapeado en las uniones entre exones e intrones. El mapeado se realizó utilizando este índice y la versión 3.5.1 del genoma de referencia organizado en pseudocromosomas (Argyris *et al.* 2015b) con los parámetros por defecto de la herramienta. En este paso se obtuvo un archivo de alineamiento de secuencias (formato *sam*) por cada archivo de lecturas. Para explorar la calidad del mapeado se utilizó el programa Qualimap 2.1.1 (García-Alcalde *et al.* 2012) en modo RNA-Seq con los archivos *sam* obtenidos de HISAT. Los resultados mostraron la eficiencia de mapeado y el porcentaje de lecturas mapeadas contra los distintos elementos del genoma como exones, intrones y regiones intergénicas.

Se utilizó Stringtie 1.0.4 (Pertea *et al.* 2015) para generar una nueva anotación del genoma a partir de cada uno de los archivos *sam* utilizando la anotación existente como referencia. Las nuevas anotaciones, una por cada alineamiento, fueron unidas en una sola utilizando el complemento *cuffmerge* del programa Cufflinks 2.2.1 (Trapnell *et al.* 2013). La nueva anotación (formato *gff*), junto con los alineamientos de secuencias (*sam*) obtenidos de HISAT fueron utilizados para realizar el recuento de lecturas de cada gen con el programa HTSeq-count 0.6.1 (Anders *et al.* 2015). El resultado, una tabla en formato *txt* que contiene el número de lecturas mapeadas en cada gen en cada uno de los alineamientos, fue utilizado para el análisis de expresión diferencial.

Procesamiento del recuento de lecturas y análisis de expresión diferencial

Para el procesamiento del recuento de lecturas y el análisis de expresión diferencial se utilizó el paquete DESeq2 1.8.1 (Love *et al.* 2014) para R, desarrollado específicamente para el análisis de este tipo de experimentos. Por tanto todas las funciones nombradas a partir

de aquí pertenecen a este paquete o son funciones básicas de R salvo que se indique lo contrario.

El procesamiento del recuento de lecturas consistió en la normalización de los datos obtenidos de HTSeq-count. Se utilizó la función *DESeq* para normalizar en función del número de secuencias mapeadas y de su dispersión, obteniendo un *data.frame* con toda la información necesaria para el análisis de expresión diferencial.

Para los análisis exploratorios de la expresión génica global, se realizó una transformación logarítmica de los datos normalizados de recuento de lecturas con la función *rlog*, que utiliza una escala logarítmica con base 2. La tabla de recuento transformada permitió el cálculo y representación de un análisis de componentes principales (PCA) mediante la función *plotPCA*. El estudio de la distancia entre las muestras se realizó a partir de los datos de recuento transformados de los 500 genes más expresados a través del cálculo de la matriz de distancias (función *dist*) y de la agrupación jerárquica de las muestras (función *hclust*). La representación gráfica en forma de “heatmap” se realizó mediante la función *heatmap.2*.

El análisis de expresión no precisó de una transformación de los datos y se realizó a partir de la tabla de recuento de lecturas normalizada. Para ello se obtuvo una lista de genes expresados, es decir, con lecturas mapeadas en al menos dos de las tres réplicas biológicas de cada muestra. La visualización mediante diagramas de Venn de los genes específicos de cada muestra, así como los genes comúnmente expresados entre ellas, se realizó con la función *draw.quad.venn* del paquete VennDiagram 1.6.9 (Chen & Boutros 2011) para R.

Los análisis de expresión diferencial entre dos muestras, denominados contrastes, se realizaron con la función *results*, que lleva a cabo los siguientes pasos: primero estima los factores de tamaño y la dispersión de las secuencias mapeadas en cada gen, después ajusta una distribución binomial negativa y realiza una prueba de significación de Wald. Esta prueba permite comparar las lecturas mapeadas en cada gen entre las dos muestras de cada contraste y asignar un p-valor a cada comparación. Finalmente *results* ajusta los p-valores de la prueba de Wald para comparaciones múltiples mediante el método de Benjamini y Hochberg (BH). El resultado del análisis de expresión diferencial es una tabla que contiene, para cada gen de la anotación, una serie de estadísticos como el promedio de lecturas mapeadas, el “fold change”, el p-valor y el p-valor ajustado, entre otros. En este trabajo se estableció un p-valor ajustado de 0,05 como umbral de significación para considerar un gen como diferencialmente expresado (DE), que es equivalente a permitir un máximo de 5% de falsos positivos. Se utilizó el paquete de R VennDiagram para la representación mediante diagramas de Venn de los genes DE en común entre los contrastes (función *draw.pairwise.venn*).

El estudio de las diferencias de expresión entre las líneas a lo largo del tiempo se realizó mediante la aplicación de una fórmula de diseño que modela las diferencias entre líneas, las diferencias entre condiciones y las diferencias específicas de cada línea entre las dos condiciones (función *DESeq* con la opción *design = ~ line + condition + line:condition*). Posteriormente se extrajeron los genes DE mediante la aplicación de una prueba de razón de verosimilitud (opción *test = RLT* de la función *results*) entre la fórmula anterior y una versión reducida en la que se elimina del factor interacción (*reduced = ~ line + condition*). Los p-valor obtenidos fueron ajustados para comparaciones múltiples con el método BH y se escogió un p-valor ajustado de 0,05 (5% de falsos positivos) como límite de significación.

Caracterización de genes DE

La anotación funcional de los genes DE se realizó extrayendo del fichero con toda la anotación funcional del genoma del melón (García-Mas *et al.* 2012) los códigos GO asociados con cada uno de ellos. El resumen de la anotación funcional se hizo con la herramienta GOSlimViewer de AgBase (McCarthy *et al.* 2006) utilizando la ontología abreviada específica de plantas GOSlim-Plant (descargada de geneontology.org en julio del 2015). El análisis de enriquecimiento de términos GO en los grupos de genes DE respecto al genoma de referencia se realizó con el plugin BinGO 2.44 (Maere *et al.* 2005) para el programa Cytoscape 3.2.1 (Shannon *et al.* 2003), que también permitió la representación de los resultados utilizando la ontología GOSlim-Plant. Los p-valores inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

La representación de la distribución de los p-valores ajustados asociados a cada gen respecto a su posición cromosómica (“Manhattan plot”) se llevó a cabo con el paquete qqman (Turner 2014) de R a partir de los p-valores ajustados obtenidos en el análisis de expresión diferencial y la posición física de cada gen. Se utilizaron los datos de la resecuenciación de la línea SC3-5-1 (Pereira, sin publicar) para establecer las posiciones de las introgresiones. El estudio del enriquecimiento de genes DE dentro de las introgresiones respecto al resto del genoma se realizó a través de la construcción de una tabla de contingencia y la aplicación de una prueba exacta de Fisher (función básica de R *fisher.test*), tomando un p-valor menor a 0,05 como significativo.

La representación gráfica de las diferencias de expresión de los genes relacionados con la ruta del etileno y de los factores de transcripción se realizó con el programa MapMan 3.6.0 (Thimm *et al.* 2004) a partir de una lista de genes relacionados con estos procesos según su anotación en el genoma de referencia. La lista completa de genes representados está recogida en la Tabla A.4.5.6 del Anexo. Se utilizaron los valores de “fold change” obtenidos del análisis de expresión diferencial para el código de color. La imagen de la ruta es la Figura 1.4 modificada. Los gráficos de líneas que representan la expresión de los genes implicados en la maduración del fruto se realizaron a partir de los valores de expresión normalizados de cada una de las réplicas con la función *plotCounts*.

4. RESULTADOS

4.1. Clonaje posicional del QTL *eth6.3*

4.1.1. Introducción.

Este trabajo de clonaje posicional de un QTL implicado en la maduración climatérica del fruto de melón parte del hallazgo de la línea climatérica SC3-5 en la colección de NILs procedente del cruzamiento entre los parentales no climatéricos PS (parental recurrente) y SC (parental donante) (Eduardo *et al.* 2005). Mediante la caracterización de SC3-5 y de su línea derivada SC3-5-1 (ver Material y Métodos cap. 3.1) fueron detectados dos QTLs, *eth3.5* y *eth6.3* localizados en los GL III y VI respectivamente, ambos implicados en la maduración climatérica del fruto de melón (Moreno *et al.* 2008; Vegas *et al.* 2013).

Para estudiar el modo en el que los dos QTLs interaccionan, fueron desarrolladas cuatro líneas con diferentes combinaciones en homocigosis que fueron denominadas genotipos fijos (GF): la línea GF31 con ambos QTLs, la línea GF35 con *eth3.5* y la línea GF40 con *eth6.3*. Los primeros estudios de interacción parecían indicar que *eth3.5* no era capaz de dar lugar a frutos climatéricos por sí mismo, mientras que el efecto de *eth6.3* parecía mayor y suficiente para producir un fenotipo climatérico cuando estaba solo. Sin embargo, en estudios posteriores se midió la producción de etileno y se demostró que tanto *eth3.5* como *eth6.3* son capaces de producir la hormona e inducir la maduración climatérica del fruto de forma independiente, pero que cuando ambos están presentes interaccionan de forma aditiva acelerando el proceso (Vegas *et al.* 2013). En el caso de la producción de etileno, la línea GF31 produce el característico pico climatérico a los 35 días tras la polinización (DAP, “days after pollination”), mientras que GF35 lo hace a los 40 DAP y GF40 a los 43 DAP, aunque la variabilidad es muy grande (Figura 4.1.1). La cantidad de etileno biosintetizado muestra un patrón similar: la línea más productora es GF31 seguida de GF35 y GF40 (4,4, 2,5 y 2 $\mu\text{l}/\text{kg}\cdot\text{h}$ respectivamente). La interacción entre *eth3.5* y *eth6.3* también se evidencia a través de otros procesos relacionados con la maduración del fruto como la dehiscencia, los cambios de coloración externa del fruto y la producción de aromas característicos, que tienen lugar adelantados en el tiempo y con mayor intensidad en la línea GF31 seguida de GF35 y GF40. Por último, cabe destacar que tras numerosas campañas de fenotipado de las líneas que contienen *eth3.5* se ha puesto de manifiesto un elevado componente ambiental en el efecto del QTL. Este fenómeno se refleja en la presencia de zona de abscisión, el tiempo de dehiscencia o los cambios de coloración externa del fruto, que pueden llegar a variar enormemente de un año a otro (Vegas 2014).

Tras la detección de *eth6.3*, se construyó una población con el alelo en homocigosis de SC fijado en *eth3.5* para su mapeo fino mediante la búsqueda de recombinantes en la región del QTL y se redujo el locus *eth6.3* al intervalo comprendido entre los marcadores Al_03-B03 y FR14-P22 en la región centromérica del GL VI, tal y como se esquematiza en la Figura 4.1.2 (Vegas *et al.* 2013). Posteriormente, el intervalo fue reducido a 2,75 Mbp entre los marcadores AP2/ERF y FR14-P22 aunque debido al efecto de *eth3.5* no se pudieron distinguir recombinantes heterocigotos para *eth6.3* y, por tanto, no fue posible reducir más el intervalo (Vegas 2014). El trabajo realizado en este apartado de tesis parte de estos últimos esfuerzos por reducir el intervalo y tiene como objetivo el clonaje posicional de *eth6.3* mediante el desarrollo de una nueva población segregante el alelo de PS fijado para *eth3.5* y la búsqueda de recombinantes tomando como punto de partida la región flanqueada por los marcadores AP2/ERF y FR14-P22. Mediante el uso de esta estrategia se pretende separar el efecto de *eth3.5* del de *eth6.3* para facilitar el análisis fenotípico de los recombinantes, optimizando así el proceso de clonaje posicional del QTL.

4.1. Clonaje posicional del QTL *eth6.3*

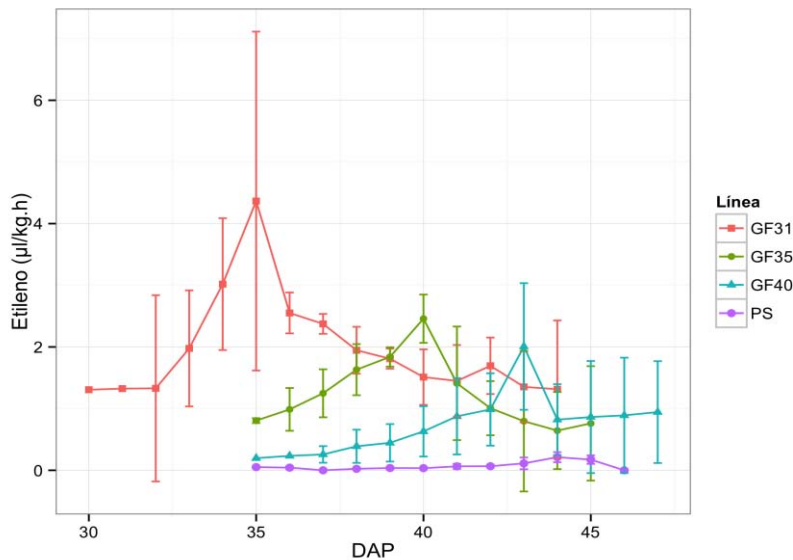


Figura 4.1.1: Producción de etileno durante la maduración del fruto de las líneas PS, GF31, GF35 y GF40. Se representa el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se mide la producción de etileno en días después de la polinización (DAP). Figura adaptada de Vegas *et al.* (2013).

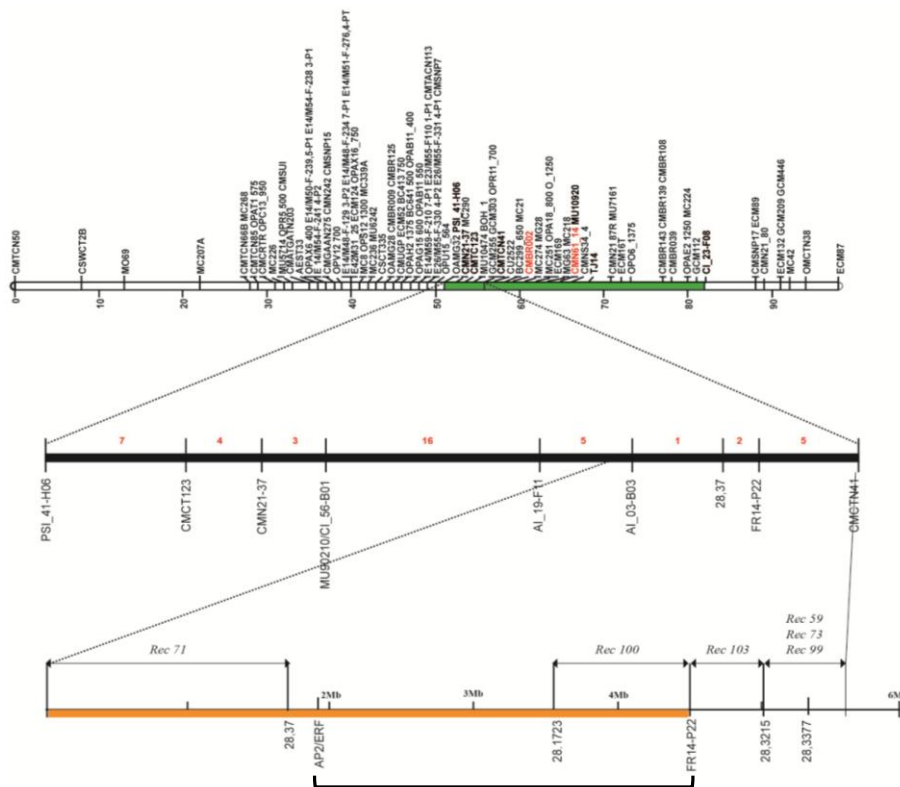


Figura 4.1.2: Mapa genético de alta resolución del locus *eth6.3*. Se representa el trabajo de mapeo realizado por Vegas (2014), que redujo la región del QTL hasta un intervalo de 2,75 Mbp en la región centromérica del GL VI, marcado con una horquilla horizontal en la parte inferior, entre los marcadores AP2/ERF y FR14-P22. Representados en orden descendente: el mapa genético del GL VI de melón (Diaz *et al.* 2011) con la introgresión de SC en el fondo genético de PS de la NIL SC3-5-1 en color verde; un mapa genético de media resolución de la región; y un mapa físico de alta resolución en el que se señala, en color amarillo, el intervalo de *eth6.3* publicado en Vegas *et al.* (2013). Modificado de Vegas (2014).

4.1.2. Obtención de una población segregante para *eth6.3*.

Para el clonaje posicional del locus *eth6.3* fue necesaria la obtención de una población segregante que permitiera detectar el mayor número posible de recombinantes dentro del intervalo del QTL y que al mismo tiempo elimine la influencia de *eth3.5* que se observó en el mapeo anterior (Vegas *et al.* 2013). Para ello se identificaron mediante marcadores moleculares dos individuos F_2 procedentes de un cruzamiento anterior SC3-5-1 x PS (población 7M80, Vegas *et al.* 2013) denominados 7M80-11 y 7M80-231, que tuvieran fijada con el alelo de PS la introgresión en el GL III (*eth3.5*) y fueran heterocigotos en la del GL VI (*eth6.3*). A pesar de que estos individuos ya no existían se conservaban DNA y semillas procedentes de su autofecundación, que fueron utilizadas para identificar en su progenie varios individuos F_3 idénticos a ellos (Tabla 4.1.1). Dos plantas F_3 elegidas al azar (7M80-11.4 y 7M80-231.5) fueron replicadas mediante micropropagación *in vitro* obteniéndose 20 esquejes por planta que fueron aclimatados, cultivados en invernadero y autofecundados. De esta forma se aseguraron suficientes semillas segregantes como para encontrar recombinantes. Finalmente se germinaron más de 1.300 semillas procedentes de las réplicas del individuo 7M80-11.4 dando lugar a la población segregante 2012- F_4 . El proceso de obtención de la población 2012- F_4 está esquematizado en la Figura 4.1.3.

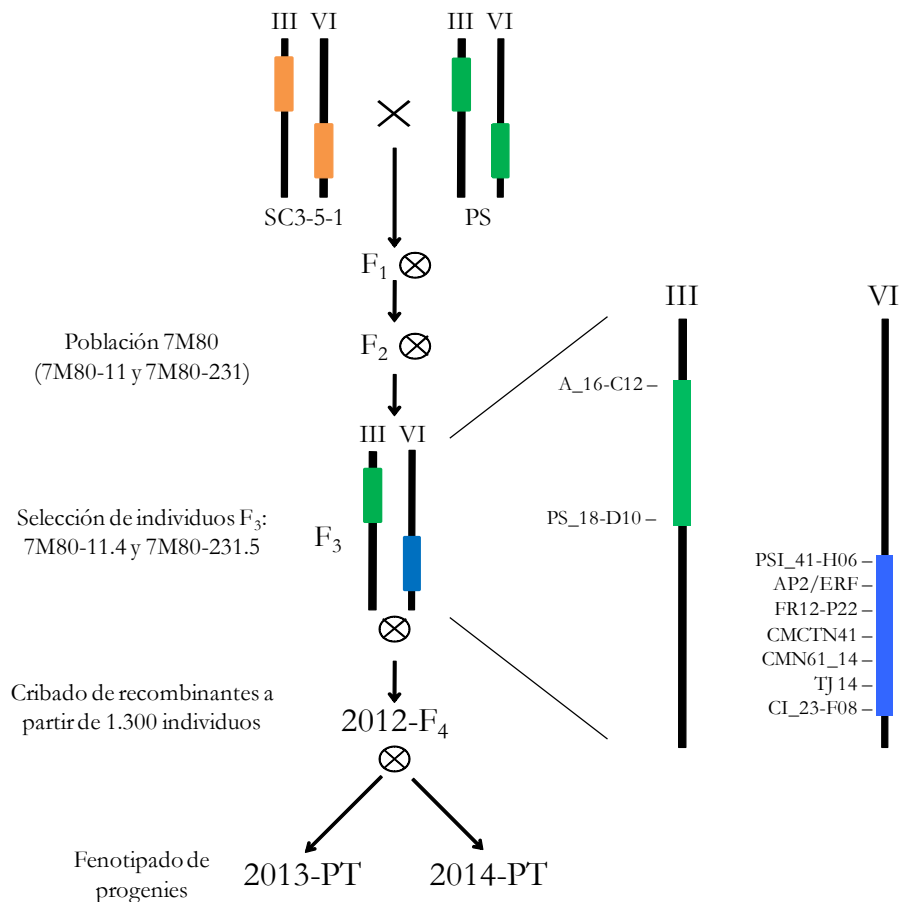


Figura 4.1.3: Esquema de los cruzamientos desarrollados durante el clonaje posicional de *eth6.3*. Los cruzamientos se indican con una “X” y, si está dentro de un círculo, señala autofecundación. Las barras verticales de color negro representan los GL indicados con números romanos, y las cajas de colores representan las regiones de los QTLs *eth3.5* y *eth6.3* en los GL III y VI respectivamente. El color verde indica alelo de PS en homocigosis, el naranja alelo de SC en homocigosis y el azul alelos en heterocigosis. A la

derecha de la figura se representan los marcadores utilizados para la selección de los individuos 7M80-11.4 y 7M80-231.5 sobre ambos grupos de ligamiento.

Tabla 4.1.1: Genotipo de los individuos utilizados para la generación de la población segregante 2012-F₄. Se indica la planta F₂ original y la planta F₃ genotipada con los marcadores que se muestran, representados según su orden en ambos grupos de ligamiento. B (verde) = homocigoto para PS y H (azul) = heterocigoto.

Planta F ₂	Planta F ₃	GL III			GL VI					
		A_16-C12	PS_18-D10	PSI_41-H06	AP2/ERF	FR12-P22	CMCTN41	CMN61_14	TJ14	CL_23-F08
7M80-11	7M80-11-4	B	B	H	H	H	H	H	H	H
7M80-231	7M80-231.5	B	B	H	H	H	H	H	H	H

Los requerimientos de luz y temperatura del cultivo de la planta del melón permiten realizar solamente dos generaciones por año así que los procesos de micropropagación *in vitro* y la obtención de la población 2012-F₄ se realizaron en la primera mitad de la campaña (entre abril y julio de 2012) con el objetivo de aprovechar la segunda mitad de la campaña para la búsqueda y el cultivo de los recombinantes. En la Figura 4.1.4 se representa la distribución temporal de todos los experimentos realizados durante el clonaje posicional de *eth6.3*.

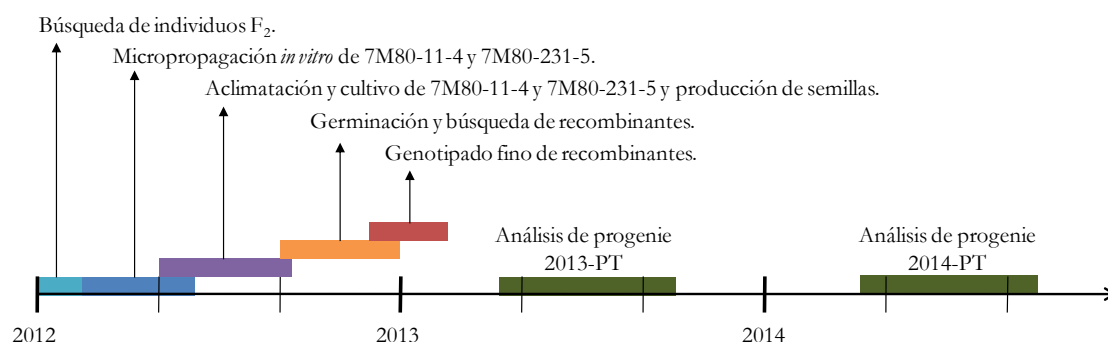


Figura 4.1.4: Distribución temporal de los experimentos llevados a cabo durante el clonaje posicional de *eth6.3*. Las cajas de colores representan la duración de los experimentos: primero se seleccionaron los individuos 7M80-11.4 y 7M80-231.5 (caja azul claro), que fueron micropropagados *in vitro* durante tres meses (caja azul oscuro) antes de ser aclimatadas y cultivadas para la producción de semillas durante la primera parte de la temporada 2012 (caja morada). Tras el cultivo se germinaron aproximadamente 1.400 plántulas que dieron lugar a la población 2012-F₄, que fue cribada en busca de recombinantes (caja naranja). Finalmente los 27 recombinantes encontrados fueron genotipados (caja roja) y 15 de ellos fenotipados en las temporadas de 2013 y 2014 (cajas verde oscuro).

4.1.3. Búsqueda de recombinantes en el intervalo de *eth6.3*.

Gracias a la resecuenciación de las dos líneas parentales PS y SC disponible en el laboratorio y al desarrollo de varios scripts de análisis por parte de otros miembros del departamento (Sanseverino *et al.* 2015) se encontraron 1.235.204 SNP entre ambas variedades que pudieron ser utilizados para el diseño de marcadores moleculares en el intervalo de *eth6.3*. Tomando como punto de partida la región cromosómica del QTL,

acotada en trabajos anteriores entre los marcadores AP2/ERF y FR14-P22, se utilizaron dos SNP próximos a ellos para desarrollar dos sondas TaqMan denominadas SNP-64.658 y SNP-2.826.073 (Figura 4.1.5). La nomenclatura proviene de su posición respecto al inicio del scaffold00028 en la versión 3.5 del genoma de referencia. Estos marcadores fueron utilizados en la criba de la población 2012-F₄ para la búsqueda de recombinantes. Tras la germinación de más de 1.300 semillas pertenecientes a la población 2012-F₄ se genotiparon 1.140 plántulas detectando 27 recombinantes en el intervalo de *eth6.3*, lo que supone un porcentaje de recombinación del 1,18%. Durante el cribado de esta población, no se encontraron dobles recombinaciones entre los marcadores y la segregación de los alelos mostró la distribución habitual 1:2:1, tal y como se muestra en la Tabla 4.1.2.



Figura 4.1.5: Mapa físico del intervalo de *eth6.3* y posición de los marcadores utilizados en el cribado de la población 2012-F₄. Las líneas negras horizontales representan el genoma y las cajas azules los genes anotados en la v3.5 del genoma de referencia. Los marcadores superiores provienen de Vegas *et al.* (2013).

Tabla 4.1.2: Segregación de alelos para los marcadores flanqueantes en la población 2012-F₄. Se representa el número de plantas detectadas con cada combinación de alelos en un total de 1.130 individuos.

		SNP-2.826.073		
		A	H	B
SNP-64.568	A	291	6	0
	H	5	543	6
	B	0	10	270

Posteriormente fue posible la saturación de la región *eth6.3* con 24 nuevos marcadores SNP (usando tecnología KASP, Tabla 3.3) con una densidad de un SNP/110 Kb (Figura 4.1.6a). De nuevo, los marcadores fueron nombrados según la posición del SNP en el scaffold00028 del genoma de referencia (versión 3.5). Cada uno de los 27 recombinantes fue genotipado, encontrándose 13 puntos de recombinación distribuidos a lo largo de la región. Es de destacar la acumulación de hasta cuatro recombinaciones distintas en el mismo intervalo comprendido entre dos marcadores como sucede entre SNP-551.712 y SNP-719.040, SNP-1.497.449 y SNP-1.631.731, SNP-1.773.082 y SNP-1.839.795 y entre SNP-2.691.690 y SNP-2.826.073 (Tabla 4.1.3). Todos los recombinantes fueron nombrados en función de la posición del punto de recombinación dentro del GL empezando por R01 y hasta R27.

Los recombinantes fueron trasladados a Torre Marimón entre agosto y septiembre de 2012, donde fueron autofecundados y produjeron melones de los cuales se recogió semilla.

Debido a que el desarrollo y la maduración del fruto ocurrieron durante el mes de octubre, cuando las condiciones de luz y temperatura no son las óptimas para el cultivo de melón, la mayoría de los recombinantes produjeron frutos pequeños y no bien madurados, por lo que no pudieron ser fenotipados para maduración climatérica durante esa campaña. De todas formas, al ser la maduración un carácter complejo, basar el fenotipado en la observación de un solo individuo es arriesgado y se decidió realizar un estudio de progenie.

Tabla 4.1.3: Genotipo con 24 SNPs de los 27 recombinantes en la región de *eth6.3* detectados durante la criba de la población 2012-F₄. Se muestran los SNPs utilizados según su posición física en el intervalo. A (naranja) = homocigoto para SC, B (verde) = homocigoto para PS, y H (azul) = heterocigoto.

a: marcadores TaqMan flanqueantes.

Recombinante	SNP-64658 ^a	SNP-193229	SNP-305343	SNP-423732	SNP-551712	SNP-719040	SNP-833872	SNP-911281	SNP-997101	SNP-1121435	SNP-1249717	SNP-1326612	SNP-1412559	SNP-1497449	SNP-1631731	SNP-1773082	SNP-1839795	SNP-1986139	SNP-2100393	SNP-2192884	SNP-2319007	SNP-2424110	SNP-2520741	SNP-2609965	SNP-2691690	SNP-2826073 ^a	
R01	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
R02	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R03	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R04	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R05	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R06	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
R07	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
R08	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R09	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R10	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R11	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R12	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R13	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R14	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
R15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R16	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
R17	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R18	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
R19	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
R20	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
R21	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
R22	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H
R23	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H
R24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H
R25	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A
R26	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B
R27	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B

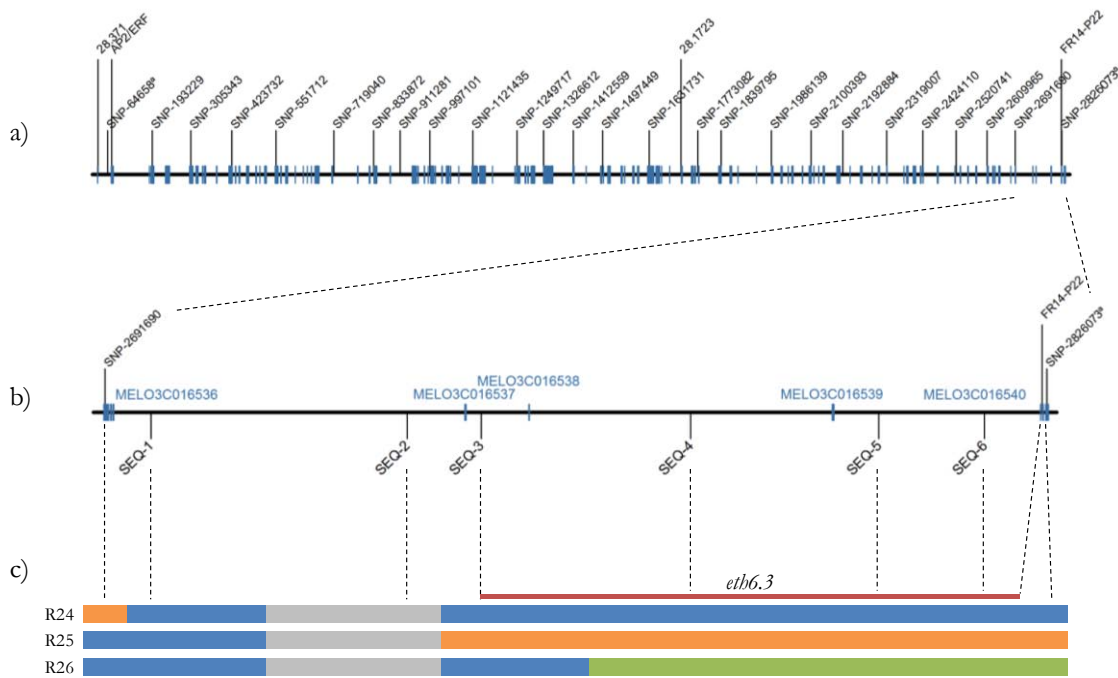


Figura 4.1.6: Mapa físico de alta resolución de *eth6.3*. Las líneas negras horizontales representan el genoma, las cajas azules los genes anotados en la v3.5.1 del genoma de referencia y las líneas verticales representan la posición de marcadores SNP. **a)** Intervalo original de 2,75 Mbp en el que se situaba el QTL *eth6.3*. Los marcadores moleculares con prefijo SNP- fueron diseñados mediante tecnología KASP. **b)** Intervalo de 139 Kbp al que se redujo el QTL tras el mapeo fino. Los marcadores moleculares con el prefijo SEQ- se utilizaron para la selección del gen candidato entre los 5 genes anotados en el intervalo. **c)** Genotipado de R24, R25 y R26 y mapeo fino de *eth6.3*. El genotipo se representa mediante colores: verde = homocigoto para PS, naranja = homocigoto para SC, azul = heterocigoto y gris = genotipado fallido. La línea roja representa la posición de *eth6.3* según este trabajo y Vegas *et al.* (2013).

a: marcador TaqMan flanqueante.

4.1.4. Fenotipado de recombinantes y mapeo fino de *eth6.3*

Tal y como se puso de manifiesto durante el estudio de interacción entre *eth3.5* y *eth6.3*, el fenotipado del carácter climatérico es complejo en aquellas líneas que contienen solamente uno de los dos QTLs, especialmente para *eth3.5* (Vegas *et al.* 2013). En las líneas con *eth6.3* la influencia ambiental es menor y los frutos con alelos de SC o PS en homocigosis para el QTL son fácilmente clasificables como climatéricos o no climatéricos respectivamente. Sin embargo, las líneas heterocigotas para *eth6.3* dan lugar a frutos con gran variabilidad fenotípica: desde maduraciones de claro tipo climatérico o no climatérico hasta frutos difíciles de clasificar con indicadores tanto climatéricos como no climatéricos. Debido a la gran importancia del fenotipado de los recombinantes para el mapeo fino de *eth6.3*, decidimos llevar a cabo un análisis de progenie con el objetivo de obtener datos fenotípicos consistentes. Mediante éste método se infiere el fenotipo de un recombinante de forma fiable a través del fenotipado de su progenie, eliminando la probabilidad de error que existe cuando solo se estudia un individuo. Además, algunos de los recombinantes produjeron poca cantidad de semillas fértiles en la anterior campaña, por lo que el análisis de progenie también es útil como método de propagación en caso de necesitar más semilla en el futuro.

El fenotipado mediante análisis de progenie tiene la desventaja de requerir un gran número de plantas por progenitor (entre 15 y 20), por lo que por razones de espacio resultó inviable fenotipar los 27 recombinantes simultáneamente en el invernadero. En su lugar se seleccionaron 14 recombinantes representativos que dividían el QTL en fragmentos repartidos por todo el intervalo. Se germinaron suficientes semillas de la progenie de cada recombinante como para obtener 20 plantas, que fueron trasladadas a Torre Marimón y autofecundadas. Para obtener el mejor fenotipado posible, se hizo coincidir la maduración de los frutos con los meses de mayor temperatura y luz solar (entre junio y agosto) de la campaña de melón de 2013.

Todos los individuos de progenie, denominados 2013-PT, fueron genotipados utilizando los 24 marcadores KASP diseñados entre las dos sondas TaqMan flanqueantes (que no fueron incluidas). El genotipado de cada progenie confirmó el punto de recombinación de su respectivo parental, no produciéndose nuevas recombinaciones en la población 2013-PT (Tabla 4.1.4). En algunos casos se utilizó el marcador tipo CAPS FR14-P22 como sustituto de la sonda TaqMan flanqueante SNP-2.826.073 ya que las separan solamente 584 bp. Al utilizar este marcador para genotipar el recombinante R27 éste era heterocigoto (H) contradiciendo el genotipo original obtenido mediante la sonda TaqMan (B). Finalmente se comprobó que R27 era un falso recombinante al verificar el genotipo H en el marcador SNP-2.826.073 mediante la secuenciación del SNP en su progenie (Tabla 4.1.4).

Tabla 4.1.4: Genotipado y fenotipado de los 17 recombinantes más informativos y mapeo fino de *eth6.3*. Se muestran los SNPs utilizados según su posición en el intervalo de interés así como el fenotipo asignado según un análisis de progenie. A (naranja) = homocigoto para SC, B (verde) = homocigoto para PS, y H (azul) = heterocigoto.

a: marcadores TaqMan flanqueantes.

b: recombinantes fenotipados en el año 2013 (2013-PT).

c: recombinantes fenotipados en el año 2014 (2014-PT).

d: falso recombinante descartado de los análisis posteriores.

*: marcadores que definen la posición del QTL.

Recombinante	SNP-64658 ^a	SNP-193229	SNP-305343	SNP-423732	SNP-551712	SNP-719040	SNP-833872	SNP-911281	SNP-997101	SNP-1121435	SNP-1249717	SNP-1326612	SNP-1412559	SNP-1497449	SNP-1631731	SNP-1773082	SNP-1839795	SNP-1986139	SNP-2100393	SNP-2192884	SNP-2319007	SNP-2424110	SNP-2520741	SNP-2609965	SNP-2691690	SNP-2826073 ^a	Fenotipo (<i>eth6.3</i>)	
R02 ^b	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R03 ^b	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R06 ^b	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
R07 ^b	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
R08 ^b	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R12 ^b	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R15 ^b	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R16 ^b	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
R19 ^b	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
R21 ^b	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
R22 ^b	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H
R23 ^b	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H
R24.1 ^c	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H
R24.2 ^c	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H
R25 ^b	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A
R26 ^c	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
R27 ^{b,d}	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

* *

El fenotipo de los recombinantes originales fue inferido a partir de los datos fenotípicos de su respectiva progenie. De este modo, dos recombinantes fueron catalogados como no climatéricos (R07 y R21), siete como heterocigotos (R02, R03, R08, R12, R15, R22, R23 y R27) y cuatro como climatéricos (R06, R16, R19, R25). Las progenies de estos últimos cuatro recombinantes mostraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de dehiscencia respecto a la línea parental no climatérica PS utilizada como control en una prueba de Dunnett (Figura 4.1.7) respaldando nuestra clasificación. Tras el análisis de la cosegregación del fenotipo con los marcadores moleculares, situamos el intervalo de *eth6.3* a la derecha de SNP-2.691.690 y cosegregando con el marcador flanqueante SNP-2.826.073 (Tabla 4.1.4). Los datos completos del genotipado y fenotipado de la población 2013-PT pueden consultarse en las Tablas A.4.1.1 y A.4.1.2 en el Anexo.

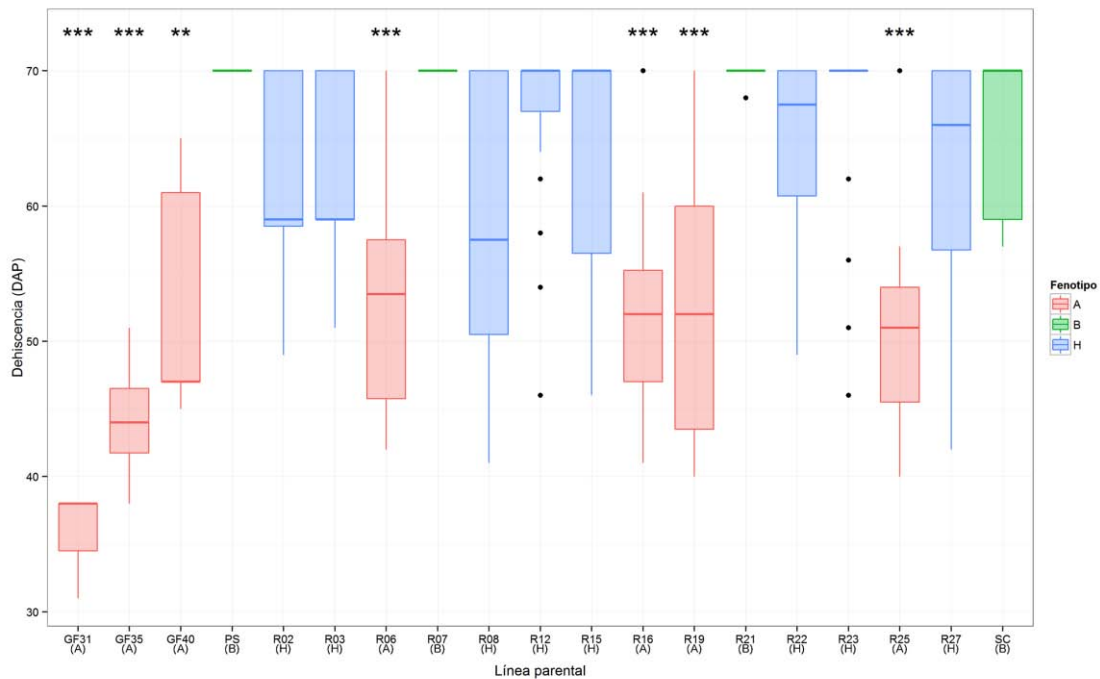


Figura 4.1.7: Distribución de las fechas de dehiscencia expresadas en días después de la polinización (DAP) de las progenies de los recombinantes analizados en el año 2013. El fenotipo asignado a cada recombinante se indica entre paréntesis en la parte inferior y mediante el color de las cajas: A (rojo) = climatérico; B (verde) = no climatérico; H (azul) = heterocigoto. PS: “Piel de Sapo”; SC: “Songwhan Charmi”; GF31: línea con *eth3.5* y *eth6.3*; GF35: línea con *eth3.5*; GF40: línea con *eth6.3*. Los asteriscos indican el nivel de significación de una prueba de Dunnett de cada recombinante respecto al control PS: ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01.

Tras prescindir de R27 solamente disponíamos de datos fenotípicos de un recombinante en el intervalo (R25) por lo que decidimos repetir la misma estrategia de fenotipado mediante estudios de progenie con los recombinantes R24 y R26 en el siguiente año (Tabla 4.1.3). Además de aportar robustez al clonaje posicional del QTL, el aumento del número de recombinaciones puede facilitar la identificación de genes candidatos para *eth6.3* incrementando la densidad de marcadores entre SNP-2.691.690 y SNP-2.826.073. Las recombinaciones de R24 y R26 fueron verificadas mediante genotipado antes de continuar con sus estudios de progenie, realizados en la campaña de 2014 (población 2014-PT). Tanto el genotipado como el fenotipado de los individuos fue realizado de la misma manera que con la población 2013-PT pero reduciendo el tamaño de la progenie a 15 individuos. En el caso de R24, realizamos dos análisis de progenie con dos plantas

cultivadas la campaña anterior con fines de propagación (R24.1 y R24.2) y que tienen el mismo genotipo que el recombinante original (Tablas A.4.1.3 y A.4.1.4 en el anexo). Las dos progenies de R24 resultaron heterocigotas para el carácter climatérico mientras que en el caso de R26 toda la progenie fue no climatérica (Tabla 4.1.4). Tras aplicar una prueba de Dunnett para comparar los promedios del tiempo de dehiscencia, encontramos que la progenie R24.1 resulta significativamente distinta del control PS aunque no R24.2 a pesar de que son idénticas (Figura 4.1.8). En este caso, la prueba estadística no respaldó la clasificación de los recombinantes pero el resto de indicadores fenotípicos y el genotipado de las progenies confirmaron los resultados obtenidos en la campaña anterior, que indicaban que el QTL *eth6.3* está limitado a la izquierda por SNP-2.691.690 y cosegrega con SNP-2.826.073 (Tabla 4.1.4).

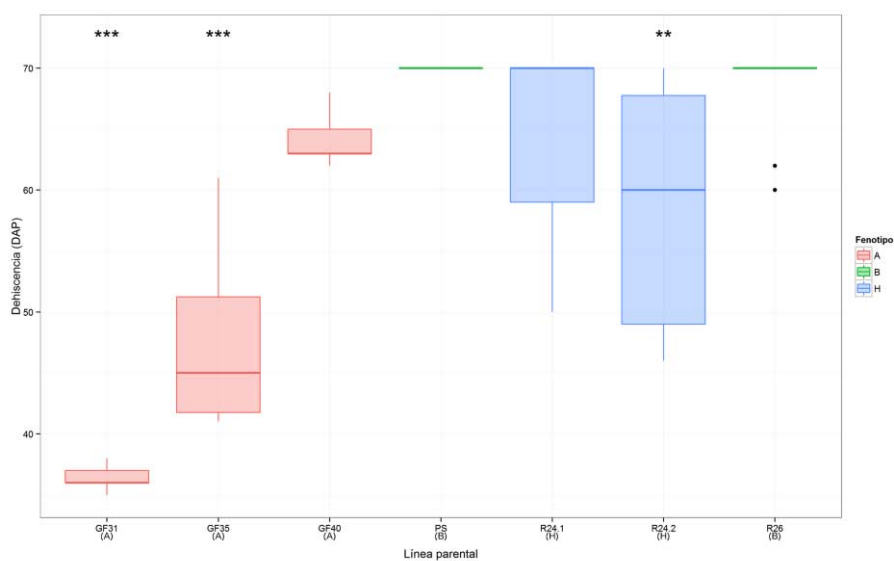


Figura 4.1.8: Distribución de las fechas de dehiscencia expresadas en días después de la polinización (DAP) de las progenies de los recombinantes analizados en el año 2014. El fenotipo asignado a cada recombinante se indica entre paréntesis en la parte inferior y mediante el color de las cajas: A (rojo) = climatérico; B (verde) = no climatérico; H (azul) = heterocigoto. PS : “Piel de Sapo”; GF31: línea con *eth3.5* y *eth6.3*; GF35: línea con *eth3.5*; GF40: línea con *eth6.3*. Los asteriscos indican el nivel de significación de una prueba de Dunnett de cada recombinante respecto al control PS: ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01.

Aunque los resultados de este apartado no permiten delimitar el QTL por la derecha podemos utilizar trabajos anteriores para hacerlo. Vegas y colaboradores (2013) acotaron *eth6.3* al intervalo comprendido entre los marcadores AP2/ERF y FR14-P22, que lo flanquean a izquierda y derecha respectivamente (Figura 4.1.2). Este intervalo, que fue utilizado como punto de partida para el clonaje posicional de este apartado, también nos permite acotar *eth6.3* por la derecha con FR14-P22 de forma inequívoca. Por tanto, teniendo en cuenta que FR14-P22 está situado a 584 bp hacia la izquierda del SNP-2.826.073 (Figura 4.1.6b), que es el marcador flanqueante que ha sido utilizado para el genotipado de los recombinantes, tomamos la región entre SNP-2.691.690 y SNP-2.826.073 como punto de partida para la identificación de genes candidatos.

4.1.5. Identificación de un gen candidato para *eth6.3*.

El nuevo intervalo de *eth6.3* tiene un tamaño de 139 Kbp y contiene cinco genes anotados en el genoma de referencia. Tal y como se muestra en la Tabla 4.1.5, tres de estos genes (*MELO3C016537*, *MELO3C016538* y *MELO3C016539*) son pequeños, constan de un solo exón y no presentan similitud con ningún gen de función conocida. Los otros dos (*MELO3C016536* y *MELO3C016540*), en cambio, muestran homología con factores de transcripción de la familia NAC, por lo que podrían ser dos buenos candidatos para *eth6.3*.

Tabla 4.1.5: Genes anotados en la región de 139 Kb comprendida entre los marcadores SNP-2.691.690 y SNP-2.826.073. Datos obtenidos de la v3.5.1 del genoma de referencia (García-Mas *et al.* 2012). Las distancias de inicio y final son respecto al inicio de la pseudomolécula correspondiente al GL VI.

Gen	Posición inicio (bp)	Posición final (bp)	Orientación	Núm. exones	Tamaño mRNA (bp)	Tamaño polipéptido (aa)	Anotación
<i>MELO3C016536</i>	26.852.979	26.854.555	-	3	1.576	296	Similar to NAC domain-containing protein 72 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>MELO3C016537</i>	26.904.508	26.904.804	-	1	296	98	Similar to Putative uncharacterized protein (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>MELO3C016538</i>	26.913.606	26.913.853	-	1	247	81	-
<i>MELO3C016539</i>	26.956.908	26.957.304	+	1	396	67	-
<i>MELO3C016540</i>	26.986.354	26.988.122	+	3	1.768	353	Similar to NAC domain-containing protein 18 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

Para tratar de descartar alguno de los cinco genes decidimos tratar de situar con mayor resolución el punto de recombinación de R24, R25 y R26. Se diseñaron seis nuevos marcadores (SEQ-1 a SEQ-6 en la Tabla 3.1) entre SNP-2.691.690 y SNP-2.826.073 situados en las regiones intergénicas a modo de separadores, de forma que se pudiera asociar la segregación del fenotipo con el menor número de genes posible (Figura 4.1.6b). Para ser consistentes con los estudios anteriores, en los que se estableció FR14-P22 como límite del intervalo de *eth6.3*, también se utilizó este marcador para el genotipado de los tres recombinantes (Tabla 4.1.6, representado gráficamente en la Figura 4.1.6c) El recombinante R24 no resultó ser informativo al producirse la recombinación entre los marcadores SNP-2.691.690 y SEQ-1. En el caso de R25 la recombinación se situó entre SEQ-1 y SEQ-3 (el genotipado del marcador SEQ-2 falló en todos los recombinantes), lo que nos permitió descartar el gen *MELO3C016536*, uno de los dos factores de transcripción tipo NAC, como candidato. El recombinante R26 fue el más informativo ya que nos ayudó a descartar tanto *MELO3C016536* como *MELO3C016537* reduciendo la región de *eth6.3* (marcado con una línea roja en la Figura 4.1.6c) al intervalo entre SEQ-3 y FR14-P22 con solamente tres genes candidatos: *MELO3C016538*, *MELO3C016539* y *MELO3C016540*.

Debido a que dos de los tres genes (*MELO3C016538* y *MELO3C016539*) no tienen función anotada, la CDS consiste en un solo exón y su tamaño es reducido, se exploró la anotación de transposones por si pudieran ser elementos móviles. Los resultados muestran que en la región hay anotados un total de 16 transposones pertenecientes a diversas superfamilias como MULE, gypsy, CACTA y PIF (J. Morata, comunicación personal; Tabla A.4.1.5). Entre *MELO3C016538* y *MELO3C016539* hay predichos más transposones que entre éste último y *MELO3C016540* (10 y 6, respectivamente), aunque ninguno de ellos solapa con los genes ni están situados a menos de 2 Kbp de distancia de su inicio o final. Teniendo en cuenta estos resultados, el hecho de que *MELO3C016538* y *MELO3C016539* no tengan función anotada y que el gen restante sea un prometedor factor de transcripción perteneciente a la familia NAC-domain, *MELO3C016540* fue seleccionado como gen candidato para *eth6.3*.

Tabla 4.1.6: Genotipado y fenotipado de R24, R25 y R26 y mapeo fino de *eth6.3*. Se representan los marcadores utilizados según su posición relativa y el fenotipo asignado en las campañas de 2013 (R25) y 2014 (R24 y R26). A (naranja) = homocigoto para SC, B (azul) = homocigoto para PS, H (azul) = heterocigoto, y “-” (gris): genotipado fallido. a: marcador TaqMan flanqueante.

*: marcadores que definen la posición del QTL según este trabajo y Vegas *et al.* (2013).

Recombinante	SNP-2.691.690	SEQ-1	SEQ-2	SEQ-3	SEQ-4	SEQ-5	SEQ-6	FR14-P22	SNP-2.826.073 ^a	Fenotipo (<i>eth6.3</i>)
R24	A	H	-	H	H	H	H	H	H	H
R25	H	H	-	A	A	A	A	A	A	A
R26	H	H	-	H	B	B	B	B	B	B

* * * * *

4.1.6. Discusión

El clonaje posicional del QTL *eth6.3*, implicado en la maduración climatérica del fruto de melón, es el primer objetivo de esta tesis doctoral y elemento articulador de la misma. En este primer capítulo se desarrolló la población 2012-F₄, con alelos de PS en homocigosis para *eth3.5* y segregante para *eth6.3*, en la que fueron detectados 26 recombinantes en el intervalo original del QTL. La baja frecuencia de recombinación observada (1,15% tras descartar R27), podría estar ocasionada porque el QTL ocupa una región pericentromérica en el cromosoma VI que es una zona de baja recombinación (Sanseverino *et al.* 2015). El genotipado y fenotipado de 15 de los recombinantes mediante un análisis de progenie permitió la selección de *MELO3C016540*, un factor de transcripción de la familia NAC, como gen candidato para *eth6.3*.

Uno de los factores que han contribuido al éxito de este clonaje posicional ha sido el desarrollo reciente de herramientas genómicas en melón, especialmente el genoma de referencia (García-Mas *et al.* 2012). Prueba de ello es que desde su publicación en 2012 han sido clonados genes mayores como *CmPH* (implicado en la acidez del fruto, Cohen *et al.* 2014), *CmOR* (implicado en la pigmentación de la pulpa, Tzuri *et al.* 2015) y *CmKFB* (implicado en la pigmentación del exocarpo, Feder *et al.* 2015), y el gen *CmACS11*, implicado en la determinación sexual (Boualem *et al.* 2015). Cabe destacar que hasta la fecha en melón solamente han sido clonados caracteres monogénicos y que en esta tesis doctoral se describe el primer clonaje posicional de un QTL en esta especie. La resecuenciación de las líneas parentales, PS y SC, y la detección de SNPs (Sanseverino *et al.* 2015) también han sido esenciales al permitir el diseño de los marcadores moleculares utilizados para la detección de recombinantes, su genotipado y en la selección del gen candidato.

La maduración climatérica del fruto de la línea SC3-5-1, que forma parte de la población de NILs obtenida a partir de los parentales PS y SC (Eduardo *et al.* 2005), está regulada por dos QTLs en los LG III y VI, *eth3.5* y *eth6.3* respectivamente, que son capaces de inducir la maduración climatérica por separado pero que combinados aceleran el proceso de

maduración a través de la producción de una mayor cantidad de etileno (Moreno *et al.* 2008; Vegas *et al.* 2013). El primer mapeo de *eth6.3* se realizó utilizando una población recombinante para este QTL y con el alelo de SC fijado en homocigosis para *eth3.5* (Vegas *et al.* 2013) porque en un principio se pensó que *eth3.5* no era suficiente para producir frutos climatéricos y que al incluirlo en la población segregante podría ayudar al fenotipado, incrementando el efecto de *eth6.3*. Finalmente se vio que *eth3.5* sí era capaz de inducir una maduración climatérica por sí solo y que al fenotipar los recombinantes era muy difícil determinar si *eth6.3* estaba en homocigosis o heterocigosis ya que todos los frutos fueron climatéricos. La influencia de un fuerte componente ambiental hizo que la distinción entre individuos portadores y no portadores de *eth6.3* fuera, en algunos casos, muy ambigua. Por el contrario, todo el trabajo de clonaje posicional llevado a cabo en este capítulo se ha realizado utilizando una nueva población recombinante con el alelo de PS fijado para *eth3.5*, lo que supuso una gran ventaja en el fenotipado de los individuos que consistió en clasificar los frutos entre climatéricos y no climatéricos basándonos únicamente en el efecto de *eth6.3*.

En general, los marcadores fenotípicos utilizados en este capítulo (dehiscencia, cambio de color externo del fruto y producción de aromas característicos) permitieron la asignación inequívoca de un fenotipo climatérico o no climatérico a los frutos con alelos en homocigosis de SC o PS para *eth6.3* respectivamente. La clasificación de individuos con alelos en heterocigosis resultó difícil en algunos casos debido a la presencia de características climatéricas y no climatéricas en el mismo fruto, aunque la mayoría fueron clasificados como climatéricos al presentar al menos dos de los tres indicadores (por ejemplo frutos que no han virado de color pero su aroma es climatérico y han desarrollado una capa de abscisión). Estos resultados contradicen las observaciones previas en las que éste carácter parecía recesivo al no encontrar síntomas climatéricos en el híbrido GF31 x PS (Vegas *et al.* 2013). Las distintas concentraciones de etileno necesarias para el inicio de algunos procesos relacionados con la maduración climatérica como la degradación de la pared celular, el desarrollo de la capa de abscisión y el cambio de color externo (Flores *et al.* 2001) podrían explicar el fenotipo complejo de los frutos heterocigotos para *eth6.3*. Aunque hasta la fecha la producción de etileno del híbrido GF40 x PS no ha sido medida, sí se dispone del perfil del híbrido GF31 x PS (Vegas *et al.* 2013). El híbrido no muestra un pico característico evidente pero sí mantiene una producción estable de la hormona durante todo el ensayo de alrededor de 1 $\mu\text{l}/\text{Kg}\cdot\text{h}$, superior a PS. Según nuestra hipótesis, en los frutos heterocigotos para *eth6.3* no se produciría un pico en la producción del etileno, sino que éste se acumularía progresivamente activando secuencialmente los procesos de maduración. En determinadas circunstancias la producción de etileno podría no alcanzar el umbral requerido y algunos procesos no llegarían a iniciarse durante los 60 días en los que se deja crecer y madurar el fruto en la planta. No tenemos datos concluyentes que nos permitan confirmar esta hipótesis, como por ejemplo la relación entre la producción de etileno y los cambios fenotípicos que tienen lugar en el fruto durante la maduración. Recientemente, ha sido puesto a punto en el departamento un método de medición de etileno en planta, comentado con mayor detalle en la Discusión General (cap. 5), que está demostrando una gran precisión y que podría ser utilizado para el análisis de estas líneas.

Al comparar las dos campañas de fenotipado llevadas a cabo durante el clonaje posicional de *eth6.3* observamos diferencias entre los tiempos de dehiscencia de las tres líneas climatéricas utilizadas como control: GF31, GF35 y GF40 (Tabla 4.1.7). A modo de comparación, se han incluido también los datos obtenidos por Vegas y colaboradores (2013), que detectaron un fuerte componente ambiental sobre *eth3.5* (ningún fruto de la línea GF35 fue dehiscente en el año 2009). En esta tesis doctoral, sin embargo, las mayores

diferencias entre temporadas las encontramos en la línea GF40 que mostró una diferencia promedio de 11,2 días entre 2013 y 2014 (casi 20 días entre 2009 y 2014), mientras que la línea GF35 mostró un fenotipo más estable y todos su frutos fueron dehiscentes con una diferencia promedio de 4 días entre los cuatro años. También cabe destacar la poca variabilidad observada en los frutos de la línea GF31 que en los cuatro años registrados fueron dehiscentes entre los 35 y los 36,4 DAP en promedio. La época del año en la que se realizaron los ensayos podría explicar la variabilidad entre temporadas: en el año 2013 los frutos fueron más precoces que en 2014 y la mayoría de las flores fueron polinizadas entre el 1 y el 15 de agosto, mientras que en 2014 la polinización comenzó en las mismas fechas pero se alargó casi un mes más (datos no mostrados). Sería necesario un ensayo más completo, con fenotipados exhaustivos que incluyeran otros caracteres como la producción de etileno para poder trazar conclusiones sobre el comportamiento de estas líneas y el efecto del ambiente en el fenotipo.

Otro aspecto que cabe destacar es el fenotipo del parental SC que clásicamente ha sido considerado como no climatérico (Perin *et al.* 2002a) aunque algunos autores lo sitúan en algún punto intermedio entre PS y las climatéricas “Védraçais” y “Dulce” debido a su perfil basal de producción de etileno (ausencia de pico), la biosíntesis de carotenoides y expresión de algunos genes inducidos por etileno durante la maduración (Vegas *et al.* 2013; Saladie *et al.* 2015). Los resultados obtenidos en este capítulo apoyan esta hipótesis ya que se han encontrado algunos frutos de SC que podrían ser clasificados como climatéricos por la producción de aroma (aunque olfativamente es distinto al de las líneas con *eth3.5* y *eth6.3*), el cambio de color externo (de verde oscuro a verde amarillento) y el desarrollo de una capa de abscisión (se llegó a observar un fruto dehiscente en la campaña del 2013, Figura 4.1.7).

Tabla 4.1.7: Comparación entre tiempos de dehiscencia expresados en días tras la polinización (DAP) de las líneas GF31, GF35 y GF40 en las temporadas 2009, 2010, 2013 y 2014. La línea GF31 contiene alelos de SC en homocigosis para *eth3.5* y *eth6.3*; GF35 para *eth3.5* y GF40 para *eth6.3*.

a: datos procedentes de Vegas *et al.* (2013).

b: datos obtenidos en este trabajo.

- : no dehiscente.

Temporada	Tiempo de dehiscencia (DAP)		
	GF31	GF35	GF40
2009 ^a	35	-	44,9
2010 ^a	36,3	45,4	47,4
2013 ^b	35	44	53
2014 ^b	36,4	48	64,2

Tal y como se ha comentado anteriormente, los resultados de este trabajo no permiten delimitar el QTL por la derecha del intervalo ya que segrega con el marcador flanqueante, pero basándonos en el mapeo fino anterior (Vegas *et al.* 2013) podemos situar de manera concluyente el intervalo de *eth6.3* entre el marcador SEQ-3 y FR14-P22. De los tres genes anotados en esta región en el genoma de referencia, *MELO3C016538* codifica para una proteína de 81 aminoácidos que no da ningún resultado en una búsqueda en bases de datos mediante BLASTP (blast.ncbi.nlm.nih.gov), y la codificada por *MELO3C016539*, de 67 aminoácidos, parece contener un dominio RALF (código Pfam 05498). Las proteínas de la familia RALF han sido muy poco estudiadas pero podrían actuar como pequeños péptidos

señal en *Arabidopsis* (Murphy & De Smet 2014). Por último, *MELO3C016540* presenta una gran homología con factores de transcripción de la familia NAC.

Aunque en el siguiente capítulo se realiza una caracterización más detallada, cabe destacar que dos de los principales reguladores de la maduración climatérica en el fruto de tomate pertenecen a esta familia: *NOR* (o *SINAC-NOR*, Giovannoni 2004) y *SINAC4* (Zhu *et al.* 2014), por lo que *MELO3C016540* es un buen candidato para este QTL. La validación de *MELO3C016540* como gen responsable del *eth6.3* así como el clonaje posicional de *eth3.5*, también implicado en maduración climatérica en la línea SC3-5-1, ayudarán a entender las diferencias entre frutos climatéricos y no climatéricos en melón y, en general, los mecanismos que controlan el proceso de maduración.

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

4.2.1. Introducción

En el capítulo 4.1 de esta tesis se ha descrito el clonaje posicional de *eth6.3* mediante la generación de una nueva población de mapeo, la búsqueda de recombinantes y su análisis fenotípico, y la selección de *MELO3C016540* como gen candidato. Como ya se adelantó en el capítulo anterior, el gen está anotado como “Similar to NAC domain-containing protein 18 (*Arabidopsis thaliana*)” en el genoma de referencia en MELONOMICS (www.melonomics.org). En este capítulo, el primero que trata sobre la validación del gen candidato, se utilizan herramientas bioinformáticas y recursos fitogenéticos de melón para el estudio de su secuencia a tres niveles: (1) la familia de genes NAC en melón, (2) la comparación con genes NAC de otras especies con función conocida y (3) *MELO3C016540* en una colección de germoplasma de melón con origen y fenotipo diversos.

Las proteínas de la familia NAC son factores de transcripción específicos de plantas cuyos miembros contienen un dominio conservado NAC (de NAM, ATAF1/2 y CUC2) en el extremo N-terminal que está implicado en la unión a DNA y que consta de cinco subdominios A-E (Puranik *et al.* 2012). La composición en aminoácidos de los subdominios es desigual: los subdominios C y D son ricos en aminoácidos básicos pero pobres en ácidos, que por otro lado abundan en el subdominio B. Secuencias de localización nuclear putativas han sido detectadas en los subdominios C y D, y el dominio de unión a DNA está situado en una región de 60 aminoácidos que comprende parte de los dominios D y E. Esta familia de factores de transcripción es una de las mayores que se han descrito en plantas y ha sido caracterizada en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* con 105 genes (Ooka *et al.* 2003) pero también en especies de interés agronómico como arroz (151 genes, Nuruzzaman *et al.* 2010), vid (79 genes, Wang *et al.* 2013) y tomate (104 genes, Su *et al.* 2015) entre otras. Los procesos biológicos regulados por las proteínas NAC son muy diversos e incluyen el crecimiento de la planta y el desarrollo de numerosas estructuras vegetales como meristemos apicales y florales, embriones y raíces (Duval *et al.* 2002; Hibara *et al.* 2003), el metabolismo de pared secundaria (Zhong *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2014), la senescencia (Guo & Gan 2006) y la respuesta a estrés biótico (Collinge & Boller 2001; Donze *et al.* 2014) y abiótico (Selth *et al.* 2005; Mao *et al.* 2012). En el contexto de este trabajo, deben ser destacados dos genes NAC en tomate implicados en la regulación de la maduración del fruto: el gen *NOR* o también denominado *SNAC-NOR*, que ha sido identificado como el responsable del fenotipo de maduración no climatérica observado en el mutante *nor* (“non-ripening”) de tomate (patente US 6.762.347 B1, Giovannoni 2004) y el gen *SNAC4* que ha sido caracterizado como un regulador positivo de la maduración del fruto y de la acumulación de carotenoides en la misma especie (Zhu *et al.* 2014).

La validación de un gen candidato se basa en la asociación de un cambio fenotípico con diferencias entre los distintos alelos del gen, en nuestro caso la maduración climatérica con el alelo de SC y la no climatérica con el de PS. Para la caracterización molecular de *MELO3C016540* decidimos no solo estudiar su secuencia en los dos genotipos parentales sino hacerlo en un mayor número de variedades para determinar si existe una relación entre distintos alelos del gen candidato y el tipo de maduración del fruto. En el marco de una colaboración con la Dra. Belén Picó tuvimos acceso a una colección de variedades de melón perteneciente al COMAV (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana) que incluye genotipos comerciales, autóctonos y silvestres procedentes de África, América, Asia y Europa de las subsp. *melo* y *agrestis*. Teniendo en cuenta que esta

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

colección representa gran parte de la diversidad botánica existente en la especie (Esteras *et al.* 2013; Leida *et al.* 2015) y que hay variedades tanto climatéricas como no climatéricas que han sido fenotipadas para la maduración del fruto, el acceso a este recurso fitogenético ha resultado muy útil para los propósitos de este capítulo.

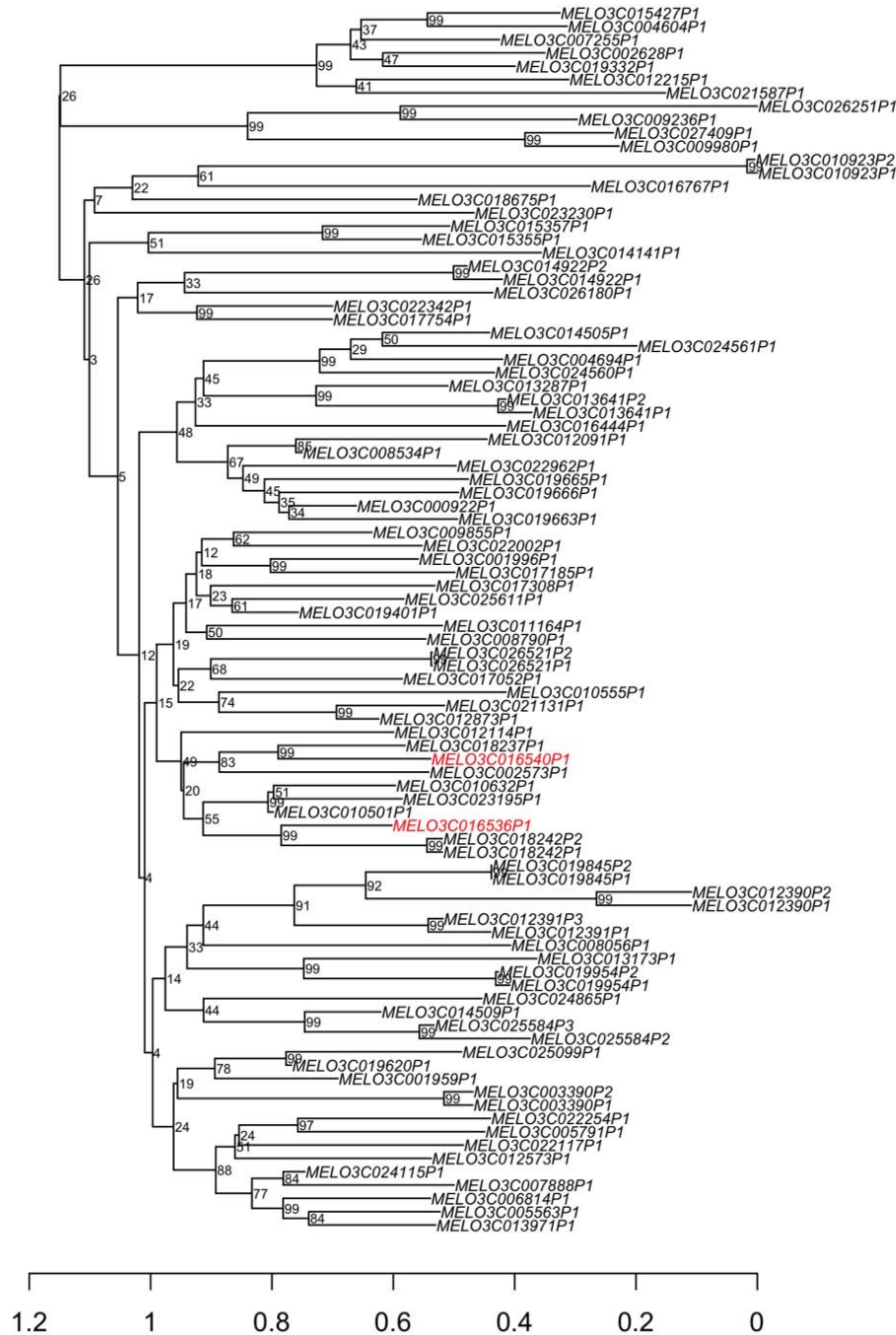


Figura 4.2.1: Análisis filogenético de la familia NAC en melón. Cladograma construido a partir del alineamiento múltiple de las 92 secuencias proteicas (81 genes) mediante el método N-J en MEGA 6 y representado con R. Los números indican el soporte del nodo mediante simulación bootstrap con 1.000 iteraciones. La escala inferior indica la distancia genética relativa entre las secuencias representadas. Se señala en rojo la proteína del gen *MELO3C016540*, candidato para *eth6.3*, y *MELO3C016536* situado a 139 Kbp del anterior.

4.2.2. La familia de genes tipo NAC en melón.

Mediante el uso del software HMMR3 (Finn *et al.* 2014), que permite la predicción de dominios NAC (código Pfam PF02365) en el genoma de referencia, se identificaron 81 genes (que codifican 92 proteínas) que conforman la familia putativa de factores de transcripción NAC en melón. Las relaciones filogenéticas entre las proteínas NAC se representan en la Figura 4.2.1. Encontramos una gran variabilidad dentro de la familia en cuanto al tamaño y la composición aminoacídica de sus miembros que implica diferencias en sus propiedades fisicoquímicas como el peso molecular y el punto isoeléctrico, tal y como se recoge en la Tabla A.4.2.1 del Anexo. El tamaño y peso molecular promedio de las proteínas NAC en melón es de 330 aminoácidos y 37,5 KDa respectivamente, pero podemos encontrar proteínas desde 117 (13,43 KDa) hasta 655 aminoácidos (73,83 KDa). También hay una gran variabilidad en cuanto al punto isoeléctrico (entre pH 4,05 y 10,4) con un promedio de 7,16.

De los 81 genes, 79 están distribuidos por los doce grupos de ligamiento mientras que dos genes (*MELO3C027409* y *MELO3C000922*) se encuentran en “scaffolds” todavía no anclados a cromosomas. El grupo de ligamiento que más genes NAC contiene es el XI con 10 genes (~12%) mientras que el V es el que menos (4 genes, ~5%) (Figura 4.2.2). La distribución de los genes no es homogénea dentro de cada cromosoma sino que tienden a formar clusters de 3 o más genes como sucede en un extremo de los GL III, VI, VII, VIII, X y XI, y en ambos extremos del GL II (Figura 4.2.3).

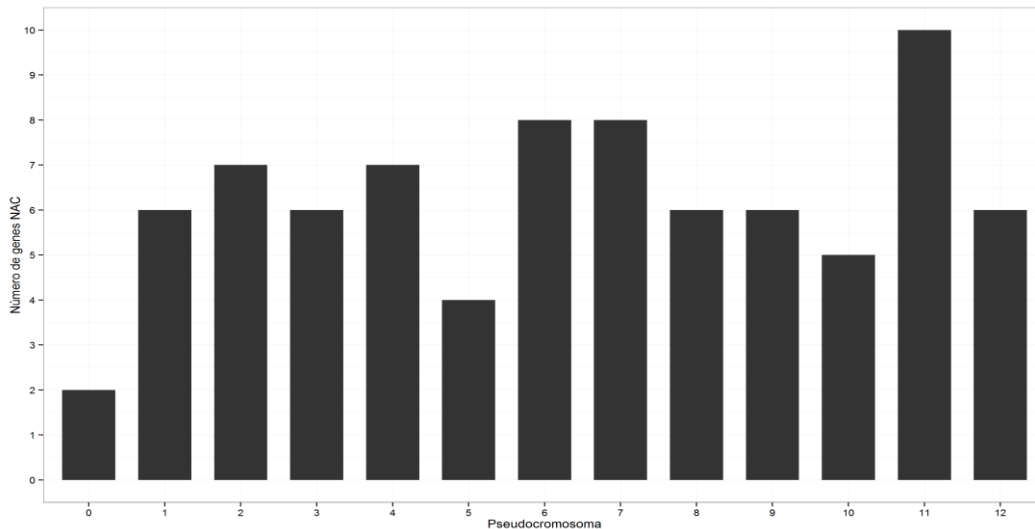


Figura 4.2.2: Distribución de los genes de la familia NAC anotados en el genoma del melón. Histograma que muestra la distribución de los 81 genes en los 12 pseudocromosomas de la versión 3.5.1 del genoma de referencia. El pseudocromosoma 0 incluye todos aquellos “scaffolds” todavía no anclados a ninguna región del genoma.

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

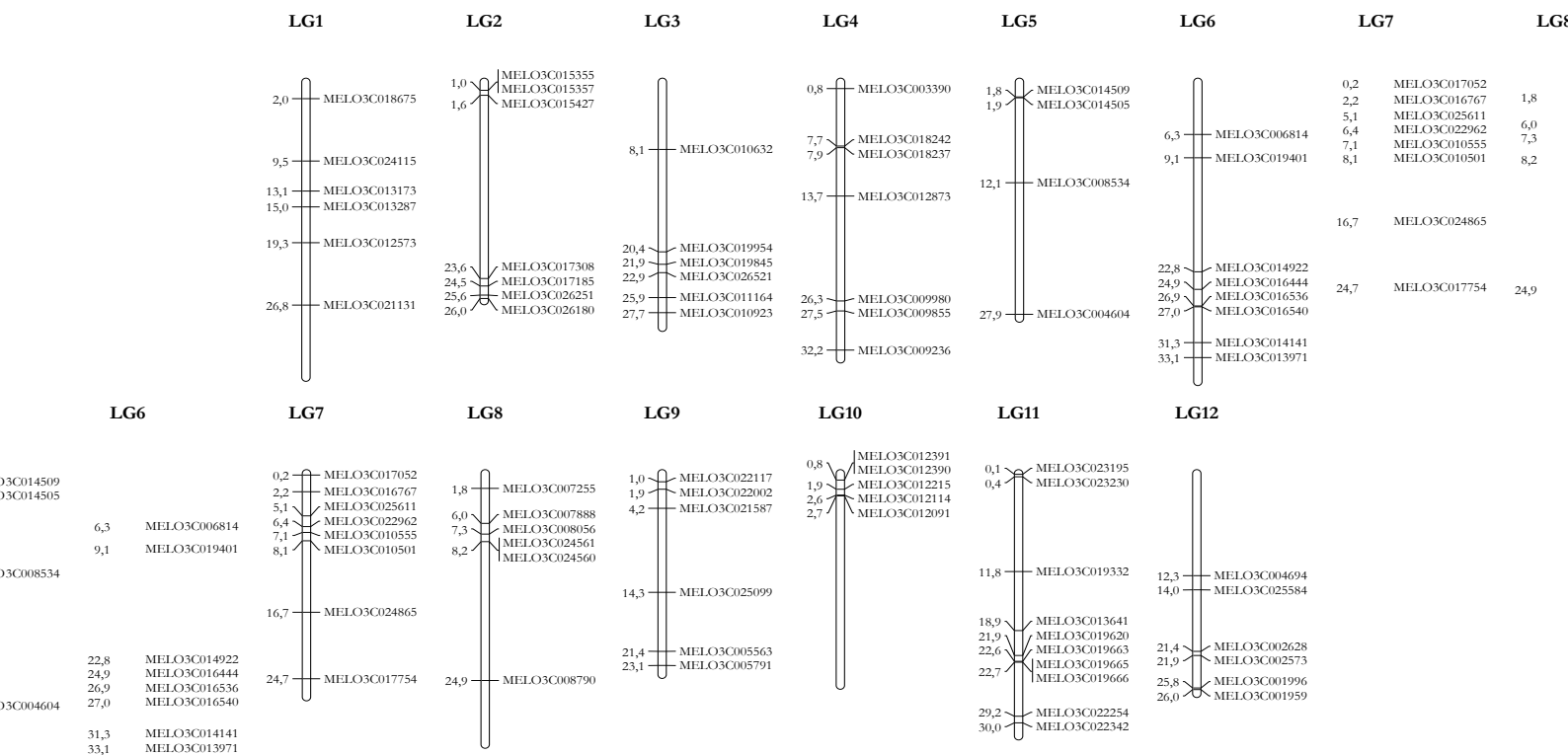


Figura 4.2.3: Posición física de los genes de la familia NAC anotados en el genoma del melón. Figura realizada con MapChart (Voorrips 2002) a partir de las posiciones físicas de los 81 genes de la familia NAC de melón en la versión 3.5.1 del genoma del melón. Las distancias desde el inicio del cromosoma están expresadas en Mb.

4.2.3. Análisis filogenético de la secuencia de MELO3C016540.

Según el genoma de referencia (v3.5.1), para el que se secuenció una línea doble haploide denominada DHL92 obtenida a partir del cruzamiento PS x SC que contiene regiones en homocigosis de ambos parentales y que en esta región pertenece a SC (García-Mas *et al.* 2012), el gen *MELO3C016540* tiene una longitud de 1.771 bp repartidos entre un ORF de 1.334 bp, una región 5'-UTR de 268 bp y una región 3'-UTR de 169 pb. El ORF consta de tres exones de 184, 314 y 564 bp y dos intrones de 89 y 183 bp (Figura 4.2.4). La longitud de la secuencia codificante (CDS) es de 1.062 bp y codifica una proteína de 353 aminoácidos. Mediante la búsqueda de dominios en la secuencia proteica a través de ScanProsite encontramos el dominio NAC situado en el extremo N-terminal entre los residuos 15 y 178.

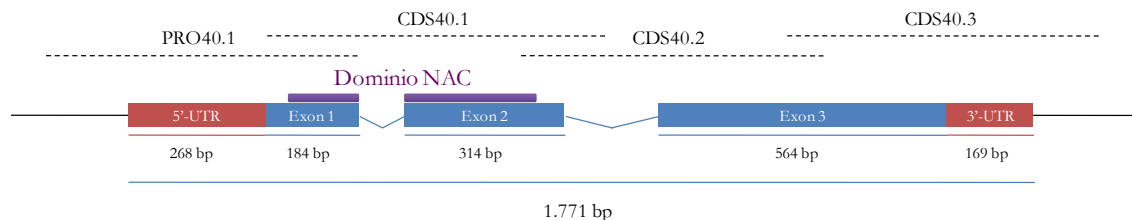


Figura 4.2.4: Estructura del gen candidato *MELO3C016540*. Las cajas rojas representan regiones no traducidas (UTR), las cajas azules las regiones exónicas y las líneas azules los intrones. El dominio NAC está señalado con una línea de color morado sobre los exones 1 y 2. Las líneas discontinuas de la parte superior esquematizan los amplicones utilizados para la secuenciación del gen en distintas variedades.

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

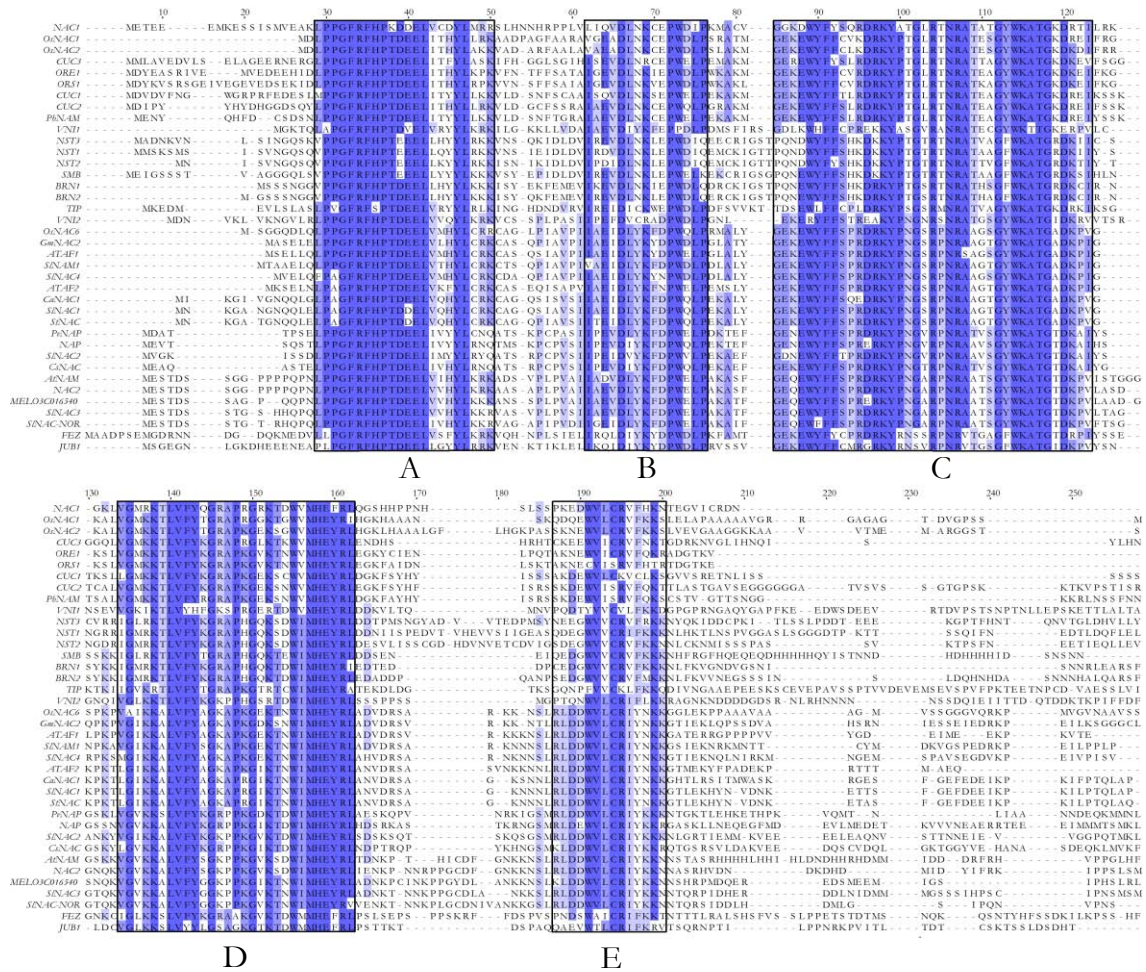


Figura 4.2.5: Alineamiento múltiple del dominio NAC de 38 proteínas de la familia NAC de distintas especies. Alineamiento realizado con ClustalO y visualizado con Jalview, del que se muestran los primeros 260 aminoácidos en los que se encuentra el dominio NAC. El sombreado azul indica un nivel de conservación superior al 75% y las localizaciones de los cinco subdominios NAC (A-E) están delimitadas por cajas negras. Los prefijos de las secuencias indican la especie de origen: Sl: *S. lycopersicum*. Os: *O. sativa*. Gm: *G. max*. Ca: *C. annuum*. St: *S. tuberosum*. Cs: *C. sinensis*. Ph: *P. hybrida*. Pv: *P. vulgaris*. Las proteínas de *Arabidopsis* no tienen prefijo a excepción de AtNAM.

Para estudiar el gen candidato en el contexto de otros miembros de la familia NAC de distintas especies con función conocida, realizamos una búsqueda bibliográfica y seleccionamos 37 proteínas procedentes de *A. thaliana* (ATAF1, ATAF2, CUC1, CUC2, CUC3, NAC1, NAC2, NST1, NST2, NST3, NAP, TIP, AtNAM, VNI1, VNI2, FEZ, BRN1, BRN2, SMB, ORE1, ORS1 y JUB1), *S. lycopersicum* (SINAC1, SINAM1, SINAC2, SINAC3, SINAC4 y SINAC-NOR), *O. sativa* (OsNAC1, OsNAC2 y OsNAC6), *G. max* (GmNAC2), *C. annuum* (CaNAC1), *S. tuberosum* (StNAC), *C. sinensis* (CsNAC), *P. hybrida* (PhNAC) y *P. vulgaris* (PvNAP). Las secuencias proteicas de estos genes junto con la del gen candidato fueron estudiadas mediante un alineamiento múltiple, evidenciando una zona muy conservada en el extremo N-terminal (primeros 200 aminoácidos del alineamiento) correspondiente al dominio NAC con sus cinco subdominios A-E (Figura 4.2.5). A través de la construcción de un cladograma observamos como la mayoría de las proteínas NAC se agrupan mayoritariamente según su función biológica (Figura 4.2.6). De esta forma podemos distinguir un gran grupo (1) con proteínas involucradas en el crecimiento y el desarrollo, junto con algunas implicadas en el metabolismo de la proteína; un grupo

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

(2) con la mayoría de proteínas implicadas en repuesta a estrés; y dos grupos (3 y 4) con proteínas implicadas en procesos de senescencia. El grupo 4 es muy heterogéneo y contiene proteínas implicadas en respuesta a estrés, en el crecimiento y desarrollo, en senescencia y maduración. Entre ellas se encuentra el factor de transcripción SINAC-NOR, involucrado en la regulación de la maduración del fruto en tomate, y la proteína de nuestro gen candidato *MELO3C016540*. La proteína SINAC4, también implicado en el control de la maduración en tomate, se agrupa en cambio con los factores de transcripción relacionados con las respuestas a estrés en el grupo 2.

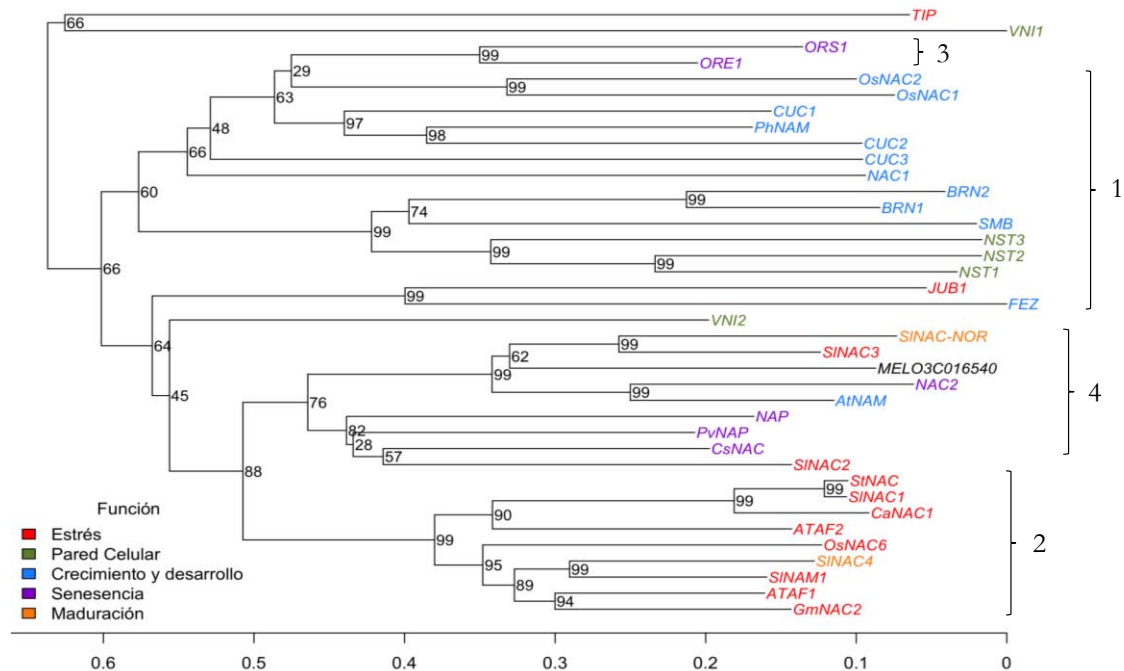


Figura 4.2.6: Análisis filogenético de la proteína MELO3C016540 respecto a proteínas de la familia NAC de otras especies. Cladograma construido a partir del alineamiento múltiple de 38 secuencias proteicas mediante el método N-J en MEGA 6 y representado con R. Los números indican el soporte del nodo mediante simulación bootstrap con 1.000 iteraciones. La escala inferior indica la distancia genética relativa entre las secuencias representadas. Los colores indican la función de cada proteína según bibliografía: rojo: respuesta a estrés biótico y abiótico; verde: metabolismo de pared secundaria; azul: el crecimiento y el desarrollo vegetal; morado: procesos de senescencia; y naranja: maduración del fruto. El color negro señala MELO3C016540. Las llaves de la derecha definen los subgrupos: 1: proteínas implicadas en crecimiento, desarrollo y metabolismo de pared secundaria; 2: proteínas implicadas en respuesta a estrés; 3 y 4: proteínas implicadas en senescencia y maduración. Los prefijos de las secuencias indican la especie de origen: Sl: *S. lycopersicum*. Os: *O. sativa*. Gm: *G. max*. Ca: *C. annuum*. St: *S. tuberosum*. Cs: *C. sinensis*. Ph: *P. hybrida*. Pv: *P. vulgaris*. Las proteínas de *Arabidopsis* no tienen prefijo a excepción de AtNAM.

4.2.4. Secuenciación del gen candidato en una colección de variedades de melón.

La última parte de la caracterización del gen candidato a nivel de secuencia consistió en su secuenciación en un panel de 54 variedades de melón (incluyendo las dos líneas parentales PS y SC, bajo los nombres In-PS-T111 y Con-SC respectivamente) (Tabla 4.2.1) y la búsqueda de polimorfismos para investigar la relación entre los distintos alelos o haplotipos del gen y el tipo de maduración de cada una de las variedades. El panel contiene variedades pertenecientes a 11 de los 16 grupos botánicos descritos en melón (Pitrat 2008) con una

gran representación de los grupos *inodorus*, *cantalupensis* y *reticulatus* de la subsp. *melo*. Otros grupos incluidos son *dudaim*, *chate* y *flexuosus* (también de la subsp. *melo*), y de la subsp. *agrestis* hay *momordica*, *conomon*, *tibish*, *chito* y tres variedades *agrestis* sin clasificar. Para el análisis se amplificaron mediante PCR el ORF, y las regiones 5' y 3'-UTR en cuatro fragmentos de unas 600 bp de longitud (indicados en la Figura 4.2.4), que después fueron secuenciados y ensamblados reconstruyendo la secuencia del gen completo de cada variedad.

En siete variedades (In-La-Mam, In-Kirk-Turkey, In-Maaz-Egypt, Chate-Car, Mom-PI124, Tibish y Chi-Vell) resultó problemática la presencia de polimorfismos en heterocigosis, especialmente indels, que imposibilitaron la reconstrucción del alelo del gen y que motivaron su exclusión de los análisis posteriores. Por otro lado, se encontraron cuatro genotipos (In-Bask-Greece, In-Hami-China, In-Am-Tunisia y Ag-Tri) con solamente un polimorfismo en heterocigosis pero, para evitar excluir más variedades de este estudio, se les asignó de los dos alelos en heterocigosis aquel alelo mayoritario en cada grupo botánico. En el resto de variedades, que no mostraron signos de heterocigosidad, los amplicones pudieron ser ensamblados obteniendo un total de 47 secuencias de alta calidad que posteriormente fueron comparadas mediante un alineamiento múltiple.

La búsqueda de diferencias entre las secuencias dio como resultado el hallazgo de 17 polimorfismos entre todas las variedades (Tabla 4.2.1) en el gen *MELO3C016540*. Si los dividimos por regiones encontramos dos polimorfismos en el promotor, tres en el 5'-UTR, uno en el primer intrón, dos en el segundo exón, tres en el segundo intrón, cuatro en el tercer exón, uno en el 3'-UTR y uno en el terminador. Del total de 17 polimorfismos, 12 son SNPs y cinco son indels. La nomenclatura utilizada indica la posición del polimorfismo respecto al nucleótido +1 del ATG, utilizando números negativos para los situados aguas arriba. Aquellos situados después de la secuencia codificante están marcados con un asterisco y su posición es relativa a la primera base del 3'-UTR. Cabe destacar que dos de estos polimorfismos, G411T y G979A, han sido utilizados para genotipar en el ap. 4.1 de esta tesis a través de los marcadores moleculares FR14-P22 y SNP-2.826.073 respectivamente.

Finalmente se construyó un cladograma a partir del alineamiento múltiple de DNA, en el que se observa una separación entre los dos grupos principales de variedades cultivadas de la subsp. *melo*: *inodorus* y *cantalupensis* (Figura 4.2.7). Sin embargo hay algunas excepciones como las variedades *cantalupensis* Can-Pres, Can-Y, Can-PS, Can-CA y Can-Ef que están próximas o integradas en el grupo de *inodorus*. Cabe destacar la cercanía de los genotipos *conomon* (Con-SC y Con-Paul) con el grupo de *cantalupensis*, que también incluye al único representante *dudaim* (Dud-QPM). Los genotipos *ameri* y *flexuosus* se encuentran dispersos en ambos grupos mientras que las variedades de los grupos *momordica* y *agrestis* sin clasificar forman tres pequeños grupos independientes.

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

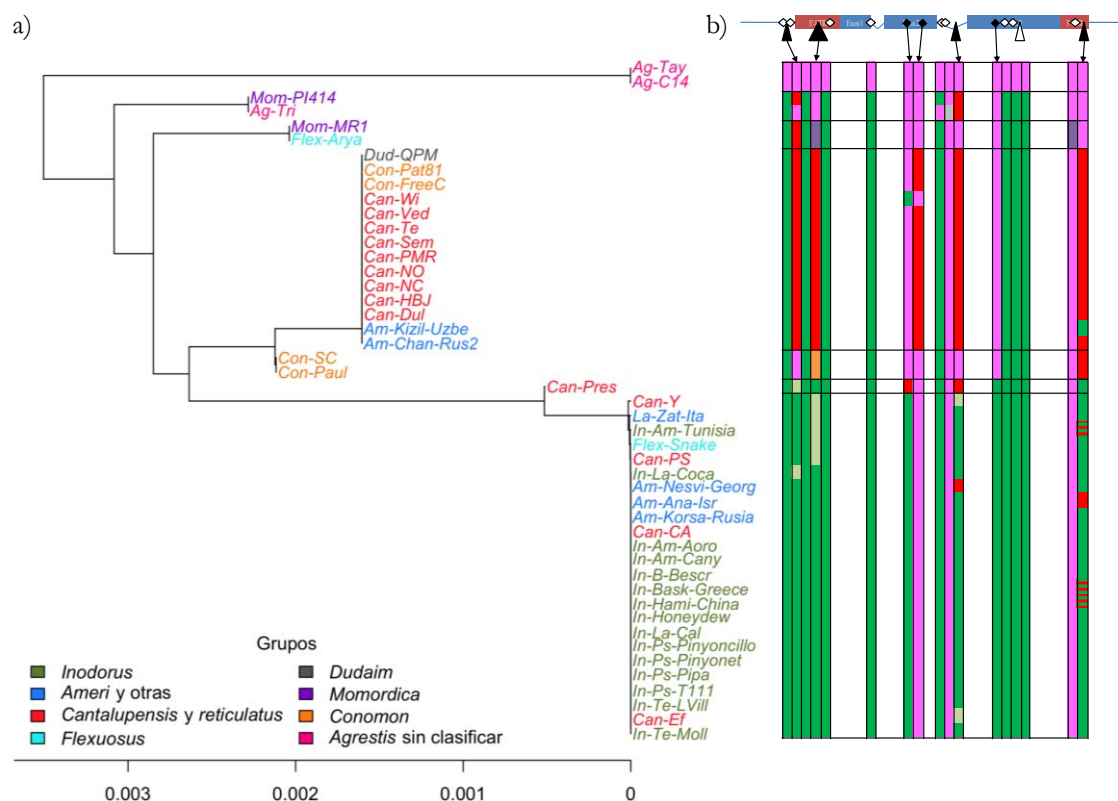


Figura 4.2.7: Análisis filogenético y representación de los alelos del gen *MELO3C016540* en la colección de variedades del COMAV. a) Cladograma construido mediante el método N-J con 1.000 iteraciones bootstrap en MEGA 6 y representado con R a partir del alineamiento múltiple de 47 secuencias de DNA realizado con ClustalO. La escala inferior indica la distancia genética relativa entre las secuencias representadas. Los colores indican la clasificación botánica según Esteras *et al.* (2013): verde: *inodorus*; azul oscuro: *ameri* y otras variedades tradicionales de Europa; rojo: *cantalupensis* y *reticulatus*; azul claro: *flexuosus*; gris: *dudaim*; morado; *momordica*; naranja: *conomon*; y rosa: *agrestis* sin clasificar. b) Visualización del genotipado de la colección mediante el uso de cajas de colores para representar distintos alelos. En la parte superior, sobre la estructura del gen *MELO3C016540*, se indica la posición de los polimorfismos mediante rombos (SNP) o triángulos (indels). El relleno negro en cada polimorfismo indica una asociación estadísticamente significativa con el tipo de maduración del fruto.

Página siguiente:

Tabla 4.2.1: Clasificación, genotipado y fenotipado de las variedades de melón del COMAV. Se presenta la clasificación botánica y origen del panel 54 variedades (Esteras *et al.* 2013) así como los datos fenotípicos sobre la maduración del fruto junto con toda la variabilidad encontrada dentro del gen *MELO3C016540*. Para los SNPs/indels se indica la zona del gen en que se encuentran. El genotipo de los polimorfismos heterocigotos se indica mediante una “x” que separa los dos alelos detectados en la variedad. El sombreado gris destaca los parentales de SC3-5-1 PS (Ino-PS-T111) y SC (Con-SC). Tipo de maduración entre 0 (completamente no climatérico como “Piel de Sapo”) y 4 (completamente climatérico como “Védrantais”). Firmeza de la pulpa expresada en Kg/0,5 cm². Abscisión: 1, “no-slip”, 2, “half-slip”, 3, “full-slip” y 4, completamente dehiscente.
¹: polimorfismos entre las líneas parentales SC y PS.

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

Subespecie	Grupo	Código	Nombre común	Origen	Clase de mercado/tipo	Genotipo						Tipo de maduración (0-4)	Fenotipo (1-4)		
						Prom.	5'-UTR	Intrón 1	Exón 2	Intrón 2	Exón 3			3'-UTR	Term.
<i>Melo</i>	<i>Inodora</i> : cultivares comerciales	In-Ps-T111	Piel de sapo	Spain	Piel de sapo	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.20	2.13
		In-Ps-Pinyon	Piel de sapo	Spain	Piel de sapo	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.20	2.13
		In-Honeydew	Honeydew	Spain	Honeydew	C	10	G	INO	A	A	G	0	1.95	3.25
		In-Ps-Pipa	Pipa de Oro	Ciudad Real	Pipa de Oro	C	10	G	INO	A	A	G	0	3.03	2.00
		In-Ps-Pinyon	Piñoncillo	Albacete	Piñoncillo	C	10	G	INO	A	A	G	0	3.15	2.00
		In-Ap-Cayra	Caña Dulce	Jiácn	Caña Dulce	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.68	2.00
		In-Am-Auro	Amarillo Oro	Murcia	Amarillo	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.20	2.00
		In-B-Beser	Blanco Escrito	Kadiz	Blanco	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.13	2.25
		In-Te-Mol	Moltena	Lérida	Tendral	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.25	2.14
		In-Te-LVil	Largo de Villacoñejo	Madrid	Tendral	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.35	2.75
		In-La-Coca	Coca	Jiácn	Other	C	13	G	INO	A	A	G	1	1.40	2.43
		In-La-Cal	Melón de Calanante	Cáceres	Other	C	10	G	INO	A	A	G	1	1.90	2.31
	In-La-Mim	Madura Amarella	Badajoz	Other	C	10	G	INO	A	A	G	1	2.02	2.00	
	In-Krk-Turkey	Kirkagac	Turkey	Kirkagac	C	10	G	INO	A	A	G	0	0.95	2.00	
	In-Maz-Egypt	Miaazon	Egypt	Amarillo	C	10	G	INO	A	A	G	0	1.05	2.27	
	In-Bask-Greece	Baskavas	Greece	Amarillo	C	10	G	INO	A	A	G	0	1.60	2.50	
	In-Hami-China	Hami	China	Hami melon	C	10	G	INO	A	A	G	0	2.10	2.00	
	In-Am-Tunisia	Gv-2	Tunisia	Amarillo	C	10	G	INO	A	A	G	3	1.70	3.00	
	In-Am-Korea	Korea	Rusia	Ameri	C	10	G	INO	A	A	G	4	1.65	3.67	
	In-Am-Kzyl-Uzbe	Kzyl Unak	Uzbekistan	Ameri	C	6	G	CAN	A	A	G	3	1.20	3.29	
	In-Maz-Georg	Mucha nesvi	Georgia	Ameri	C	10	G	INO	A	A	G	2	1.55	2.00	
	In-Chan-Rus2	Chandlak	Rusia	Chandlak	C	6	G	CAN	A	A	G	4	1.50	3.20	
	In-Am-Aleat	Avanas Yokneam	Israel	Ameri	C	10	G	INO	A	A	G	3	1.85	3.25	
	In-Zate-Ita	Zatte	Italy	Italian Indorec	C	10	G	INO	A	A	G	4	1.31	3.00	
In-Am-CA	Cantalup d'Alger	France	Cantaloupe	C	10	G	INO	A	A	G	4	0.70	3.00		
In-Can-Dul	Dulce	USA	Reiculatus	C	6	G	CAN	A	A	G	4	2.05	3.25		
In-Can-NO	Nantais oblong	France	Charentais	C	6	G	CAN	A	A	G	4	2.00	3.63		
In-Can-NC	Noir des cammes	France	Cantaloupe	C	6	G	CAN	A	A	G	4	2.15	2.67		
In-Can-PMR	PMR45	USA	Reiculatus	C	6	G	CAN	A	A	G	3	3.00	2.80		
In-Can-Pres	Prescott fond blanc	France	Cantaloupe	C	12	G	INO	A	A	G	4	1.37	3.60		
In-Can-Ved	Vedranais	France	Charentais	C	6	G	CAN	A	A	G	4	1.45	3.57		
In-Can-Wi	W1998	USA	Gyrocarous breud. line other Cantalupensis	C	6	G	CAN	A	A	G	4	0.74	4.00		
In-Can-Y	Y285	Yugoslavia	Reiculatus	C	10	G	INO	A	A	G	4	2.90	3.00		
In-Can-HB	Ar Hale best jumbo	USA	Reiculatus	C	6	G	CAN	A	A	G	4	2.90	3.00		
In-Can-Ef	Eard's favourite	Japan	Reiculatus	C	10	G	INO	A	A	G	3	1.45	2.75		
In-Can-Je	Old Time Tennessee	USA	other Cantalupensis	C	6	G	CAN	A	A	G	4	1.50	3.50		
In-Can-PS	Persian Small type	USA	other Cantalupensis	C	10	G	INO	A	A	G	3	1.95	2.57		
In-Can-Sem	Seminole	USA	other Cantalupensis	C	6	G	CAN	A	A	G	4	2.20	3.43		
In-Flex-Snake	Snakemelon	Saudi Arabia	Flexuosus	C	10	G	INO	A	A	G	2	0.80	2.00		
In-Flex-Arya	Arya 2	India	Flexuosus	C	6	G	CAN	A	A	G	3	1.55	2.17		
In-Chate-Car	Carosello Barese	Italy	Chate	C	10	G	INO	A	A	G	4	1.80	3.17		
In-Dual-QRM	Queens pocket melon	Afghanistan	Dudaim	C	6	G	CAN	A	A	G	3	3.80	4.00		
In-Mom-PI24	PI24	India	Momorica	C	6	G	MON	A	A	G	3	2.30	3.75		
In-Mom-MR1	MR1	India	Momorica	C	6	G	MON	A	A	G	4	0.74	4.00		
In-Mom-PH14	IJ 90234	India	Momorica	C	6	G	AGI	A	A	G	4	0.74	4.00		
In-Com-Pa81	Pa81	Korea	Makwa	C	6	G	CAN	A	A	G	1	4.35	2.89		
In-Com-Freec	Freemans cucumber	Japan	Gommon	C	6	G	CAN	A	A	G	0	3.70	2.00		
In-Com-Paul	Paul	Poland	Hemipholitic	C	7	G	CON	A	A	G	4	0.74	4.00		
In-Com-SC	Songwan-Chami	Korea	Chimensis	C	7	G	CON	A	A	G	1	1.80	2.23		
Otras (<i>hibib</i> , <i>chil</i> y <i>agresis</i>) de Asia y África)	In-Tib	Tibish	Sudan	Tibish	C	7	G	TIB	A	A	C	0	8.00	1.00	
	In-Chi-Vell	Vellert	India	Chito	C	7	G	CHI	A	A	C	2	3.85	2.29	
	In-Ag-C14	15591	Ghana	Agresis small size	T	7	T	AG2	G	T	T	A	1	4.00	2.29
	In-Ag-Tay	Tayer	Gameron	Agresis small size	T	7	T	AG1	G	T	T	A	1	4.00	3.33
	In-Ag-Tr	Tageron	India	Agresis small size	C	7	G	AG1	A	A	G	0	0	0	

Para analizar el grado de asociación de cada uno de los polimorfismos respecto al tipo de maduración del fruto contamos con el fenotipado realizado por el COMAV, descrito en detalle en el ap. 3.3 de Material y Métodos. Resumidamente, consiste en tres variables que miden el desarrollo de la capa de abscisión, la firmeza de la pulpa y el tipo de maduración del fruto. El fenotipado del panel de variedades utilizado en este trabajo se recoge en la Tabla 4.2.1. Tal y como esperábamos, las tres variables están correlacionadas: al aumentar el grado de climaterio aumenta también el desarrollo de la capa de abscisión (corr. 0,78) y disminuye la firmeza de la pulpa (corr. -0,41). A pesar de que tanto la firmeza como la capa de dehiscencia son dos variables precisas y cuantitativas, el hecho de que las tres estén correlacionadas significativamente (p -valor $< 0,01$) y que la variable “tipo de maduración” englobe todos los procesos de maduración según la experiencia del personal responsable de la colección, hizo que se utilizara solamente esta última variable en el estudio de asociación.

Tabla 4.2.2: Estudio de asociación entre los 17 polimorfismos y el tipo de maduración. Se presentan los resultados de la aplicación de un análisis de la varianza ajustado a un modelo lineal generalizado (ANOVA-GLM) para el estudio de la asociación entre cada polimorfismo y la variable fenotípica tipo de maduración. Los asteriscos entre paréntesis indican el nivel de significación: *: p -valor $< 0,05$; **: p -valor $< 0,01$. N.D.: no disponible, el tamaño del grupo no permite este tipo de análisis.

¹: polimorfismos entre las líneas parentales SC y PS.

Polimorfismo	P-valor
C-296T	0,328
INDEL-282 ¹	0,002 (**)
G-263T	0,115
INDEL-126 ¹	0.003 (**)
A-22G	0,328
C222T	0,44
G411T ¹	0,015 (*)
T533A	0,029 (*)
G656T	0,34
T670G	N.D.
INDEL743 ¹	0,020 (*)
G979A ¹	0,041 (*)
A1073C	0,283
INDEL1113	0,289
A1206T	0,619
A*121G	0,467
INDEL*173 ¹	0,017 (*)

Antes de analizar los polimorfismos, estudiamos si existe una asociación entre el grupo botánico y el grado de climaterio mediante un análisis de la varianza ajustando un modelo lineal generalizado (ANOVA-GLM). El resultado indicó que existe una asociación muy clara entre ambas variables (p -valor = 1×10^{-12}). Siguiendo el mismo procedimiento, se analizaron los 17 polimorfismos y se encontró asociación significativa con el tipo de maduración en 7 de ellos (Tabla 4.2.2) que fueron estudiados en más detalle para tratar de averiguar su vinculación con los cambios fenotípicos. Los 7 polimorfismos están repartidos por todo el gen: desde el promotor (INDEL-282), el 5'-UTR (INDEL-126) y la región codificante (G411T, T533A, INDEL743 y G979A) hasta el 3'-UTR (INDEL*173). Los distintos alelos parecen estar ligados, como en el caso de los grupos de variedades *inodorus*, *cantalupensis*, *momordica* y *conomon*, que presentan haplotipos bastante conservados y

diferenciables entre sí, aunque cabe destacar que los haplotipos *momordica* y *conomon* son en general más similares al *cantalupensis* que al *inodorus*. Cabe destacar que el polimorfismo T670G que no pudo ser analizado debido a que es monomórfico para todas las variedades del panel excepto para una, Ag-Tri, que es heterocigota, por lo que no se pudo estudiar la varianza mediante ANOVA-GLM.

Tal y como esperábamos, los polimorfismos dentro de la subsp. *melo*, y especialmente entre las variedades climatéricas (*cantalupensis*) y las no climatéricas (*inodorus*), son las más asociadas con el tipo de maduración. De entre los 7 polimorfismos asociados con el tipo de maduración, los más interesantes son aquellos situados en la CDS, dejando de lado los UTR y el promotor, ya que pueden producir cambios no sinónimos y afectar a la función de la proteína. Se analizaron los tres SNP exónicos, de los cuales dos (G411T y G979A) son polimórficos entre los dos parentales In-PS-T111 y Con-SC y, junto con T533A, los tres son polimórficos entre In-PS-T111 y la variedad climatérica “Védrañtais” (Can-Ved). El SNP T533A es sinónimo mientras que G411T y G979A producen cambios no sinónimos (A108S y S236N) de forma que las proteínas expresadas por los alelos de Con-SC y de Can-Ved son idénticas a nivel aminoacídico pero diferentes a la de PS (Figura 4.2.8). A pesar de que las sustituciones no afectan directamente a las regiones conservadas de los subdominios NAC, el cambio A108S sucede a tres aminoácidos de distancia del subdominio C. La herramienta bioinformática PROVEAN predice que el efecto sobre la proteína es neutro en ambos casos, basándose en la conservación de los residuos sustituidos en proteínas NAC de otras especies (Tabla 4.2.3). Los polimorfismos situados fuera de la región codificante, tanto en el promotor (INDEL-282) como en las regiones no traducidas 5 y 3'-UTR, (INDEL-126 e INDEL*173) son los que presentan mayor grado de significación en el estudio de asociación y podrían influir en la expresión del gen, en la estabilidad de la molécula de mRNA o en la traducción, pero el efecto es difícil de predecir. Cabe destacar el INDEL-126 en el 5'-UTR, que es el indel más grande de todos los encontrados, y del que se identificaron 9 alelos con diferencias de hasta 28 bp (Figura 4.2.9).

Tabla 4.2.3: Predicción del efecto de los polimorfismos G411T y G979A sobre la proteína MELO3C016540. Se muestran las puntuaciones según PROVEAN para los cambios de aminoácido indicados y la predicción del efecto de la sustitución sobre la función proteica.

Polimorfismo	Cambio aa	Puntuación	Efecto
G411T	A108S	2,099	Neutral
G979A	S236N	-0,191	Neutral

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

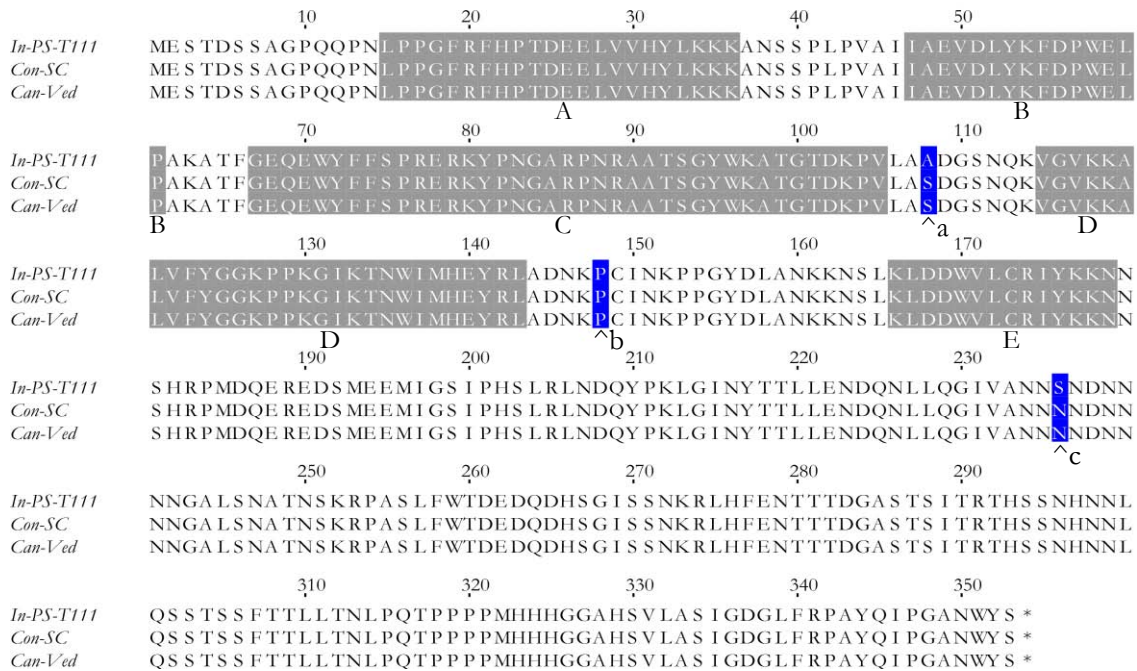


Figura 4.2.8: Comparación de las secuencias proteicas de MELO3C016540 en las variedades In-PS-T111, Con-SC y Can-Ved. Alineamiento construido con el algoritmo ClustalO y representado mediante Jalview destacando en gris las regiones conservadas del dominio NAC (subdominios A-E). En azul los aminoácidos afectados por los tres polimorfismos detectados en la secuencia de DNA.

a: G411T, cambio A108S; b: T533A, cambio sinónimo; c: G979A, cambio S236N.

Para facilitar la comparación entre alelos del INDEL-126, el más largo fue dividido en cinco bloques (A-E): una cadena poliA (bloque A) y cuatro heptanucleótidos con variaciones: “GAGAAAA” (bloque B); “GAAAAAA” (bloque C); “GAAATAA” (bloque D); y “GAATAAA” (bloque E) (Figura 4.2.10). De esta forma podemos clasificar los alelos en función de sus bloques: por un lado el grupo ABCD (alelos INO y CHA), el grupo A (alelos CAN y CON), el grupo ABC (alelos AG1, AG2, MOM y CHI) y el grupo ABE (solamente el alelo TIB). El grupo ABCD engloba a todas las variedades *inodorus*, cuatro *ameri*, cinco *cantalupensis*, un *flexuosus* y un *chate*. El grupo A incluye la mayoría de *cantalupensis*, todos los *conomon* y dos *ameri*. El grupo ABC incluye todos los *momordica*, todos los *agrestis* sin clasificar, un *flexuosus* y el único *chito*. Y por último, la única variedad ABE es *tibish*.

Página siguiente:

Figura 4.2.9: Alineamiento múltiple de las secuencias de las variedades de melón en el polimorfismo INDEL-126. Alineamiento realizado mediante ClustalO y representado con Jalview del que se muestra la región 5'-UTR entre los nucleótidos -148 y -84 del gen MELO3C016540. Los colores de fondo verde y naranja señalan las subsp. *melo* y *agrestis* respectivamente, la clasificación botánica se corresponde con la realizada por Esteras *et al.* (2013) y a la derecha se especifica la abreviatura utilizada para nombrar cada alelo en el genotipado de la colección: INO, CHA, CAN, CON, AG1, AG2, TIB, MOM y CHI.

4.2. Validación del gen candidato para *eth6.3* mediante secuenciación.

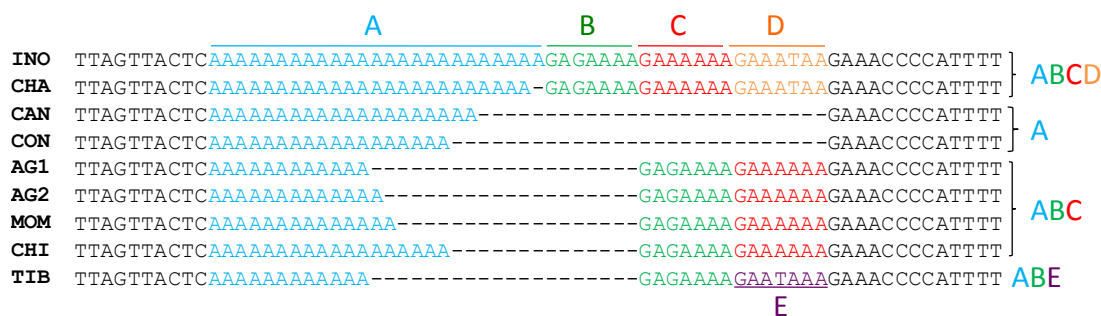


Figura 4.2.10: Bloques encontrados para el INDEL-126. El fragmento representado se corresponde con el intervalo entre los nucleótidos -148 y -84, situados en la región 5'-UTR del gen *MELO3C016540*. A la derecha se definen los grupos (ABCD, A, ABC y ABE) en función de la presencia de los bloques A (azul, cadena poliA), B (verde, “GAGAAA”), C (rojo, “GAAAAA”), D (naranja, “GAAATA”) y E (morado, “GAATAA”).

4.2.5. Discusión

Tras la selección de *MELO3C016540* como candidato para el QTL *eth6.3* implicado en la regulación de la maduración climaterica en la línea SC3-5-1 de melón, en este capítulo se ha llevado a cabo una caracterización del gen a través de tres estrategias distintas: la detección de los miembros putativos de la familia de factores de transcripción NAC en melón, la comparación de su secuencia proteica con otras NAC de otras especies y función conocida, y su secuenciación en un panel de variedades de melón con origen y fenotipo diversos. A continuación se discutirán los aspectos más relevantes de cada una de ellas y se planteará una hipótesis sobre cómo podrían estar relacionados los distintos alelos de *MELO3C016540* con la maduración del fruto de melón.

La familia putativa de factores de transcripción NAC en melón consta de 81 genes (que codifican 92 proteínas), en los que se ha detectado la presencia del dominio característico NAC implicado en la unión a DNA. El tamaño de esta familia en melón es inferior al de la mayoría de especies en las que ha sido caracterizada (Tabla 4.2.4), aunque destaca la ausencia de estudios similares en especies más cercanas al melón. La caracterización de proteínas NAC en otras cucurbitáceas cuyo genoma ha sido secuenciado, como la sandía (Guo *et al.* 2013) y el pepino (Huang *et al.* 2009; Woycicki *et al.* 2011), permitiría hacer comparaciones más exhaustivas e investigar la diversificación de sus miembros en estas especies.

La proteína *MELO3C016540* presenta la típica estructura de un factor de transcripción de la familia NAC: es relativamente corta (353 aminoácidos) con el dominio NAC muy conservado situado en la mitad N-terminal (entre los residuos 15 y 178) y una mitad C-terminal más diversa (Olsen *et al.* 2005). La gran conservación que observamos entre proteínas de distintas especies y función conocida (Figura 4.2.5), que permite incluso reconocer los cinco subdominios NAC A-E, ya ha sido observada anteriormente en trabajos similares realizados en arroz, *Arabidopsis* y tomate, entre otros (Ooka *et al.* 2003; Ernst *et al.* 2004; Jensen *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2014).

Tabla 4.2.4: Tamaño de las familias de genes NAC descritas en plantas. Se indica el número de genes anotados en cada especie así como el artículo en el que se describieron por primera vez.

*: este mismo capítulo de tesis.

Especie	Tamaño	Referencia
Vid	79	Wang <i>et al.</i> 2013
Melón	81	*
Guandú (<i>Cajanus cajan</i>)	88	Satheesh <i>et al.</i> 2014
Yuca	96	Hu <i>et al.</i> 2015
<i>Jatropha curcas</i>	100	Wu <i>et al.</i> 2015
<i>Brachypodium distachyon</i>	101	You <i>et al.</i> 2015
Tomate	104	Su <i>et al.</i> 2015
Arabidopsis	105	Ooka <i>et al.</i> 2003
Mijo	147	Puranik <i>et al.</i> 2013
Arroz	151	Nuruzzaman <i>et al.</i> 2010
Tabaco	152	Rushton <i>et al.</i> 2008
Soja	152	Le <i>et al.</i> 2011
Maíz	152	Shiriga <i>et al.</i> 2014
Chopo	163	Hu <i>et al.</i> 2010
Col china	204	Liu <i>et al.</i> 2014

La construcción del árbol filogenético permitió la clasificación de las 37 proteínas en cuatro grandes grupos que, en general, agrupan a proteínas con funciones similares independientemente de la especie de procedencia (Figura 4.2.6). Lo más destacable es la cercanía entre el factor de transcripción SINAC-NOR (también denominado NOR) y MELO3C016540, ya que el primero podría ser considerado como el principal regulador de la maduración en tomate y probablemente en otras especies tanto climatéricas como no climatéricas (Klee & Giovannoni 2011; Osorio *et al.* 2011). La mutación *nor* da lugar a frutos desarrollados con semillas fértiles pero que a diferencia de los tomates “wild type” no inician la maduración debido a la inhibición de procesos como la transición hacia una biosíntesis autocatalítica de etileno, el incremento de la tasa de respiración, la degradación de clorofilas y síntesis de pigmentos, el reblandecimiento de la pulpa y el desarrollo de aromas (Klee & Giovannoni 2011). Del mismo modo en que durante la maduración climatérica de algunas variedades de melón como “Védrantais” se activan procesos metabólicos muy similares a los que han sido descritos en tomate “wild type”, se puede trazar un paralelismo entre el mutante *nor* y las variedades no climatéricas como PS: no se produce etileno durante la maduración, el color del exocarpo no vira de verde a amarillo, no hay biosíntesis de carotenoides en la pulpa del fruto, su reblandecimiento es menor y no es aromático (Vegas 2014; Saladie *et al.* 2015). El paralelismo es aún más evidente si tenemos en cuenta que los frutos *nor* no maduran en respuesta a etileno exógeno del mismo modo en que tampoco lo hacen los melones no climatéricos (Guis *et al.* 1997; Perin *et al.* 2002a; Giovannoni 2007; Saladie *et al.* 2015). Algunos autores han hipotetizado sobre la posibilidad de que, en general, los frutos no climatéricos fueran mutantes en genes implicados en la biosíntesis y señalización de etileno o en factores de transcripción ortólogos a los caracterizados en tomate como *RIN*, *NOR* y *CNR* (Giovannoni 2004). En el caso del melón, la gran reprogramación genética en el fruto observada entre variedades climatéricas y no climatéricas durante la maduración apunta hacia la acción de uno o varios factores de transcripción (Saladie *et al.* 2015) y los resultados de este capítulo sugieren que MELO3C016540 podría ser uno de ellos dada su homología con *NOR*.

Además de SINAC-NOR, dentro del grupo de MELO3C016540 en el árbol filogenético encontramos las proteínas NAP, NAC2, PvNAP y CsNAC. Las cuatro están implicadas en procesos de senescencia de las hojas en *Arabidopsis* (NAP y NAC2, Guo & Gan 2006; Balazadeh *et al.* 2010) y judía (PvNAP, Tucker *et al.* 2002), y del fruto del naranjo (CsNAC, Liu *et al.* 2009b). Dada la similitud a nivel de secuencia con MELO3C016540, no se puede descartar que esta proteína también esté implicada en procesos de senescencia además de en la maduración del fruto, tal y como ha sido hipotetizado para SINAC-NOR (Zhu *et al.* 2014).

Por último, la proteína SINAC4, que también está implicada en la regulación de la maduración del fruto en tomate, agrupa con proteínas implicadas en la regulación de respuestas a estrés biótico y abiótico (grupo 2 en la Figura 4.2.6). Cuando este factor de transcripción fue descrito por primera vez, los autores observaron el mismo fenómeno y comprobaron que SINAC4 está implicada en la respuesta a estrés abiótico en esa especie posiblemente a través del control de la síntesis de etileno (Zhu *et al.* 2014).

La secuenciación de MELO3C016540 en el panel de 54 variedades de melón del COMAV, que son representativas de la diversidad dentro de la especie (Esteras *et al.* 2013; Leida *et al.* 2015), ha dado como resultado la detección de una gran variabilidad a nivel de secuencia, pero también evidencia la asociación entre algunos polimorfismos y el tipo de maduración del fruto. Se detectó una asociación muy significativa entre el grupo botánico y el tipo de maduración, debida en gran parte a la sobrerrepresentación de dos grupos de variedades: *inodorus* (no climatéricas) con 18 accesiones y *cantalupensis* (climatéricas) con 14 accesiones, que presentan una maduración muy distinta entre ellas pero homogénea dentro de cada grupo (Tabla 4.2.1). Se encontraron 7 polimorfismos asociados con el tipo de maduración (Tabla 4.2.2) que son polimórficos entre las variedades dentro la subsp. *melo*, en especial entre *inodorus* y *cantalupensis*. Los 10 polimorfismos restantes, que no muestran asociación con la maduración, son en su mayoría monomórficos dentro de la subsp. *melo* y polimórficos entre ésta y la subsp. *agrestis*. Con los datos de que disponemos no podemos saber si las diferencias en el tipo de maduración se deben a un solo polimorfismo o la combinación de varios de ellos. Comenzaremos discutiendo primero el efecto que podrían tener individualmente y después trataremos de dar una visión de conjunto analizando los haplotipos.

De los tres polimorfismos asociados con el tipo de maduración que han sido detectados dentro de la CDS de MELO3C016540 (G411T, T553A y G969A), el segundo es un cambio sinónimo y los otros dos no sinónimos, pero tendrían un efecto neutral sobre la función proteica según la predicción realizada. Aunque los polimorfismos están situados fuera del dominio conservado NAC, la segunda mitad (extremo C-terminal) contiene típicamente las regiones más variables que están implicadas en el control de la transcripción y unión a proteínas (Puranik *et al.* 2012). Sin embargo, el polimorfismo G411T es utilizado como marcador genético en el clonaje posicional de *eth6.3* bajo el nombre de FR14-P22 y delimita el QTL por la derecha (Vegas *et al.* 2013; ver cap. 4.1), por lo que nos permitiría descartar las sustituciones aminoacídicas causadas por G411T y G969A como las causales de las diferencias fenotípicas. Del mismo modo también se reduce el número de polimorfismos candidatos a los dos situados aguas arriba del nucleótido 411 en la secuencia de MELO3C016540: INDEL-126 e INDEL-282. El polimorfismo INDEL-126, que está situado en el 5'-UTR, podría ser importante porque esta región regula la traducción de genes en plantas aunque no se conocen sus mecanismos de acción por completo (Kawaguchi & Bailey-Serres 2005; Kim *et al.* 2014). Por último, INDEL-282 está situado en la región promotora y podría alterar la transcripción del gen dando lugar a un abanico muy

amplio de efectos, desde una completa inhibición hasta una expresión constitutiva o ectópica (Dutt *et al.* 2014), aunque no se han encontrado diferencias de expresión significativas entre frutos maduros de “Védrantais” y PS (Saladie *et al.* 2015).

La distribución de los grupos botánicos en el cladograma construido a partir de las distancias genéticas entre los alelos de *MELO3C016540* (Figura 4.2.7) no se corresponde con la distribución según el genotipado con 768 SNPs repartidos por todo el genoma que se representa en la Figura 1.2b (Esteras *et al.* 2013). La principal diferencia entre ambos es que según el haplotipo de *MELO3C016540* las variedades *conomon* (subsp. *agrestis*) aparecen representadas dentro del mismo clado que las *cantalupensis* (subsp. *melo*) mientras que desde un punto de vista filogenético son muy distantes. Otra diferencia es la presencia de 5 variedades del grupo *cantalupensis* dentro del clado de mayoría *inodorus* (Can-Pres, Can-Y, Can-Ps, Can-CA y Can-Ef) mientras que en el estudio anterior no fue detectado ningún caso. El hecho de que las distancias entre variedades sean distintas para el gen *MELO3C016540* que para el estudio filogenético usando todo el genoma podría indicar que este gen ha estado sometido a una presión de selección distinta a la de otras partes del genoma, probablemente debido a su relación directa con un proceso muy importante para la calidad del fruto como es la maduración. Cabe destacar que todas las variedades *inodorus*, *cantalupensis* y *conomon* incluidas en este trabajo son variedades cultivadas (Esteras *et al.* 2013).

El estudio del alcance biológico de los polimorfismos entre los alelos de estos tres grupos botánicos será fundamental para conocer de que modo están implicados con la regulación de la maduración en melón. Tal y como se ha dicho anteriormente, los polimorfismos podrían afectar a *MELO3C016540* en varios aspectos que deberán ser estudiados en el futuro. Finalmente planteamos a continuación una hipótesis que tiene en cuenta los resultados obtenidos hasta este punto, aunque será ampliada en la Discusión General (cap. 5) integrando las discusiones de los siguientes capítulos. Según nuestra hipótesis, las variedades no climatéricas como la *inodorus* PS tendrían un alelo de *MELO3C016540* que, por razones todavía desconocidas, inhibe la maduración climatérica del fruto de un modo global similar al gen *SINAC-NOR* en tomate. La línea *conomon* SC, en cambio, tendría un alelo funcional de *MELO3C016540* pero estaría mutado en algún otro gen distinto también implicado en este proceso que le impediría madurar climatéricamente. Este gen o genes podrían ser responsables de los genes mayores y QTLs detectados en la población de RILs “Védrantais” x SC (Perin *et al.* 2002a). Finalmente, las variedades climatéricas *cantalupensis* tendrían toda la ruta intacta y por eso son capaces de madurar de forma climatérica. De este modo cuando se introduce el alelo *conomon* de *MELO3C016540* procedente de SC en el fondo genético de PS (es decir, la línea GF40) se produce un fruto con fenotipo climatérico (Vegas *et al.* 2013; cap. 4.1). La existencia de variedades climatéricas con el alelo *inodorus* de *MELO3C016540* detectadas en el panel de variedades (Can-Y, Can-Ps, Can-CA y Can-Ef) podría explicarse por la existencia de otro/s gen/es implicados en maduración climatérica funcionales en SC y variedades *cantalupensis*. Este gen o genes podrían ser los responsables del QTL *eth3.5*, también involucrado en la maduración climatérica del fruto y que todavía no ha sido clonado.

4.3. Validación del gen candidato para *eth6.3* por TILLING.

4.3.1. Introducción

En los capítulos anteriores se describe el clonaje posicional del QTL *eth6.3* y la identificación del gen candidato *MELO3C016540*, miembro de la familia de factores de transcripción NAC en melón. Tras una primera aproximación para la validación del candidato a nivel de secuencia, este capítulo y el siguiente tratan sobre su validación a través del uso de herramientas de genética inversa. En contraposición a la genética directa, que trata de encontrar la base genética de una variación fenotípica, la genética inversa es un conjunto de estrategias que permiten determinar la función de un gen mediante el estudio del fenotipo en individuos con alteraciones en la secuencia de dicho gen. Dos de los métodos de genética inversa más utilizados en plantas son la mutagénesis insercional con T-DNA y el silenciamiento génico, pero ambas se basan en la transformación genética y por tanto su aplicabilidad se reduce a un número limitado de especies (Alonso & Ecker 2006). Recientemente ha habido un auge en los métodos de edición de genes (“gene editing”) que permiten, potencialmente, introducir mutaciones puntuales en genes de interés de forma eficiente (Wood *et al.* 2011). Actualmente el sistema CRISPR/Cas9 es muy en plantas y consiste, brevemente, en la expresión transgénica de una enzima endonucleasa modificada de origen bacteriano que es guiada por una molécula de RNA y que corta una secuencia de DNA específica en un determinado nucleótido, de forma que las mutaciones son causadas cuando la maquinaria celular repara el DNA (Feng *et al.* 2013). En plantas ha sido aplicado en el estudio de una gran variedad de especies, incluyendo algunas de interés agronómico como maíz, trigo, arroz y tomate (Belhaj *et al.* 2015).

La transformación genética es posible en melón (Dong *et al.* 1991; Ayub *et al.* 1996; Bezirganoglu *et al.* 2014) pero es todavía un proceso largo y poco eficiente, así que decidimos utilizar la técnica de TILLING como primera opción para la validación del gen candidato *MELO3C015640*. El TILLING (“Targeted Induced Local Lesions IN Genomes”) consiste en la identificación de mutaciones en el gen de interés en poblaciones tratadas con un agente mutagénico (generalmente químico, como el EMS) y su análisis fenotípico (McCallum *et al.* 2000). La principal ventaja del TILLING sobre el resto de técnicas de genética inversa es que se puede utilizar prácticamente en cualquier especie vegetal independientemente del tamaño del genoma, el nivel de ploidía y el método de propagación (Kurowska *et al.* 2011). Además, las mutaciones producidas por TILLING son estables y no requieren transformación genética, por lo que resulta especialmente útil para su aplicación en especies sin un protocolo de transformación eficiente. La aleatoriedad con la que actúa el agente mutagénico supone una ventaja por la gran variedad de mutaciones potenciales que pueden generarse (sinónimas, no sinónimas o mutaciones en sitios donadores y aceptores de “splicing”) siendo posible la obtención de una serie alélica para el gen de interés. Sin embargo esto también supone un inconveniente ya que en ocasiones es necesaria una población de gran tamaño para encontrar la mutación deseada (Alonso & Ecker 2006).

El TILLING fue utilizado por primera vez en *Arabidopsis* (McCallum *et al.* 2000) y desde entonces ha sido aplicado en una gran variedad de organismos, incluyendo también animales. Aunque fue desarrollado inicialmente para su aplicación en genómica funcional, el TILLING está siendo utilizado como una herramienta para la mejora genética vegetal, evitando así las complicaciones derivadas de la legislación sobre organismos genéticamente modificados en la UE (Slade & Knauf 2005). Por tanto, la mayor proliferación de plataformas de TILLING ha ocurrido en especies cultivadas de alto interés agronómico

como legumbres, cereales, solanáceas, brasicáceas y cucurbitáceas (revisión por Kurowska *et al.* 2011).

En el caso del melón se han generado varias poblaciones de TILLING utilizando distintas variedades: “Noy Yizre’el” (cultivar de tipo “Galia”, grupo *cantalupensis*, Tadmor *et al.* 2007), “Harukei3” (cultivar de “Earl’s favourite”, grupo *cantalupensis*, Ezura & Fukino 2009), “CharMono” (cultivar tipo “Charentais”, grupo *cantalupensis*, Dahmani-Mardas *et al.* 2010) y PS (grupo *inodorus*, Gonzalez *et al.* 2011).

Dada la implicación del gen candidato en la maduración de tipo climatérica, se utilizó una población de TILLING desarrollada a partir de una variedad *cantalupensis* de melón para poder observar los cambios en el proceso de maduración producidos por las mutaciones en su secuencia. Si la población usada fuera no climatérica, el efecto de las mutaciones en el factor de transcripción NAC debería no afectar al fenotipo porque los frutos ya carecen del componente climatérico de la maduración. A través de una colaboración con el grupo del Dr. Abdelhafid Bendahmane (URGV- INRA, Evry, Francia) tuvimos acceso a la colección de TILLING en el fondo genético del melón climatérico “CharMono”, que ya ha sido utilizada para la confirmación de los genes *a* y *g*, responsables de la determinación sexual en melón (Boualem *et al.* 2008; Martin *et al.* 2009) y para la búsqueda de mutantes para genes relacionados con la maduración del fruto como *CmACO1* (Dahmani-Mardas *et al.* 2010).

4.3.2. Búsqueda de mutaciones en el gen candidato en la población de TILLING “CharMono”

Debido al tamaño del gen candidato *MELO3C016540*, se diseñaron dos amplicones (A1 y A2) para cubrir la longitud total de su ORF de 1.334 bp en el cribado de la población de mutantes de la forma más eficiente (Figura 4.3.1). El amplicón A1 permitió la búsqueda de mutantes en una región de 920 bp entre los nucleótidos -66 y el 854 incluyendo los dos primeros exones y parte del tercero, mientras que A2 cubrió completamente el tercer exón amplificando 807 bp entre las posiciones 648 y 1.455 (122 bp dentro del 3'-UTR). Durante una estancia en la Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV-INRA) entre los meses de marzo y abril de 2014 se cribaron aproximadamente 6.200 familias M2 de la población de TILLING “CharMono” y fueron identificadas 21 familias con 20 mutaciones en el gen candidato, pero tras descartar la familia 5388 quedaron un total de 20 familias con 17 mutaciones (Tabla 4.3.1).

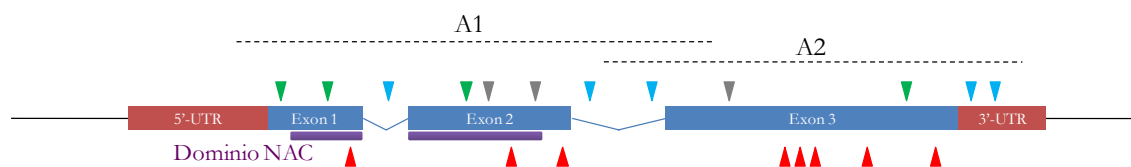


Figura 4.3.1: Estructura del gen *MELO3C016540* utilizado para la búsqueda de mutantes en la colección de TILLING “CharMono”. La figura representa las regiones amplificadas por A1 y A2 (líneas discontinuas) y la distribución de las 20 mutaciones encontradas originalmente. Las cajas rojas representan regiones no traducidas (UTR), las cajas azules las regiones exónicas y las líneas azules los intrones. El dominio NAC está señalado con una línea de color morado sobre los exones 1 y 2. Los triángulos rojos representan mutaciones no sinónimas, los triángulos verdes mutaciones sinónimas y los triángulos azules mutaciones en regiones no codificantes. Los triángulos grises indican las mutaciones descartadas.

Tabla 4.3.1: Listado de las familias M2 con mutaciones identificadas en el gen *MELO3C016540*. Se indica el amplicón en el que fueron detectadas las mutaciones durante el cribado de la población de TILLING así como la posición del nucleótido afectado y su situación en la estructura del gen. También se detalla la sustitución aminoacídica y la predicción del efecto sobre la función proteica según PROVEAN.

¹: familia descartada.

², ³ y ⁴: parejas de familias con mutaciones idénticas.

⁵: mutaciones probablemente no causadas por EMS.

Familia M2	Amplicón	Mutación	Región	Cambio AA	Efecto
4831	A1	G36A	Exón 1	Q12Q	-
82	A1	G147A	Exón 1	E49E	-
246	A1	G175A	Exón 1	E59K	Mutación deletérea
5970	A1	G265A	Intrón 1	-	-
1301	A1	G371A	Exón 2	G94G	-
5388 ¹	A1	T411G ⁵	Exón 2	S108A	-
432	A1	C475T	Exón 2	P129L	Mutación deletérea
5388 ¹	A1	A533T ⁵	Exón 2	P148P	-
2923 ²	A1	C580T	Exón 2	S164F	Mutación deletérea
228 ²	A1	C580T	Exón 2	S164F	Mutación deletérea
1784	A1	C634T	Intrón 2	-	-
1725	A1	C724T	Intrón 2	-	-
5388 ¹	A2	A978G ⁵	Exón 3	N236S	-
4933	A2	C1014T	Exón 3	A248V	Mutación neutral
3717	A2	C1038T	Exón 3	S256F	Mutación neutral
2503	A2	G1058A	Exón 3	D263N	Mutación neutral
4321 ³	A2	C1169T	Exón 3	L300F	Mutación neutral
4978 ³	A2	C1169T	Exón 3	L300F	Mutación neutral
244	A2	C1264T	Exón 3	V331V	-
502 ⁴	A2	C1296T	Exón 3	P342L	Mutación neutral
503 ⁴	A2	C1296T	Exón 3	P342L	Mutación neutral
5264	A2	C1307T	3'-UTR	-	-
317	A2	G1337A	3'-UTR	-	-

La familia 5388 fue descartada porque presentaba tres mutaciones (T411G, A533T y A978G) que no se corresponden con los cambios de tipo G:C a A:T que son los esperados tras el tratamiento con el agente mutagénico EMS. Además, las tres mutaciones se corresponden con tres SNPs (G411T, T533A y G979A, Tabla 4.2.1) encontrados entre la mayoría de las variedades *inodorus* y *cantalupensis* en el apartado 4.2.4 de esta tesis, por lo que creemos que se trata de una contaminación durante la construcción de la población de TILLING probablemente originada durante la propagación de esta familia. Cabe mencionar que la diferencia de un nucleótido entre la nomenclatura de la mutación A978G y del SNP G979A se debe a que en este apartado se ha utilizado como referencia la secuencia del parental “Charentais Mono”, que presenta un desfase debido a la delección de una sola base en el segundo intrón (denominada INDEL+743 en la Tabla 4.2.1) en esta variedad respecto a la secuencia del genoma del melón (v3.5.1) utilizada como referencia para nombrar el SNP en 4.2.1. Finalmente, descartando la familia 5388, contamos con un total de 20 familias M2 que representan 17 mutaciones únicas o alelos del gen, lo que supone una frecuencia de una mutación por cada 630 Kb, calculada según Greene *et al.* (2003). La distribución de las mutaciones, mostrada en la Figura 4.3.1, es uniforme a lo largo de la secuencia y encontramos 12 en los exones (70% de las mutaciones totales), 3 en

los intrones (18%) y 2 en el 3'-UTR (12%). En la figura también se muestran las mutaciones de la familia 5388, descartada de este estudio, mediante flechas de color gris. El 67% de las mutaciones en la secuencia codificante producen un cambio no sinónimo (8 mutaciones) y el resto son silenciosas o sinónimas (4 mutaciones). A pesar del número relativamente alto de mutantes identificados, no encontramos ninguna mutación sin sentido ni en sitios donadores o aceptores de “splicing”.

Antes de la evaluación fenotípica de las familias con mutaciones sinónimas, realizamos una caracterización a nivel de secuencia para tratar de predecir la importancia de las sustituciones aminoacídicas sobre la función proteica utilizando herramientas bioinformáticas. Por un lado estudiamos la posición de los aminoácidos afectados respecto a los motivos conservados en el extremo N-terminal, encontrando tres sustituciones entre los residuos 15 y 178, que es el intervalo correspondiente al dominio NAC. Las sustituciones E59K y P129L se encuentran dentro de los subdominios B y D respectivamente, mientras que el cambio S164F se encuentra a tan solo dos residuos del subdominio E (Figura 4.3.2). El cambio P129L es especialmente interesante porque la prolina 129 se encuentra muy conservada entre proteínas NAC independientemente de su función biológica y especie (Figura 4.3.3). Por otro lado utilizamos la herramienta PROVEAN para predecir el efecto de las sustituciones en función del nivel de conservación de cada aminoácido en proteínas homólogas presentes en bases de datos. De nuevo encontramos que las mutaciones E59K, P129L y S164F podrían tener un efecto deletéreo sobre la función proteica (Tabla 4.3.1).

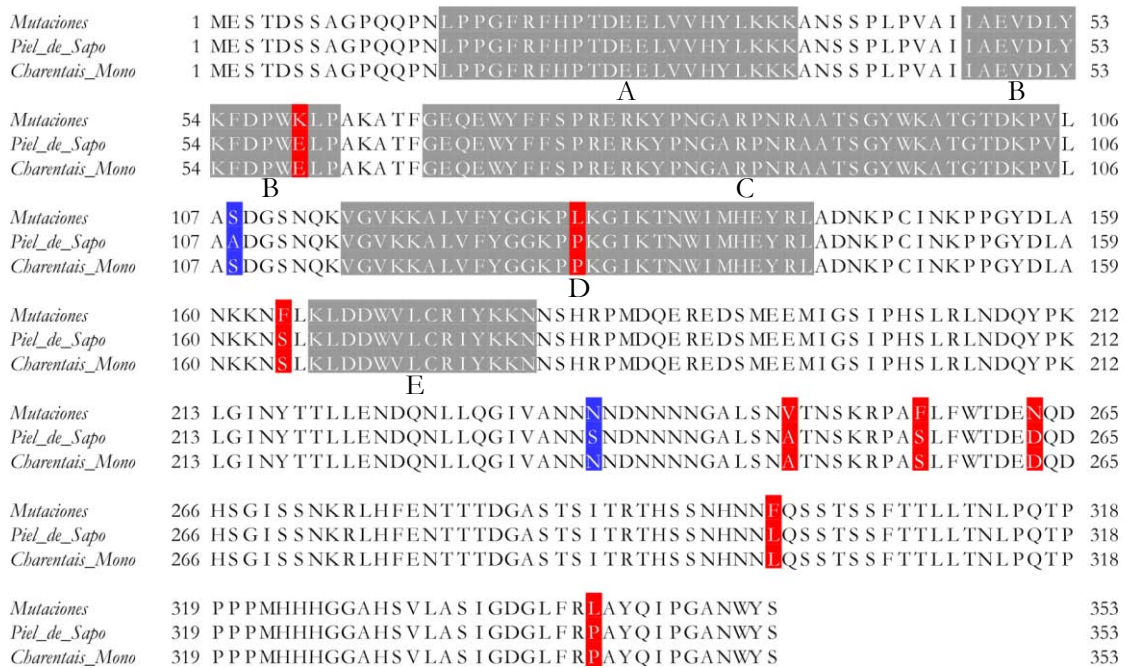


Figura 4.3.2: Posición de las mutaciones detectadas en la población TILLING en la secuencia proteica de *MELO3C016540*. Alineamiento construido con el algoritmo ClustalO y representado por Jalview a partir de las secuencias de “Piel de Sapo”, “Charentais Mono” y la secuencia artificial “Mutaciones” que aglutina todas las mutaciones no sinónimas (rojo). Los residuos señalados en azul son polimorfismos entre “Piel de Sapo” y “Charentais Mono”, también presentes en la familia 5388. Las zonas de color gris señalan las regiones conservadas del dominio NAC (subdominios A-E).

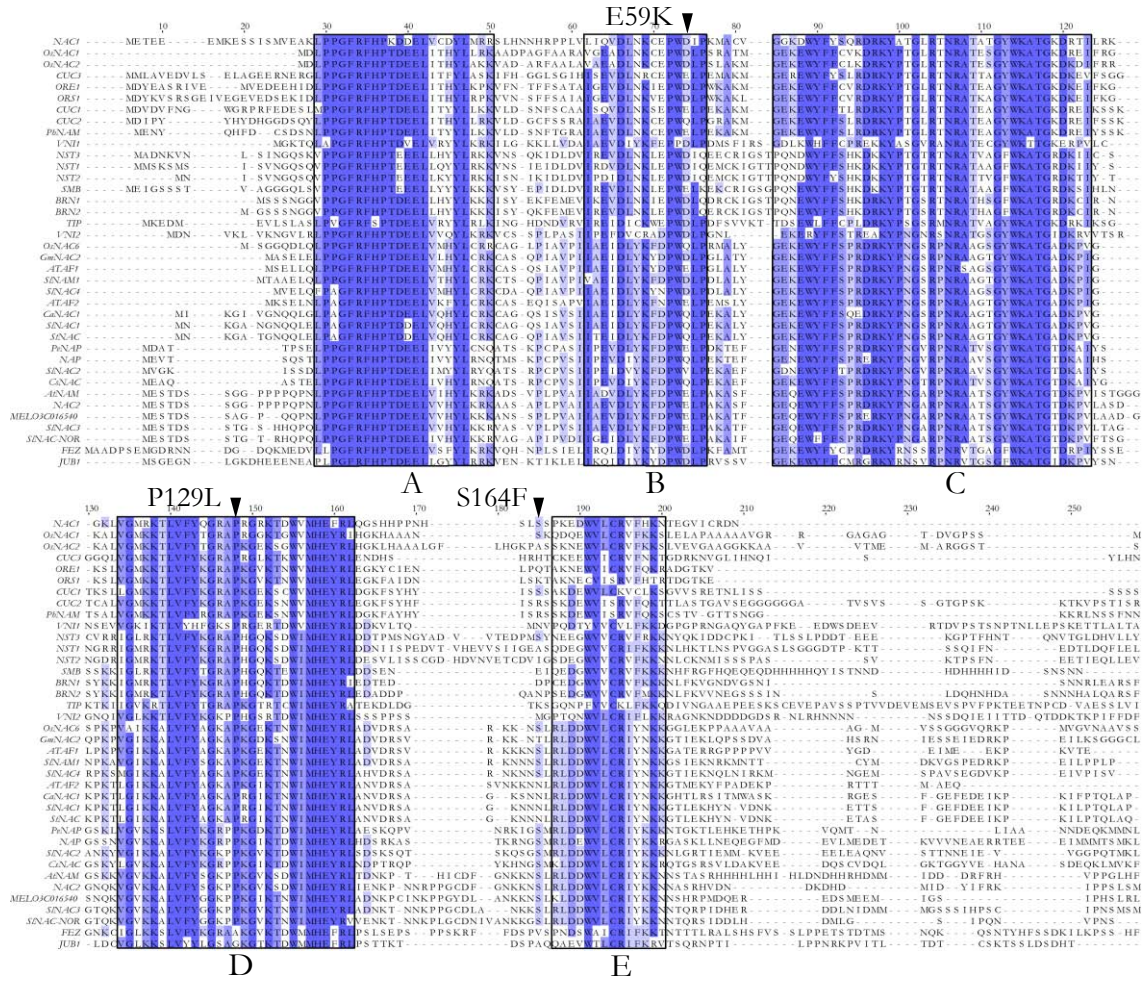


Figura 4.3.3: Posición de las sustituciones E59K, P129L y S164F respecto al dominio conservado NAC en *MELO3C016540*. Alineamiento realizado con el algoritmo ClustalO y representado por Jalview a partir de 37 secuencias de proteínas NAC de diversas especies. Las flechas negras señalan los aminoácidos afectados por los cambios de aminoácido. El sombreado azul indica un nivel de conservación superior al 75% y las localizaciones de los cinco subdominios NAC (A-E) están delimitadas por cajas negras. Los prefijos en el nombre de las secuencias indican la especie de origen: Sl: *S. lycopersicum*; Os: *O. sativa*; Gm: *G. max*; Ca: *C. annuum*; St: *S. tuberosum*; Cs: *C. sinensis*; Ph: *P. hybrida* y Pv: *P. vulgaris*. Las proteínas de *Arabidopsis* no tienen prefijo a excepción de AtNAM.

4.3.3. Caracterización fenotípica de los mutantes

Para estudiar el efecto de las mutaciones inducidas en el gen candidato sobre la maduración del fruto de melón, las familias que contenían los 8 mutantes con sustituciones aminoacídicas fueron fenotipadas durante las campañas de verano de 2014 y 2015. De las familias con mutaciones duplicadas se eligió al azar un representante (2923 y 4321 sobre 228 y 2978 respectivamente) excepto para la mutación C1296T de la que se eligieron ambas familias (502 y 503) debido a la baja tasa de germinación observada por el URGV-INRA en estudios anteriores. Obtuvimos semillas de las 9 familias seleccionadas (Tabla 4.3.2) del banco de germoplasma del INRA, recibiendo entre 20 y 26 semillas por cada familia M2. Para poder realizar un fenotipado durante el verano de 2014, se germinaron todas ellas durante el mes de junio añadiendo además semillas del genotipo parental “Charentais Mono” para ser utilizadas como control. La tasa de germinación fue alta para la mayor parte de las familias (superior al 80% para 6 de ellas) aunque solamente germinaron el 50%

de la familia 432, el 40% de la 502 y el 20% de la 503. El promedio de semillas germinadas por familia fue 15, aunque los números varían entre 26 (familia 4321) y 4 (familia 503).

Aproximadamente 2 semanas después de la germinación se realizó una extracción de DNA de la primera hoja de cada planta para su genotipado mediante secuenciación, tras la que se asignó a cada individuo un genotipo en función de la presencia del alelo mutado o no mutado del gen candidato. A partir de aquí se utiliza la abreviatura M para hacer referencia a los individuos homocigotos para el alelo mutado, W a los homocigotos para el alelo no mutado o salvaje y H a los heterocigotos con ambos alelos. La distribución de los genotipos muestra una distorsión de la segregación esperada (1/4 M, 1/4 W y 1/2 H) en algunas familias como 3717, 2503, 4321, 502 y 503 por causas desconocidas, aunque podría deberse a la existencia de mutaciones letales en genes necesarios para la germinación o para el desarrollo de la planta que estuvieran ligados a *MELO3C016540* o a errores durante el genotipado. Se eligieron todas aquellas plantas homocigotas (tanto para el alelo mutado como para el alelo salvaje) para su fenotipado en los invernaderos de Torre Marimón, excepto en el caso de la familia 4321 donde no se encontraron homocigotos M y se seleccionaron 5 plantas H. Como para la mayoría de las familias se obtuvieron menos de 5 plantas homocigotas M o W se añadieron individuos heterocigotos para obtener semillas y propagar la familia. En total se cultivaron 89 plantas M2 y 8 “Charentais Mono” que fueron autopolinizadas durante el mes de agosto produciendo un total de 78 frutos.

Para el fenotipado del fruto utilizamos el tiempo de dehiscencia, el color del fruto en el momento de cosecha y el aroma como marcadores fenotípicos tal y como se indica en Material y Métodos (ap. 3.3). En la temporada de 2014, y de forma inesperada, casi una tercera parte de los frutos se vio afectado por un hongo del que no se pudo determinar el origen ni aplicar un tratamiento efectivo y que alteró el fenotipado de las plantas infectadas. El alcance de la infección varió entre familias, siendo las más afectadas 4933 (3 frutos sanos de 9 totales), 3717 (4 de 10), 2503 (5 de 10) y 503 (2 de 4) (Tabla 4.3.2). Una gran parte de los frutos infectados tuvieron que ser cortados prematuramente cuando el hongo amenazaba la viabilidad de las semillas, fundamental para la propagación de las familias, por lo que en ausencia del tiempo de dehiscencia se evaluó el estado de desarrollo de la capa de abscisión en el momento de ser cortados.

Basándonos en la presencia de aromas característicos del fruto maduro, el cambio de color externo y el desarrollo de una capa de abscisión, todas las plantas de esta población fueron clasificadas como climatericas. Todos los frutos no infectados por el hongo fueron dehiscentes excepto 2503.1, 2503.2 y 502.4b (cortados por la aparición de fisuras en el fruto), 2503.9 (cortado por error) y 4933.9, mutante en homocigosis para el gen candidato, que fue cortado tras 73 días en la planta. Los dos únicos frutos que no viraron de verde a amarillo fueron el mutante 4933.9 y el parental Char.2, siendo este último descartado para el análisis por presentar anomalías en el proceso de maduración posiblemente debidas a la infección del hongo sobre la planta. Los datos fenotípicos completos se encuentran recogidos en la Tabla A.4.3.1 en el Anexo.

La caracterización fenotípica de la población de mutantes trata de distinguir diferentes grados de climaterio, por lo que utilizamos los tiempos de dehiscencia como medida representativa del proceso climaterico ya que a mayor intensidad de la maduración menor es el tiempo transcurrido entre la polinización y la dehiscencia del fruto debido un adelanto o a un aumento de la síntesis de etileno. Para estudiar el efecto de las mutaciones sobre la maduración comparamos los tiempos de dehiscencia a dos niveles: (1) dentro de cada familia, entre los individuos M y W; y (2) entre cada familia y el control “Charentais

Tabla 4.3.2: Familias M2 cultivadas y fenotipadas en la campaña de verano de 2014. W: homocigoto para el alelo no mutado, M: homocigoto para el alelo mutado, H: heterocigoto. D.E.: desviación estándar; N.D.: No Disponible. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre promedios según una prueba t de Student. Nivel de significación: * : p-valor < 0,05; ** : p-valor < 0,01.

Familia	Cambio AA	Germinación (n° semillas)			Cultivo (n° de plantas)			Cosecha de frutos (sanos/totales)			Tiempo hasta dehiscencia promedio \pm DE (días)			Diferencia de promedios (días)						
		W	M	H	Total (%)	W	M	H	Total	W	M	H	Total	W	M	H	M-W	M-H	H-W	
246	E59K	6	3	12	21 (100)	6	3	2	11	4/5	3/3	2/2	9/10	46,3 \pm 2,9	52,7 \pm 3,1	50 \pm 1,4	6,4 *	-	3,7	
432	P129L	1	3	6	10 (50)	1	3	5	9	1/1	3/3	2/2	6/6	42 \pm ND	45,3 \pm 1,5	45 \pm 4,2	3,3	-	3	
2923	S164F	5	5	9	19 (95)	5	5	0	10	4/5	5/5	0/0	9/10	47 \pm 3,8	44,6 \pm 3,6	-	-2,4	-	-	
4933	A248V	4	6	8	18 (90)	4	6	1	11	1/2	1/6	1/1	3/9	40 \pm ND	73 \pm ND	63 \pm ND	33	-	23	
3717	S256F	7	5	5	17 (85)	7	5	0	12	2/4	2/6	0/0	4/10	39,5 \pm 0,7	49,5 \pm 6,4	-	10	-		
2503	D263N	8	2	6	16 (80)	8	2	4	14	4/6	0/2	1/2	5/10	43,5 \pm 3,9	-	48 \pm ND	-	-	4,5	
4321	L300F	21	0	5	26 (100)	5	0	5	10	2/4	0/0	4/5	6/9	44,5 \pm 3,5	-	46,3 \pm 3	-	-	1,8	
502	P342L	4	3	1	8 (40)	4	3	1	8	3/3	2/3	1/1	6/7	43,3 \pm 3,2	55 \pm 1,4	51 \pm ND	11,7 **	-	7,7	
503	P342L	2	0	2	4 (20)	2	0	2	4	1/2	0/0	0/2	1/4	57 \pm ND	-	-	-	-	-	
Char. Mono	-	8	0	0	8 (80)	8	0	0	8	0/8	0	0	0/8	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.3.3: Familias M2 cultivadas y fenotipadas en la campaña de verano de 2015. W: homocigoto para el alelo no mutado, M: homocigoto para el alelo mutado. D.E.: desviación estándar; N.D.: No Disponible. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre promedios según una prueba t de Student.

Nivel de significación: * : p-valor < 0,05; ** : p-valor < 0,01; *** : p-valor < 0,001

Familia	Sustitución	Número de frutos (sanos/totales)			Tiempo de cambio de color promedio \pm DE (días)			Diferencia de promedios para el cambio de color (días)			Tiempo de dehiscencia promedio \pm DE (días)			Diferencia de promedios de dehiscencia (días)		
		W	M	Total	W	M	Total	M-W	W-Char. Mono	M-Char. Mono	W	M	Total	M-W	W-Char. Mono	M-Char. Mono
246	E59K	10/10	10/10	20/20	39 \pm 1,8	46,2 \pm 1,8	7,2 ***	0,4	7,6 ***	46,4 \pm 9,7	51,9 \pm 4,6	5,5	6,1	0,6		
432	P129L	7/7	8/9	15/16	37,4 \pm 1,1	43 \pm 1,7	5,6 ***	-1,1	4,4 ***	47 \pm 10	54,9 \pm 5,6	7,9	9,1	1,2		
4933	A248V	6/10	6/8	12/18	38,7 \pm 1,6	39,8 \pm 2,6	1,1	0,1	1,2	44,5 \pm 6,8	44,5 \pm 3,5	0	-1,3	-1,3		
3717	S256F	2/9	2/9	4/18	36,1 \pm 1,8	359 \pm 1,8	-0,2	-2,4 *	-2,7 *	43 \pm 5,2	44 \pm 3,5	1	-1,8	-2,8		
2503	D263N	4/10	4/10	8/20	39 \pm 1,9	40,2 \pm 1,6	1,2	0,4	1,6	-	55,5 \pm 14,9	-	9,7	-		
502	P342L	5/7	11/18	16/25	39,7 \pm 1,7	41,1 \pm 2,3	1,4	1,2	2,6 *	44 \pm 3,1	46,4 \pm 3,9	2,4	0,7	-1,8		
Char. Mono	-	17/18	0	17/18	386 \pm 2,3	-	-	-	-	45,8 \pm 6,8	-	-	-	-		

Mono”. Para evitar una distorsión de los resultados a consecuencia de la infección fúngica, decidimos excluir 21 individuos que mostraron síntomas severos de infección. Como resultado de la criba, todos los frutos con la mutación en homocigosis de las familias 2503 fueron descartados por lo que no pudo realizarse la comparación entre M y W dentro de esta familia (Tabla 4.3.2). Además, todos los frutos control “CharMono” fueron descartados, imposibilitando la comparación de medias entre cada familia y el parental de la población. Del resto de familias, cinco (246, 432, 4933, 3717 y 502) mostraron un incremento entre el promedio del tiempo de dehiscencia en los frutos M respecto a los frutos W. La variabilidad (desviación estándar) de este incremento fue muy alta, encontrándose diferencias desde 3,3 días en la familia 4321 hasta 33 en la 4933 (Tabla 4.3.2). Los frutos heterocigotos mostraron un fenotipo intermedio, con un tiempo de dehiscencia más prolongado que los frutos W pero más corto que los M. De forma inesperada, los frutos M de la familia 2923 mostraron un comportamiento inverso adelantando el tiempo de dehiscencia respecto a los W un promedio de 2,4 días. En la Figura 4.3.4 se representan gráficamente las diferencias en los tiempos de dehiscencia de cada una de las familias. El bajo número de frutos supuso un problema a la hora de estudiar el nivel de significación de estas diferencias, aunque el aumento del tiempo de dehiscencia en los frutos M respecto a los W en las familias 246 y 502 fue significativo en una prueba t de Student. Las diferencias de 6,4 días en la familia 246 y 11,7 en 502 tuvieron un p-valor de 0,04 y 0,01 respectivamente. Estos resultados, aunque prometedores, necesitaban ser validados mediante un nuevo fenotipado en el verano de 2015 aumentando el número de plantas de cada familia e incluyendo “Charentais Mono”.

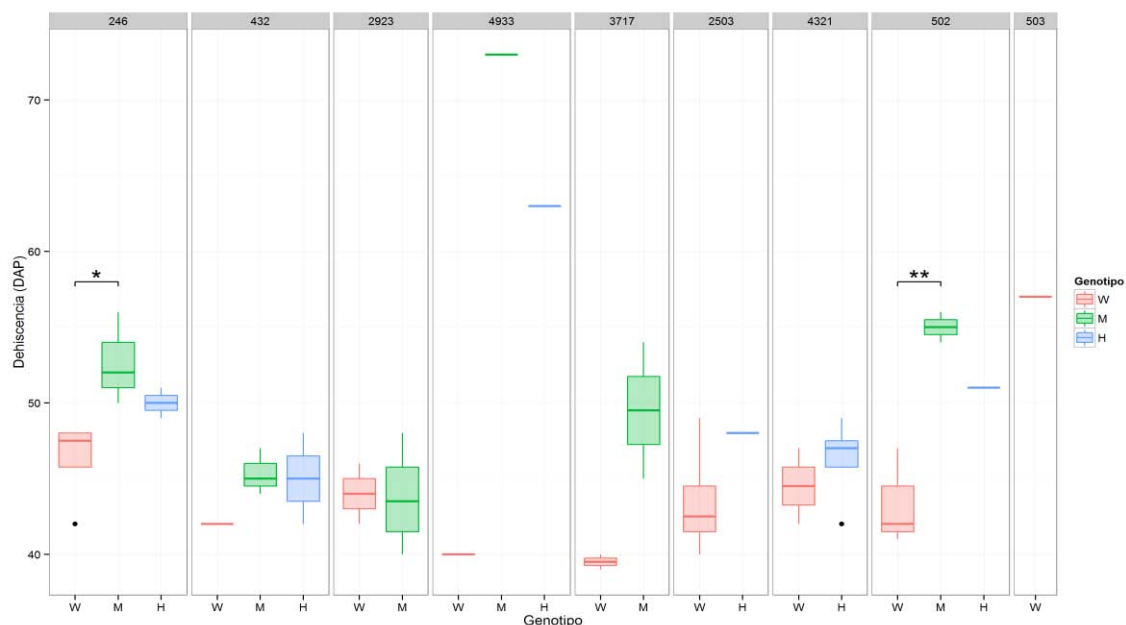


Figura 4.3.4: Diferencias fenotípicas en las familias M2 durante la temporada de 2014. Se representan los días transcurridos entre la polinización y dehiscencia (DAP) por familia. W: homocigoto para el alelo no mutado (rojo); M: homocigoto para el alelo mutado (verde); y H: heterocigoto (azul). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos indicados por la llave según una prueba t de Student. Nivel de significación: *: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01.

En la campaña de 2015 el sistema de fenotipado fue modificado con el objetivo de aprovechar al máximo los indicadores de maduración que varían a lo largo del proceso y no basar la caracterización de las familias de mutantes en el análisis del fruto una vez

cosechado. Para ello incluimos el viraje del color externo del fruto de verde a amarillo medido en días después de la polinización como testigo del proceso de maduración. Según nuestras observaciones durante la campaña de 2014, el cambio de color podría ser una medida más precisa que la dehiscencia ya que hubo frutos maduros que permanecieron unidos a la planta durante mucho tiempo después del viraje mientras que en otros casos ambos eventos fueron casi simultáneos. Además, la línea control “Charentais Mono” no siempre fue dehiscente en nuestras condiciones de cultivo por lo que creemos que este parámetro no es fiable como medida del fenotipo. Por último, muchos melones ya maduros pero no dehiscentes comenzaron a sobremadurar en la planta favoreciendo las infecciones fúngicas y comprometiendo las condiciones fitosanitarias del invernadero.

En el verano de 2015 fueron analizadas seis familias de mutantes que mostraron las mayores diferencias entre frutos W y M en la temporada anterior: 246, 432, 4933, 3717, 2503 y 502, utilizando de nuevo el parental “Charentais Mono” como control. Se obtuvieron entre 7 y 18 individuos homocigotos (tanto W como M) para cada una de las familias, que fueron cultivados y genotipados como en el año 2014, y fenotipados como se ha descrito anteriormente. Todos los datos genotípicos y fenotípicos de la campaña 2015 se encuentran en la Tabla A.3.4.2 del Anexo. De nuevo observamos la presencia de un hongo que afectó al 35% de los frutos, siendo las más afectadas las familias 4933 (56%), 3717 (78%) y 2503 (60%) (Tabla 4.3.3). La infección se manifestó después del viraje de color permitiendo el fenotipado de todas las familias para este carácter.

Utilizando el tiempo entre polinización y cambio de color, encontramos diferencias significativas entre frutos W y M en dos familias: 246 (p -valor = $4,4 \times 10^{-8}$) y 432 (p -valor = $1,6 \times 10^{-6}$) (Figura 4.3.5). En la familia 246 los frutos M tardaron en promedio 7,2 días más en virar de verde a amarillo respecto a los frutos W, y en la familia 432 esta diferencia fue de 5,6 días, tal y como se describe en la Tabla 4.3.3. En la misma tabla se puede comprobar como para el resto de las familias la diferencia M-W fue menor a los 3 días. Cabe destacar la uniformidad en la maduración de los frutos, que se refleja en una baja desviación estándar entre los individuos del mismo genotipo y familia (máximo 2,6 días en los frutos M de la familia 4933). Para estudiar las diferencias en el cambio de color entre cada familia y el parental se realizó una prueba de Dunnett utilizando “Charentais Mono” como control. Las diferencias respecto al parental fueron muy reducidas en los frutos W y solamente los frutos sin mutar familia de la 3717 resultaron estadísticamente distintos del control con una diferencia de 2,4 días (p -valor < 0,05). Del mismo modo, los frutos M de esta misma familia también se diferenciaron estadísticamente del parental por un tiempo muy similar: 2,7 días (p -valor < 0,05). Del resto de familias, las mayores diferencias fueron 7,6 días (familia 246) y 4,4 días (familia 432), siendo ambas estadísticamente diferentes del parental (p -valor < 0,001 en las dos). Por último cabe destacar la familia 502 que, aunque la diferencia entre los frutos W y M no es estadísticamente significativa, sí lo es la diferencia entre los frutos M y el parental (p -valor < 0,05). Respecto al tiempo de dehiscencia, se observa un aumento entre frutos W y M en algunas familias como 246, 432 y 502, aunque también hay una alta desviación estándar que llega a alcanzar casi los 15 días (Tabla 4.3.3). Utilizando los datos recogidos para este carácter fenotípico en la temporada 2015 no encontramos diferencias significativas ni dentro de las familias ni entre las familias y el parental.

4.3. Validación del gen candidato para *eth6.3* por TILLING

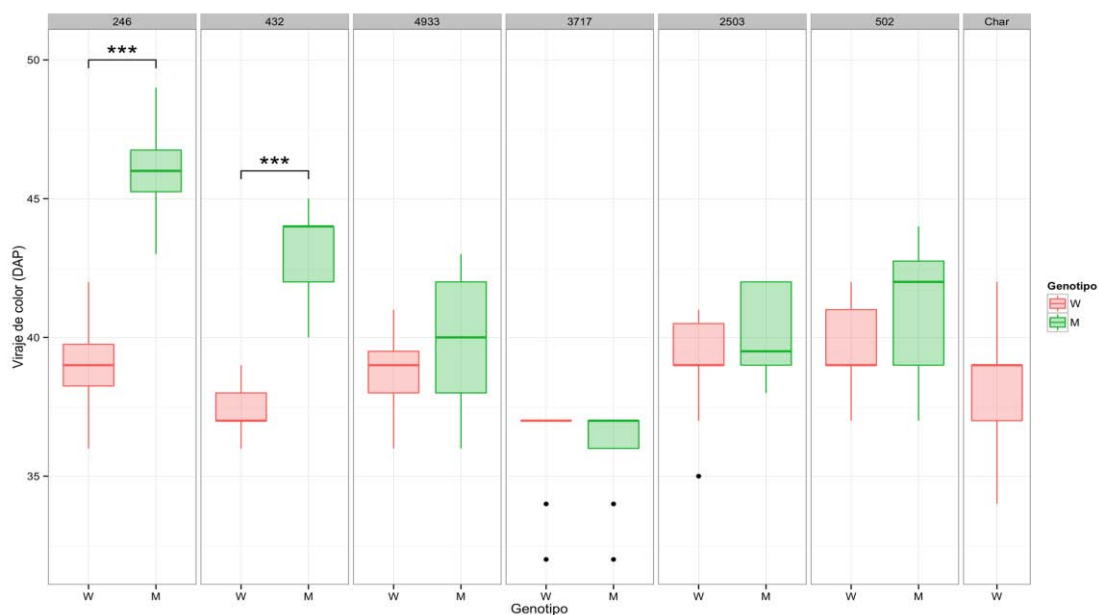


Figura 4.3.5: Diferencias fenotípicas en las familias M2 durante la temporada de 2015. Se representan los días transcurridos entre la polinización y el viraje de color (DAP) por familia. W: homocigoto para el alelo no mutado (rojo); M: homocigoto para el alelo mutado (verde); y H: heterocigoto (azul). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos indicados por la llave según una prueba t de Student.

Nivel de significación: ***: p-valor < 0,001.

4.3.4. Discusión

Durante el cribado de la población “Charentais Mono” se han encontrado mutaciones en la secuencia del gen candidato con una frecuencia de 1/630 Kb, que es muy similar a las descritas anteriormente en esta población: 1/573 Kb (Dahmani-Mardas *et al.* 2010) y 1/401 Kb (Gonzalez *et al.* 2011). Tal y como se discutirá más adelante, la población de TILLING utilizada en este capítulo ya había sido utilizada para buscar mutaciones en este mismo gen, encontrándose 9 mutantes (frecuencia 1/468 Kb). A modo de comparación, en la población de TILLING desarrollada a partir de la variedad PS la frecuencia fue de 1/1,5 Mb, aproximadamente 3 veces inferior (Gonzalez *et al.* 2011).

Uno de los problemas al que nos enfrentamos durante la caracterización de los mutantes en la temporada 2014 fue el método de fenotipado, basado en la experiencia previa adquirida durante el clonaje posicional de *eth6.3*, que consistió en medir el tiempo entre la polinización y la dehiscencia. Aunque fuimos capaces de observar diferencias entre frutos M y W durante la maduración, este marcador fenotípico no era representativo del proceso de maduración y las mediciones no fueron consistentes ni fiables. Además, cabe destacar que en nuestras condiciones de cultivo los frutos del parental “Charentais Mono” no siempre fueron dehiscentes haciendo de la dehiscencia un mal carácter fenotípico. Por tanto, en la temporada 2015 utilizamos el tiempo transcurrido entre la polinización y el viraje de color como parámetro representativo del proceso, detectando diferencias entre frutos M y W en dos familias (Figura 4.3.5). Mediciones de la producción de etileno en una colección de RILs procedentes del cruzamiento PS x “Védrantais” indican que el viraje de color externo tiene lugar durante los tres días siguientes al pico de la hormona de forma consistente y que la dehiscencia puede estar desligada de la producción de etileno (Pereira

et al., sin publicar), tal y como había sido observado anteriormente en una población del mismo tipo pero con distintos parentales (“Védrantais” x SC, Perin *et al.* 2002a) Por tanto, creemos que el cambio de color externo es un marcador fenotípico más apropiado para representar la maduración del fruto que la dehiscencia, ya que responde rápidamente a la producción del pico de etileno.

Además de por el método de fenotipado utilizado, la temporada 2014 estuvo marcada por una infección fúngica que afectó a una parte importante de la población (34% de los frutos) que el personal encargado del invernadero no pudo identificar ni tratar adecuadamente. Según lo que pudimos observar, la infección comenzaba en el interior de los frutos maduros y se iba extendiendo hacia fuera, de forma que cuando los primeros síntomas fueron visibles en el exterior, el interior ya mostraba un excesivo reblandecimiento y un desagradable olor. En la temporada 2015 la infección alcanzó un porcentaje similar (35%) pero en este caso todos los frutos ya habían virado de color y pudieron ser fenotipados.

A pesar de que el tiempo de dehiscencia no fue un marcador fenotípico adecuado para la caracterización de los mutantes, en la temporada 2014 dos familias mostraron diferencias significativas entre frutos M y W: 246 y 502. El número de réplicas fue muy bajo (entre 2 y 5 por genotipo y familia) y los resultados no fueron reproducibles al año siguiente utilizando la dehiscencia como parámetro. En la temporada 2015 y utilizando el tiempo de viraje del color externo del fruto encontramos diferencias significativas entre frutos M y W de las familias 246 y 432. Además los frutos M también son estadísticamente distintos al parental de la población “Charentais Mono” mientras que los W no lo son, indicando que las diferencias observadas se deben a la mutación en el gen candidato y no al fondo genético de las dos familias. El efecto de las sustituciones aminoacídicas que provocan estas mutaciones (E59K la familia 246 y P129L la familia 432) ha sido predicho como deletéreo ya que afecta a dos aminoácidos muy conservados dentro de los subdominios D y E, respectivamente, del dominio NAC de *MELO3C016540*. Estos dos subdominios son muy importantes para un factor de transcripción ya que contienen el dominio de unión a DNA y secuencias putativas de localización nuclear (Puranik *et al.* 2012), por lo que la mutación P129L, que afecta a una prolina que está presente en 35 de las 37 proteínas NAC del alineamiento de la Figura 4.3.3 es especialmente interesante.

Debido a su homología con el factor de transcripción *SNAC-NOR* de tomate (ver cap. 4.2) se buscaron mutantes en *MELO3C016540* en esta misma población de TILLING entre los años 2007-2010 en el contexto del proyecto MELRIP (“Understanding the climacteric vs non-climacteric fruit ripening mechanisms in melon using transcriptomic, metabolomic and reverse genetic approaches”) para estudiar su posible implicación en la maduración del fruto. De las nueve familias de mutantes detectadas (Dahmani-Mardas *et al.* 2010) se fenotiparon cuatro con mutaciones sin sentido entre las que se encontraban las familias 246, 2923 y 2503 identificadas y estudiadas en este capítulo. De las cuatro familias analizadas, los frutos M de la familia 246 mostraron un retraso significativo en el tiempo de maduración respecto al control sin mutar en cuatro localizaciones independientes, pero estos resultados no fueron incluidos en la publicación en la que se describe la población, que se centra en los mutantes en el gen *CmACO1* (Dahmani-Mardas *et al.* 2010).

Finalmente, por las razones anteriormente expuestas creemos que los resultados de la caracterización fenotípica de las familias 246 y 432 confirman que *MELO3C016540* es el gen responsable del QTL *eth6.3*. El retraso en el viraje de color en los frutos M de las respecto a los frutos W y respecto al parental “Charentais Mono” sugiere una alteración en la maduración climatérica. Dado que el cambio de color es un proceso íntimamente ligado

4.3. Validación del gen candidato para *eth6.3* por TILLING

a la biosíntesis de etileno, es probable que las diferencias observadas en estas familias se deban a cambios en la regulación de esta hormona que provocarían un retraso o una reducción en su biosíntesis. Sin embargo, tal y como hemos podido experimentar, es muy importante contar con un buen método de fenotipado y unas condiciones de cultivo óptimas para el estudio de un carácter complejo como la maduración del fruto.

4.4. Validación del gen candidato para *eth6.3* por RNAi.

4.4.1. Introducción.

En el capítulo anterior, después de la selección del gen *MELO3C016540* como candidato para el QTL *eth6.3*, utilizamos una colección de mutantes TILLING como primera estrategia para su validación funcional. Este capítulo es el comienzo de una segunda aproximación a su validación mediante silenciamiento génico que tiene como objetivo complementar los resultados obtenidos mediante el estudio de las familias de mutantes TILLING. Las dos estrategias de validación utilizadas en este proyecto de tesis pertenecen al conjunto de técnicas de genética inversa pero, al contrario del TILLING, la aplicación del silenciamiento génico precisa de transformación genética.

El silenciamiento génico mediado por RNA, también denominado silenciamiento génico post-transcripcional o RNA interferente (RNAi), consiste en la degradación específica de un mRNA mediante el uso de moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) (Figura 4.4.1). Cuando una molécula de dsRNA se forma en la célula, es reconocida por proteínas Dicer, que la fragmentan en trozos de aproximadamente 22 bp denominados siRNA (“small interfering RNA”). Estos fragmentos son incorporados en complejos RISC (“RNAi Silencing Complex”) que degradan aquellos mRNA que son complementarios al siRNA que está asociado con el complejo (Bernstein *et al.* 2001). La formación de dsRNA ocurre de forma natural en la mayoría de organismos eucariotas y el RNA interferente constituye un mecanismo de defensa frente a infecciones víricas y transposones (Waterhouse *et al.* 2001; Baulcombe 2004). Sin embargo, esta maquinaria celular puede ser utilizada en genómica para el estudio de la función génica induciendo la formación de dsRNA complementarios al gen de interés, que es silenciado de forma específica y que permite estudiar posteriormente las alteraciones en el fenotipo (Baulcombe 1999).

Uno de los métodos más utilizados históricamente para inducir la formación de dsRNA es a través de la producción de plantas transgénicas que expresen la secuencia completa del gen en antisentido para que la hibridación con su transcrito forme una molécula de doble cadena. Un estudio de este tipo relevante por su relación con la maduración del fruto es el silenciamiento del gen *CmACO1* en variedades climatéricas del grupo *cantalupensis* (Ayub *et al.* 1996). Los autores detectaron una disminución en la producción de la hormona en las líneas que silenciaban este gen, implicado en la síntesis de etileno, que fueron caracterizadas fenotípicamente permitiendo el estudio el tipo de regulación (dependiente o independiente de etileno) de los procesos de maduración en melón. En estas líneas transgénicas se observó una atenuación del componente climatérico (dependiente de etileno) como el cambio de color externo, el reblandecimiento de la pulpa y la producción de compuestos tipo éster aromáticos (Ayub *et al.* 1996; Guis *et al.* 1997; Bauchot *et al.* 1998).

Otro método para inducir el silenciamiento génico muy utilizado actualmente es la introducción en la célula vegetal de un transgén que exprese una molécula de RNA con regiones complementarias que hibridan entre sí formando una pequeña horquilla de RNA (hpRNA, Waterhouse *et al.* 1998). Las horquillas de RNA tienen una estructura tallo-bucle, siendo el tallo la región de doble cadena formada por las secuencias complementarias y el bucle la región de cadena simple que las separa. Al producirse la integración del transgén en el genoma de la planta, el silenciamiento es estable, heredable y específico. Sus principales desventajas son el silenciamiento no deseado de otros genes, especialmente en el caso de familias génicas con alta homología, y la gran variabilidad en el grado de silenciamiento que, sin embargo, permite estudiar el rango de efectos fenotípicos que producen los diferentes

niveles de expresión del gen de interés (Wesley *et al.* 2001; Jackson & Linsley 2004). En plantas, las horquillas de RNA han sido aplicadas en el silenciamiento de una gran variedad de genes en especies como *Arabidopsis*, tabaco, algodón, tomate y arroz, entre otras (Waterhouse & Helliwell 2003; Meli *et al.* 2010; Ali *et al.* 2013; Xie *et al.* 2014) y se han desarrollado herramientas genéticas, como el vector pKANNIBAL, para facilitar su construcción y manipulación (Wesley *et al.* 2001). En melón, el uso de hpRNA como inductor de silenciamiento génico se reduce al trabajo de (Rodríguez-Hernández *et al.* 2012) sobre la implicación del gen *Cm-eIF4E* en la resistencia a diversos virus y en el que describen un silenciamiento eficiente y específico en todas las plantas transformadas.

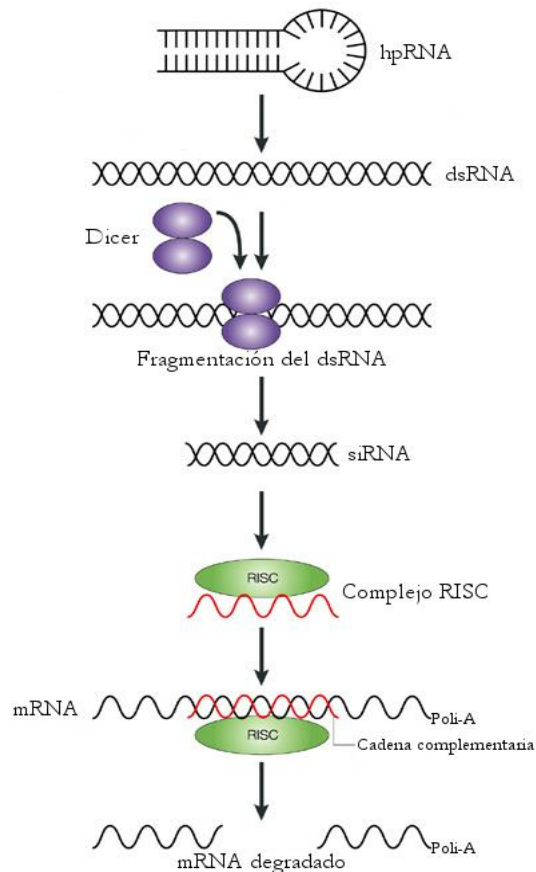


Figura 4.4.1: Modelo de silenciamiento génico mediado por RNA en plantas. Una horquilla de RNA (hpRNA) contiene una región de doble cadena (dsRNA) que es reconocida por proteínas Dicer, que la fragmentan en moléculas de 22 bp denominadas siRNA (“small interfering RNA”). Los complejos RISC (“RNAi silencing complex”) incorporan moléculas siRNA que guían la degradación de mRNA de secuencia complementaria, silenciando el gen objetivo. Modificado de Waterhouse and Helliwell (2003).

Este capítulo tiene como objetivo proveer de las herramientas necesarias para validar la implicación de *MELO3C016540* en la maduración climática de melón mediante la construcción de un hpRNA diseñado específicamente para su silenciamiento. El proceso de construcción puede ser dividido en dos fases: (1) el diseño y construcción del hpRNA y (2) la preparación del vector binario y transformación de *Agrobacterium*. Las construcciones obtenidas en este capítulo podrán ser utilizadas en la transformación de la línea climática GF40, portadora de alelos de SC en homocigosis del QTL *eth6.3*, para evaluar cómo el

grado de silenciamiento del gen candidato afecta al fenotipo climatérico. Aunque queda ya fuera de los objetivos de este trabajo, en proyectos futuros estas construcciones también podrían ser utilizadas en la línea GF31 (con *eth6.3* y también *eth3.5*) para estudiar la interacción entre ambos QTLs.

4.4.2. Diseño y construcción del hpRNA.

Tal y como se describió en el apartado 4.2.2 de esta tesis, *MELO3C016540* pertenece a la familia NAC de factores de transcripción de melón de la que encontramos 81 genes (92 transcritos putativos anotados) en el genoma de referencia. Dado el gran tamaño de la familia y la implicación de sus miembros en una gran variedad de procesos fisiológicos, es muy importante conseguir un silenciamiento lo más específico posible a través del diseño cuidadoso del hpRNA. Como el silenciamiento se hace a nivel de mRNA, exploramos la homología de las 92 transcritos putativos de la familia a través de un alineamiento múltiple de secuencias, calculando el porcentaje de conservación de cada base respecto al resto de transcritos. Los dos primeros exones, que codifican el dominio NAC, están altamente conservados así como los 100 bp anteriores al codón de inicio (en la región del 5'-UTR) mientras que el tercer exón presenta una conservación baja que va disminuyendo progresivamente hasta el final de la secuencia (Figura 4.4.2). Con una conservación promedio del 25%, los últimos 700 nucleótidos del transcrito de *MELO3C016540* son los más variables respecto al resto de miembros de la familia por lo que dirigimos el silenciamiento génico hacia una región de 200 bp entre las posiciones 1.003 y 1.203 del mRNA a la que denominamos 200-NAC. Mediante BLAST comprobamos que la secuencia es específica de nuestro gen candidato, pero que pequeñas fracciones de hasta 23 bp presentan homología con otras regiones del genoma de referencia (Tabla 4.4.1). La mayoría son zonas no codificantes y ninguno de los dos genes que presentan cierta homología de secuencia está anotado como miembro de la familia NAC, por lo que consideramos que esta región es óptima como diana de silenciamiento.

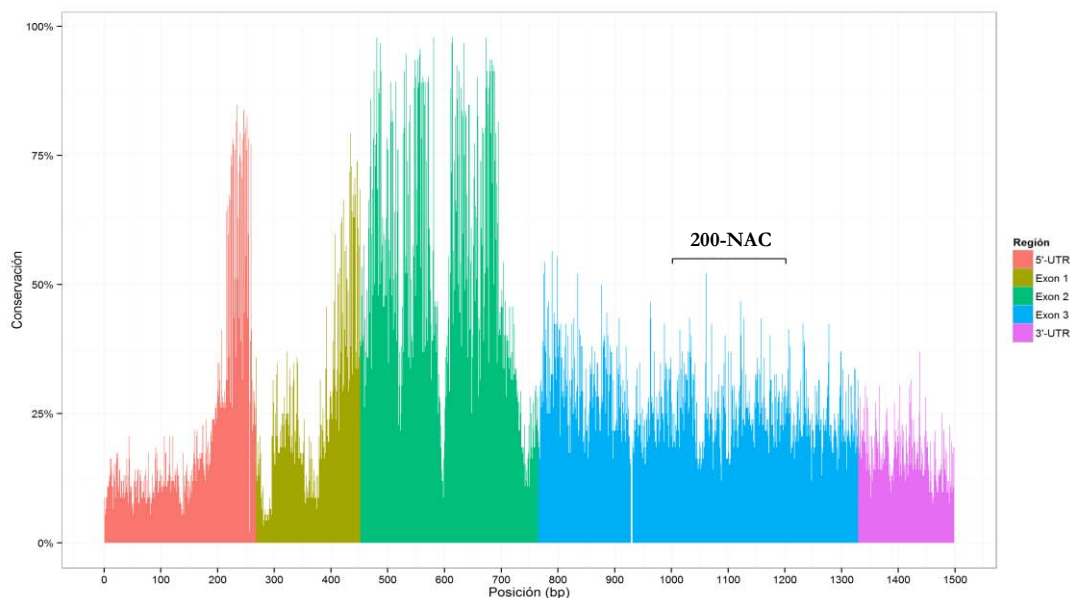


Figura 4.4.2: Selección de la diana de silenciamiento 200-NAC según la conservación de *MELO3C016540* respecto a la familia NAC de melón. Se representa la conservación por nucleótido del mRNA obtenida a través del alineamiento múltiple de las secuencias de las 92 isoformas pertenecientes a la familia NAC de melón, realizado con ClustalO. Conservación calculada con Jalview. La zona señalada con la horquilla representa el fragmento seleccionado como diana de silenciamiento (200-NAC).

Tabla 4.4.1: Regiones homólogas a la diana de silenciamiento 200-NAC en el genoma del melón. Resultados obtenidos mediante Blast 2.0.10 en Bioedit utilizando la versión 3.5.1 del genoma de referencia. Cr.: cromosoma.

Localización	Posición inicio (bp)	Posición final (bp)	Nº bases	Homología (%)	P-valor	Gen
Cr. 6	26.987.627	26.987.826	200	100	2×10^{-109}	MELO3C016540
Cr. 8	18.238.244	18.238.263	20	100	0,061	-
Cr. 5	16.332.222	16.332.241	20	100	0,061	-
Cr. 6	4.207.761	4.207.783	23	95,6	0,24	-
Cr. 9	23.278.595	23.278.617	23	95,6	0,24	-
Cr. 7	21.141.086	21.141.108	23	95,6	0,24	-
Cr. 4	10.655.325	10.655.347	23	95,6	0,24	-
Cr. 6	35.691.607	35.691.624	18	100	0,95	MELO3C013723
Cr. 6	17.489.374	17.489.391	18	100	0,95	-
Cr. 6	9.101.168	9.101.185	18	100	0,95	-
Cr. 5	16.716.112	16.716.129	18	100	0,95	-
Cr. 5	9.615.555	9.615.572	18	100	0,95	-
Cr. 9	9.315.523	9.315.540	18	100	0,95	-
Cr. 4	1.910.991	1.911.008	18	100	0,95	-
Cr. 12	10.863.841	10.863.858	18	100	0,95	-
Cr. 10	1.803.971	1.803.988	18	100	0,95	-
Cr. 3	5.919.832	5.919.849	18	100	0,95	-
Cr. 3	138.987	139.004	18	100	0,95	MELO3C008073
Cr. 2	21.369.716	21.369.733	18	100	0,95	-

La primera fase de la construcción de la horquilla de RNA consistió en la inserción del fragmento 200-NAC en forma de repetición invertida a ambos lados de un intrón *pdk* en el plásmido pKANNIBAL (Wesley *et al.* 2001, Figura 4.4.3a). Mientras que las dos copias invertidas del 200-NAC formarán el tallo de la horquilla, el intrón tiene como principal función formar el bucle. El casete de expresión se completa con un promotor (CaMV 35S en este caso) y un terminador (*ocs*) específicos de plantas que harán que el hpRNA se exprese de forma constitutiva. El vector pKANNIBAL contiene dos “polylinker” que flanquean el intrón *pdk* diseñados para facilitar la inserción en repetición invertida de cualquier secuencia mediante la digestión con dos combinaciones de enzimas de restricción: *EcoRI/KpnI* y *XbaI/HindIII*. Diseñamos dos “primers” (HP-2F y HP-2R) para utilizar este sistema añadiendo a la secuencia 200-NAC las dianas de restricción necesarias para el clonaje (*XbaI* y *EcoRI* en el extremo 5' y *KpnI* y *HindIII* en el 3') durante su amplificación por PCR (Figura 4.4.4). Las secuencias de todos los “primers” utilizados en este capítulo pueden ser consultadas en la Tabla 3.5 del capítulo Material y Métodos. Tras comprobar la especificidad de los “primers” y poner a punto las condiciones de PCR se llevaron a cabo varias reacciones con el fin de asegurar cantidad suficiente de inserto para el proceso de clonaje.

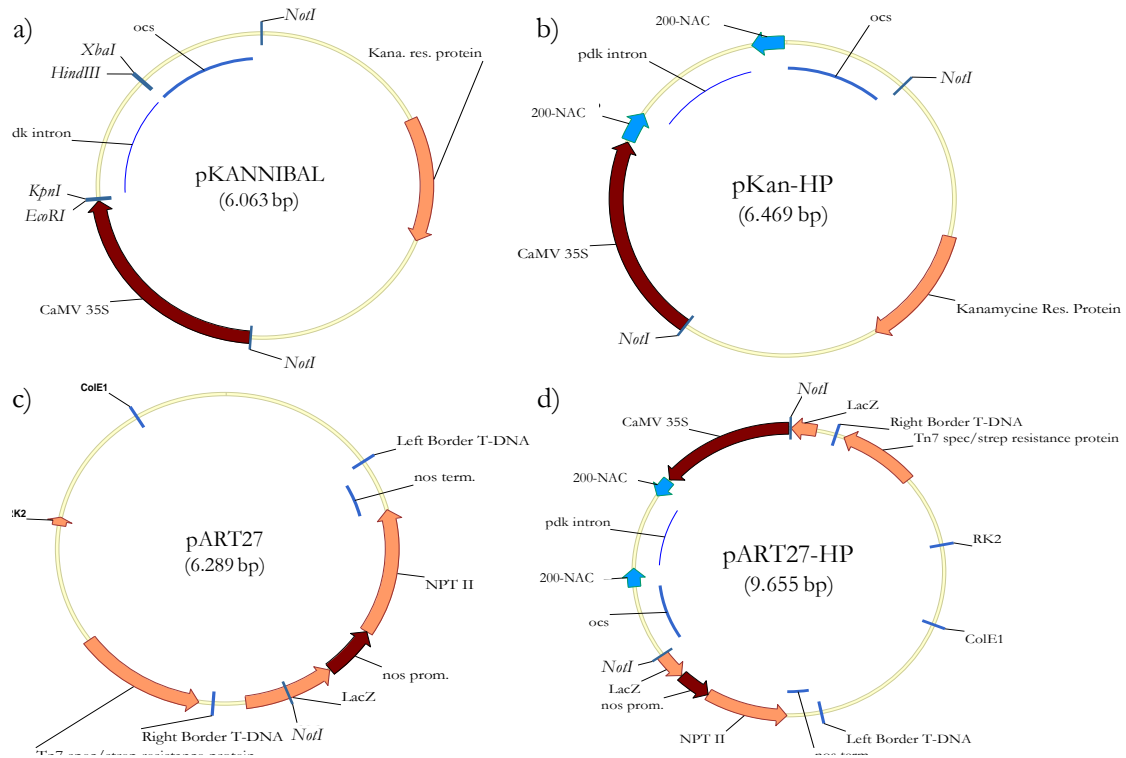


Figura 4.4.3: Mapas de los plásmidos utilizados en el silenciamiento del gen *MELO3C016540*. Figuras generadas con Vector NTI (v.11). Las flechas de color azul representan el fragmento 200-NAC, las flechas de color naranja oscuro y claro indican promotores y secuencias codificantes respectivamente, los arcos azules indican intrones (*pdk*) o terminadores (*ocs*) y las líneas azules perpendiculares al círculo indican dianas de restricción, orígenes de replicación (RK2, ColE1) o “left and right borders”. **a)** pKANNIBAL (Wesley *et al.* 2001). **b)** pKan-HP, con las repeticiones invertidas de 200-NAC. **c)** pART27 (Gleave 1992). **d)** Plásmido pART27-HP, con el casete de expresión del hpRNA.

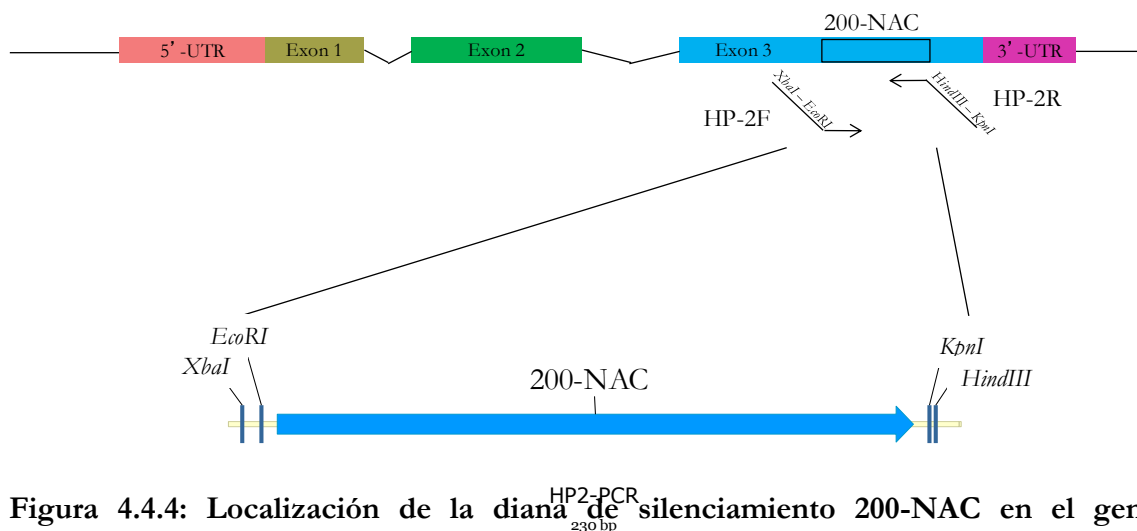


Figura 4.4.4: Localización de la diana de silenciamiento 200-NAC en el gen *MELO3C016540*. La horquilla muestra la región 200-NAC respecto a las diferentes regiones del gen diferenciadas por colores tal y como se representa en la figura 4.4.1. Las flechas de color negro representan los “primers” HP-2F y HP-2R que añaden al fragmento 200-NAC (flecha azul) las dianas de restricción indicadas mediante PCR.

Comenzamos la construcción del hpRNA con la inserción de 200-NAC en sentido 5'-3' digiriendo el producto de PCR y una alícuota del vector pKANNIBAL con las enzimas *EcoRI* y *KpnI*, ligando posteriormente ambos fragmentos y transformando *E. coli* (cepa JM109) con el producto de ligación. Se seleccionaron dos colonias con la construcción (A35 y A37), denominada pKan-200-NAC, mediante PCR de colonias con los "primers" 35S-F y HP-2R. Tras la extracción del plásmido mediante minipreparación fue verificado a través de su secuenciación con el "primer" 35S-F y su digestión con las mismas enzimas utilizadas en el clonaje (*EcoRI* y *KpnI*) que liberaron un fragmento correspondiente al inserto (Figura 4.4.5a). La inserción de la copia invertida de 200-NAC se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para la primera, pero utilizando la combinación de enzimas de restricción *XbaI/HindIII* para digerir tanto el producto de PCR como el vector pKan-200-NAC procedente de la colonia A35. En esta ocasión se seleccionaron mediante PCR de colonias con los "primers" int-4F y HP-2F cuatro colonias positivas (A21, A22, A61 y A62) con la construcción completa a la que denominamos pKan-HP (Figura 4.4.3b). De nuevo, los plásmidos extraídos mediante minipreparación fueron verificados por secuenciación con los "primers" indicados en la Tabla 3.5 y por digestión con las enzimas *XbaI/HindIII*, que liberaron el inserto (Figura 4.4.5b). Tras la confirmación, las cuatro colonias con la construcción pKan-HP fueron cultivadas de nuevo para su conservación mediante glicerinado a -80°C.

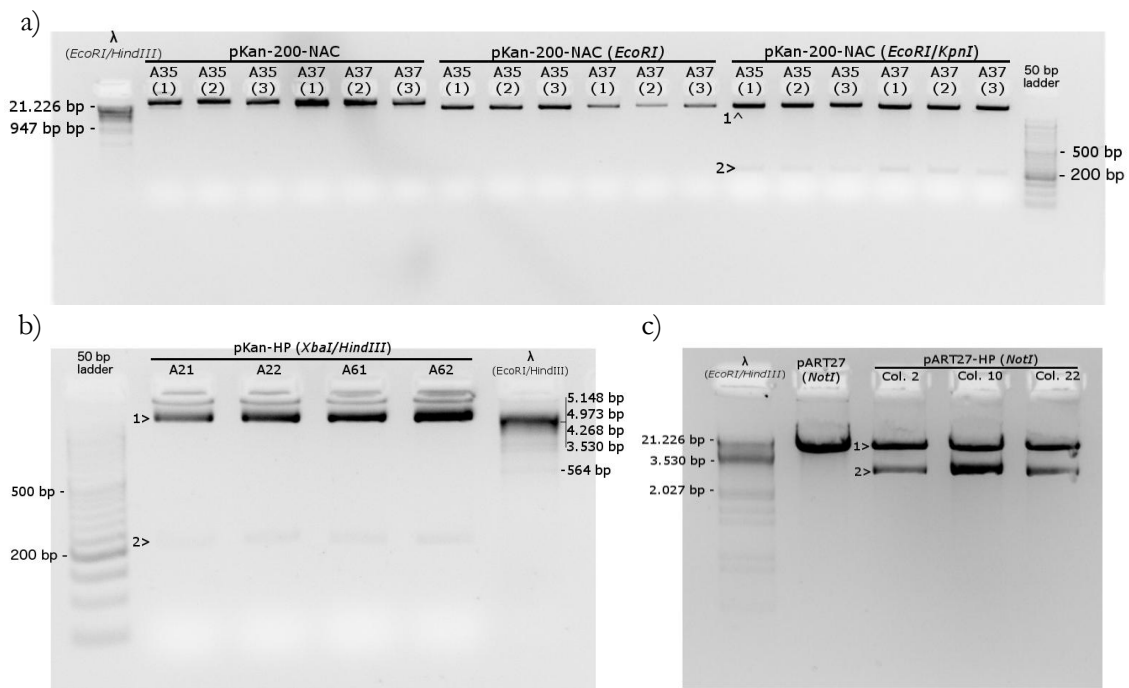


Figura 4.4.5: Verificación de las construcciones pKan-200-NAC, pKan-HP y pART27-HP mediante digestión enzimática. Las enzimas utilizadas para digerir cada vector se indican entre paréntesis. Marcadores de tamaño: lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII*; 50-1.500 bp DNA Ladder (Promega, Madison, USA). **a)** La digestión del vector pKan-200-NAC con las enzimas *EcoRI* y *KpnI* dio como resultado dos fragmentos correspondientes al vector pKANNIBAL (1) y al inserto 200-NAC (2). **b)** Los dos fragmentos obtenidos mediante digestión con *XbaI* y *HindIII* del vector pKan-HP se corresponden con el vector pKan-200-NAC (1) y con la segunda inserción de 200-NAC (2). **c)** Comprobación del vector pART27-HP mediante la digestión con *NotI* obteniendo dos bandas correspondientes al vector vacío pART27 (1) y al casete de expresión (2).

4.4.3. Preparación del vector binario y transformación de *Agrobacterium*.

Una vez insertadas las repeticiones invertidas de 200-NAC bajo el control del promotor CaMV 35S en el vector pKANNIBAL (pKan-HP), la segunda fase de la construcción del hpRNA consistió en la transferencia del casete de expresión a un vector binario con las regiones fundamentales para el proceso de transformación mediante *Agrobacterium* como orígenes de replicación, genes de selección, genes “reporter” y los bordes flanqueantes del T-DNA derecho e izquierdo (“right and left borders”). Para facilitar este proceso, pKANNIBAL puede ser digerido con la enzima *NotI*, que corta justo antes del promotor y después del terminador liberando el casete de expresión para que sea insertado en otro vector que contenga una diana de restricción *NotI* en la región T-DNA. Un vector que cumple con este requisito es pART27 (Gleave 1992, Figura 4.4.3c), que además contiene el gen “reporter” LacZ para simplificar la selección de colonias transformantes. Una alícuota de pKan-HP procedente de la colonia A62 fue digerida con *NotI* y el casete de expresión (con un tamaño de 3.366 bp) fue separado del resto del vector (3.882 bp) mediante electroforesis y después recuperado del gel de agarosa. El vector pART27 linealizado por *NotI* fue tratado con fosfatasa alcalina, que desfosforila los nucleótidos situados en los extremos 5' impidiendo su recircularización. Ambos fragmentos fueron ligados e introducidos en *E. coli*, y mediante PCR de colonias con los “primers” OCS-F y pARTlac-3R se seleccionaron tres colonias positivas (2, 10 y 22) de las que se obtuvo el vector binario con el casete de expresión, pART27-HP (Figura 4.4.3d), mediante minipreparación. Se comprobaron las construcciones mediante digestión con *NotI* (Figura 4.4.5c) pero solamente pudo ser verificado el plásmido de la colonia 10 mediante secuenciación con los “primers” indicados en la Tabla 3.5. Las otras dos colonias no pudieron ser amplificadas y secuenciadas, por lo que fueron descartadas. Por último, se conservó una alícuota de la colonia positiva mediante glicerinado a -80°C.

Finalmente se transformó *Agrobacterium* cepa AGL0 con la construcción pART27-HP procedente de la colonia 10, obteniéndose una gran cantidad de colonias tras 72 horas de incubación en medio de selección. Se eligieron tres colonias al azar, de las cuales en dos (10.2 y 10.3) se confirmó la presencia del vector pART27-HP mediante PCR con los “primers” OCS-F y pARTlac-3R. Por último, las colonias 10.2 y 10.3 fueron conservadas mediante glicerinado a -80°C hasta su utilización.

4.4.4. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo representan comienzo de una segunda aproximación para la verificación del gen *MELO3C016540* como responsable del fenotipo climatérico en las líneas de melón portadoras del QTL *eth6.3* mediante el uso del silenciamiento génico. La transformación genética de melón es posible desde hace tiempo pero es todavía una herramienta muy poco utilizada debido a la baja eficiencia de transformación y regeneración en esta especie (Dong *et al.* 1991; Ayub *et al.* 1996; Bezirganoglu *et al.* 2014). Pese a estas dificultades, la construcción pART27-HP ya está siendo utilizada con éxito en la transformación de la línea GF40 (con *eth6.3*) y se espera que durante el año 2016 se pueda realizar la primera caracterización fenotípica de frutos procedentes de plantas transgénicas (J. Argyris, comunicación personal). La construcción pART27-HP también podría ser utilizada para la transformación genética de la línea GF31 (con *eth3.5* y *eth6.3*) que también presenta un fenotipo claramente climatérico y más intenso que GF40 por el efecto aditivo de los dos QTLs (Vegas *et al.* 2013).

A causa varios factores, entre los que se encuentran la estructura del hpRNA y el lugar de inserción del casete de expresión en el genoma, cada planta transgénica muestra un grado diferente de silenciamiento (Waterhouse & Helliwell 2003). En *Arabidopsis* han sido descritas disminuciones del mRNA objetivo de entre el 70 y el 100% (Wesley *et al.* 2001; Helliwell *et al.* 2002) siendo en algunos casos las líneas de silenciamiento equivalentes fenotípicamente a mutantes con el alelo nulo del gen (Stoutjesdijk *et al.* 2002). Utilizando una construcción muy parecida a la de este capítulo se han conseguido en melón unos grados de silenciamiento de alrededor del 85% para el gen *Cm-eIF4E* (Rodríguez-Hernandez *et al.* 2012).

En las líneas GF40 transgénicas se espera encontrar un efecto sobre la maduración del fruto derivado del silenciamiento de *MELO3C016540* como una disminución o inhibición completa de la síntesis de etileno y de todos los procesos relacionados con la maduración climatérica del fruto de melón (como el desarrollo de una capa de abscisión, el cambio de color externo, la producción de aromas y gran parte del reblandecimiento de la pulpa). Los diferentes grados de silenciamiento del gen *MELO3C016540* que se podrían obtener servirían para estudiar el efecto de distintos niveles de expresión sobre la maduración del fruto. El único trabajo similar realizado en melón es el silenciamiento de *CmACO1* en la variedad climatérica “Védrantais” mediante una aproximación por antisentido, que redujo la síntesis de etileno en un 99% respecto al control y mostró una inhibición del componente climatérico de la maduración (Ayub *et al.* 1996).

La secuenciación del genoma (García-Mas *et al.* 2012) ha facilitado mucho el diseño de marcadores moleculares y mapas genéticos, lo que se ha traducido en un aumento en el número genes mayores clonados desde su publicación (Cohen *et al.* 2014; Boualem *et al.* 2015; Feder *et al.* 2015; Tzuri *et al.* 2015), pero en ninguno de ellos se ha utilizado la transformación genética como método de validación. Por tanto, con el desarrollo y la aplicación de la tecnología hpRNA en el estudio del gen *MELO3C016540* no solo se pretende entender mejor su papel en la regulación de la maduración climatérica sino también demostrar la importancia de disponer de un protocolo eficiente de transformación genética en melón.

4.5. Estudio transcriptómico de la maduración del fruto.

4.5.1. Introducción

En el último capítulo de este trabajo de tesis se profundiza en el estudio de la maduración del fruto de melón de la línea SC3-5-1 desde un punto de vista transcriptómico como complemento a la aproximación genética llevada a cabo en los capítulos anteriores.

El estudio del transcriptoma puede ser muy importante para llegar a entender los fundamentos de procesos complejos y altamente regulados como el desarrollo y la maduración del fruto. Históricamente, las micromatrices de DNA (“microarrays”) han sido las más utilizadas, pero en los últimos años la secuenciación masiva del mRNA (RNA-Seq) está desplazando a las micromatrices debido a sus ventajas sobre las herramientas basadas en hibridación y al abaratamiento de la secuenciación de alto rendimiento (Wang *et al.* 2009). En tomate, la especie modelo para la maduración del fruto, se han utilizado tanto micromatrices como RNA-Seq para estudiar mutantes como *Nr* (“never ripe”, Alba *et al.* 2005) y *rin* (“ripening inhibitor”, Fujisawa *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2012), y para caracterizar la regulación ejercida por factores de transcripción como *LeAP2a*, *TAGL1* y *LeERF6* sobre los procesos de maduración (Karlova *et al.* 2011; Bemer *et al.* 2012; Lee *et al.* 2012); respectivamente). Durante los últimos años también se han realizado este tipo de estudios en especies no modelo como la naranja (Liu *et al.* 2009a; Yu *et al.* 2012; Wu *et al.* 2014), el melocotonero (Trainotti *et al.* 2006; Ziliotto *et al.* 2008), la vid (Zenoni *et al.* 2010; Sweetman *et al.* 2012) y en cucurbitáceas como la sandía (Grassi *et al.* 2013) y el pepino (Ando *et al.* 2012). En el primer estudio transcriptómico de la maduración de fruto mediante RNA-Seq llevado a cabo en melón se estudió la expresión de genes implicados en la síntesis de etileno, la producción de aromas, la acumulación de azúcares y el reblandecimiento de la pulpa en frutos maduros e inmaduros de la variedad climatérica “Dulce” (Dai *et al.* 2011; Portnoy *et al.* 2011). Otro proceso relacionado con la maduración del fruto que ha sido estudiado mediante RNA-seq es la formación de la capa de abscisión en variedades climatéricas (Corbacho *et al.* 2013). También se han abordado desde un punto de vista global las relaciones entre dulzor, color y aroma durante la maduración del fruto utilizando datos tanto metabolómicos como transcriptómicos en una población de RILs “Dulce” x PI 414723 (tipo *momordica*) (Freilich *et al.* 2015). Por último, un trabajo especialmente relevante para esta tesis doctoral es el realizado por Saladié y colaboradores (2015) en el que se estudia el transcriptoma de frutos en diversos puntos de desarrollo de las variedades climatéricas “Dulce” y “Védrantais” junto con las no climatéricas PS y SC usando una micromatriz. Es el primer trabajo en comparar ambos tipos de maduración a nivel transcriptómico y en él se relacionan los cambios de expresión con los cambios en la producción de etileno, niveles de azúcares, contenido en carotenoides y firmeza de la pulpa, aunque solamente el 38% de los genes anotados en el genoma del melón estaban representados en la micromatriz.

En este capítulo de tesis se continúa con el trabajo comenzado por el Dr. Juan Vegas al final de su tesis doctoral (Vegas 2014), que consiste en el estudio de la maduración del fruto mediante RNA-Seq entre las líneas PS y SC3-5-1 (NIL climatérica con alelos de SC en homocigosis para los QTL *eth3.5* y *eth6.3*, equivalente a la línea GF31 utilizada en el cap. 4.1 como control de fenotipado). Tras cultivar y cosechar frutos de las dos líneas por triplicado entre los 15 días tras la polinización (DAP) hasta el punto de cosecha (H, 55 días para PS y abscisión para SC3-5-1, que en esa temporada fue 35 días) durante el verano de 2011, se determinaron los puntos a secuenciar estimando los niveles de expresión mediante PCR

4.5. Estudio transcriptómico de la maduración del fruto

semicuantitativa del gen *CmACO1*, clave para la biosíntesis de etileno, como indicador del inicio del proceso de maduración. Los resultados (Figura 4.5.1) indicaron que *CmACO1* apenas se expresa en PS mientras que en SC3-5-1 se observa una expresión fuerte hacia el final de la maduración. Por tanto se estableció 25 DAP como el punto límite anterior al comienzo de la maduración en ambas líneas y H como el punto en el que el fruto ya está maduro (Figura 4.5.2). Tras la purificación de mRNA a partir de la pulpa de fruto en los dos tiempos seleccionados (25 DAP y H), se realizaron dos carreras de secuenciación 454 en el Servicio de Secuenciación Masiva del CRAG. El trabajo llevado a cabo en este capítulo continúa a partir de este punto, desde la recepción de los archivos de lecturas de las genotecas de cDNA hasta la caracterización de los genes diferencialmente expresados y el estudio de su implicación en procesos relacionados con la maduración del fruto de melón.

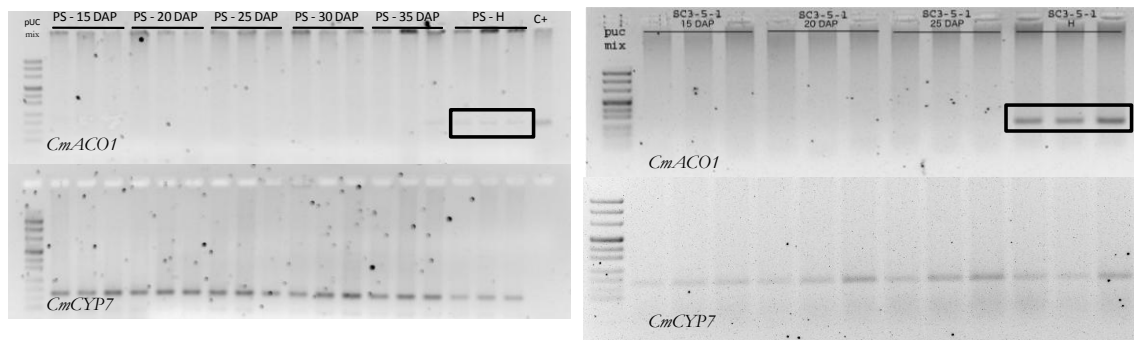


Figura 4.5.1: Cuantificación por PCR semicuantitativa de la expresión de *CmACO1* en pulpa de fruto de las líneas PS y SC3-5-1 en diferentes estadios de maduración. Los recuadros indican el producto de PCR detectado en el gel de agarosa al 2%. Se utiliza el gen *CYCLOPHILIN7* (*CmCYP7*) como control. DAP: Días después de la polinización. Adaptado de Vegas (2014).

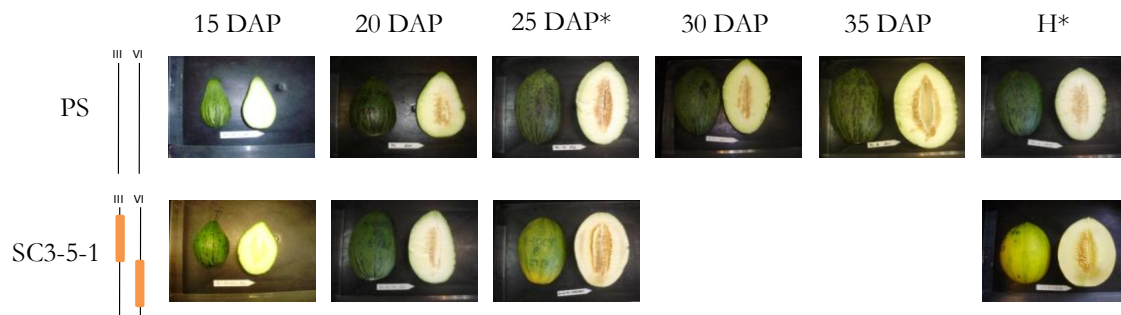


Figura 4.5.2: Frutos en diferentes estadios de desarrollo y maduración de las líneas PS y SC3-5-1. A la izquierda se esquematiza el genotipo de cada línea mediante barras verticales (que representan los cromosomas III y VI) y cajas naranjas (que representan alelos en homocigosis de SC en los QTLs *eth3.5* y *eth6.3* respectivamente). DAP: días después de la polinización. H: punto de cosecha.

*: Puntos seleccionados para la secuenciación masiva por 454-Roche.

Adaptado de Vegas (2014).

4.5.2. Estudio transcriptómico mediante secuenciación 454-Roche.

Obtención y mapeado de las lecturas

Como punto de partida del estudio transcriptómico mediante tecnología 454-Roche recibimos los archivos correspondientes a las lecturas de las genotecas de cDNA generadas

en las dos carreras de secuenciación realizadas por el Servicio de Secuenciación Masiva del CRAG. De forma rutinaria, este servicio aplica un primer filtro de calidad utilizando el software Newbler 2.6 según las indicaciones del fabricante para eliminar lecturas de muy baja calidad o muy cortas, y también para cortar las etiquetas MID utilizadas para identificar cada una de las 12 genotecas secuenciadas (2 genotipos x 2 tiempos x 3 réplicas biológicas). La nomenclatura utilizada en este capítulo para identificar las genotecas consiste en el nombre de la línea (PS o SC3-5-1) seguido por el punto de maduración (UNRIPE, 25 DAP) o RIPE (H) y finalmente el número de réplica biológica (R1, R2 y R3). Cuando se omite el número de réplica se hace referencia al conjunto de los triplicados. Tal y como se puede observar en la Figura 4.5.3 la segunda carrera tuvo un mejor rendimiento que la primera y el número de lecturas es relativamente uniforme entre las 12 genotecas. Sin embargo, la réplica R3 de la muestra PS|UNRIPE dio lugar a un bajo número de lecturas en ambas carreras, debido probablemente a algún problema durante la construcción de la genoteca. Dado que las dos carreras de secuenciación mostraban una clara correlación en el número de lecturas obtenidas para cada muestra (corr. 0,98) decidimos juntar ambos experimentos para dar mayor solidez a los análisis posteriores. De esta forma, el rendimiento total de las dos carreras de secuenciación fue de 1.501.695 lecturas repartidas entre 12 genotecas con un total de 415.654.707 nucleótidos. La longitud de las lecturas varió entre 18 y 943 bases con un promedio de 277. Las estadísticas de la secuenciación de las genotecas, agrupadas por triplicados, pueden consultarse en la Tabla 4.5.1.

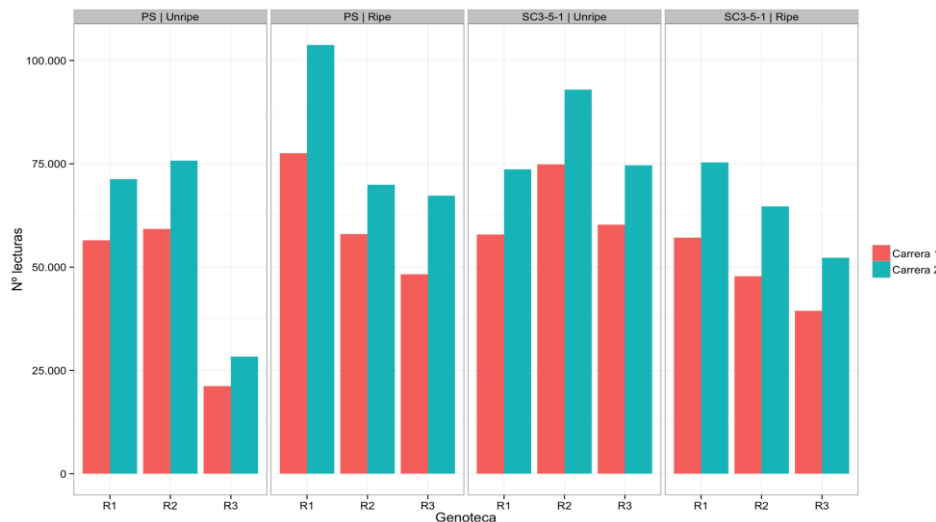


Figura 4.5.3: Rendimiento de la secuenciación por 454-Roche tras el filtrado inicial con Newbler 2.6. Número de lecturas obtenidas por genoteca en las dos carreras de secuenciación.

Antes de comenzar con el mapeado de las lecturas contra el genoma de referencia de melón, realizamos un análisis exploratorio de la calidad de las lecturas y observamos que, a pesar de haber pasado el filtro de Newbler 2.6, algunas de ellas presentaban todavía regiones con valores de calidad muy deficientes (“Phred” por debajo de 20) y que la calidad de los nucleótidos tendía a disminuir hacia el final de las lecturas (de color azul en la Figura 4.5.4). Como esto puede suponer un problema de cara a los siguientes pasos del análisis, llevamos a cabo un filtrado más exigente con el software Trimmomatic 0.33 con el que finalmente obtuvimos unas genotecas de mayor calidad (de color rojo en la Figura 4.5.4) a costa de descartar el 14% de lecturas (38% de nucleótidos) en promedio (Tabla 4.5.1). Tal y como puede observarse en las figuras 4.5.4 y 4.5.5, la longitud de las lecturas se vio alterada

4.5. Estudio transcriptómico de la maduración del fruto

por el segundo filtrado debido a que, como la calidad de los nucleótidos disminuye a lo largo de la lectura, muchas de ellas fueron acortadas durante el proceso.

Tras el procesamiento de las genotecas, se realizó el mapeado utilizando HISAT 0.1.16 tomando como referencia el genoma de melón v3.5.1 (Argyris *et al.* 2015b) y obteniendo una eficiencia de mapeado promedio del 77% respecto a las lecturas filtradas (Tabla 4.5.1). De todas las lecturas mapeadas, la mayoría (83%) lo hicieron en regiones exónicas y tan solo un 5% y un 11% en regiones intrónicas e intergénicas, respectivamente. Cabe destacar la muestra PS|RIPE, cuya eficiencia de mapeado fue la más baja (65%) por lo que, a pesar de ser la segunda genoteca de mayor tamaño en cuanto a lecturas filtradas, el número de lecturas mapeadas en exones terminó siendo bajo (49% respecto al total de lecturas filtradas) si la comparamos con las otras tres muestras (entre 62 y 74%).

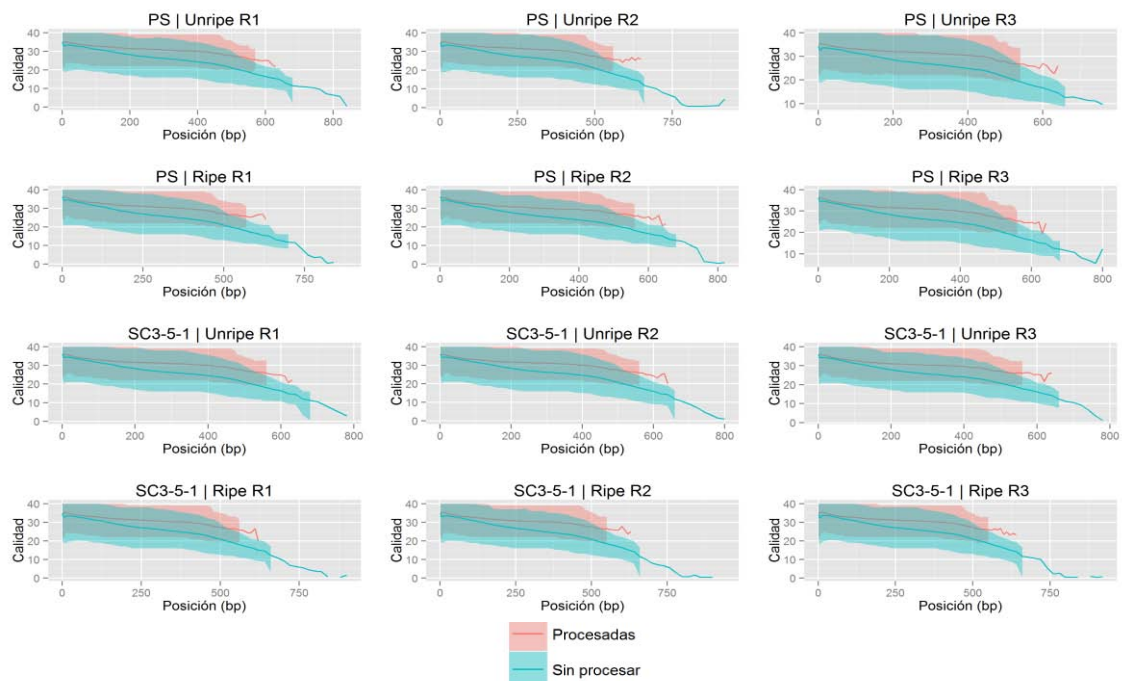
Tabla 4.5.1: Resumen de secuenciación, filtrado, mapeo y expresión génica. Se indican el número total de lecturas obtenidas entre las dos carreras de secuenciación sin procesar y el rendimiento del filtrado por Trimmomatic y mapeado para cada una de las cuatro muestras (juntando triplicados) y para la suma de las 12 genotecas. La expresión

Genotecas sin procesar	PS Unripe	PS Ripe	SC3-5-1 Unripe	SC3-5-1 Ripe	Total
Nº de lecturas	312.237	418.689	434.162	336.607	1.501.695
Nº de nucleótidos	86.091.523	108.240.929	128.169.978	93.152.277	415.654.707
Longitud media (bp)	276	259	295	277	277
Genotecas procesadas					
Nº de lecturas (%)	262.059 (84%)	362.386 (87%)	377.776 (87%)	285.666 (85%)	1.287.887 (86%)
Nº de lecturas (%)	51.156.720 (59%)	72.595.591 (67%)	78.079.079 (61%)	55.663.039 (60%)	257.494.429 (62%)
Longitud media (bp)	195	200	207	195	200
Mapeado					
Nº de lecturas mapeadas (%)	196.451 (75%)	236.037 (65%)	308.854 (82%)	241.814 (85%)	983.156 (77%)
De las cuales exónicas	162.923 (83%)	175.837 (74%)	263.592 (85%)	211.760 (88%)	814.112 (83%)
De las cuales intrónicas	9.375 (5%)	11.213 (5%)	16.830 (5%)	11.882 (5%)	49.300 (5%)
De las cuales intergénicas	21.229 (11%)	43.169 (18%)	24.915 (8%)	15.602 (6%)	104.915 (11%)
Análisis de expresión					
Nº de genes expresados	7.410	7.417	8.821	7.921	10.861

génica indica el número de genes con al menos una lectura mapeada en dos de las tres réplicas.

Página anterior:

Figura 4.5.4: Efecto del filtrado con Trimmomatic 0.33 sobre la calidad de los nucleótidos a lo largo de las lecturas. La línea central indica la calidad promedio y la



zona sombreada delimita los cuartiles 1º y 3º. En rojo se representan las lecturas sin procesar y en azul las lecturas procesadas. En el eje X se indica la posición de los nucleótidos y en el Y la calidad Phred.

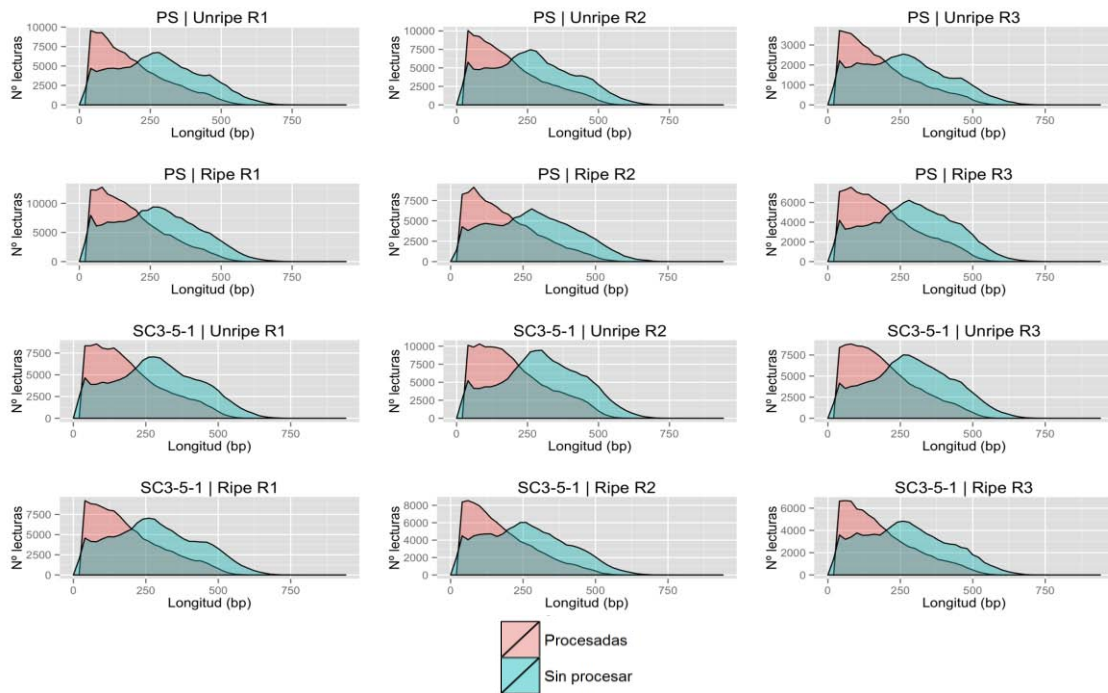


Figura 4.5.5: Efecto del filtrado con Trimmomatic 0.33 sobre el número y la longitud de las lecturas. En rojo se representan las lecturas sin procesar y en azul las lecturas procesadas. En el eje X se indica la longitud de las secuencias y en el Y el número de lecturas.

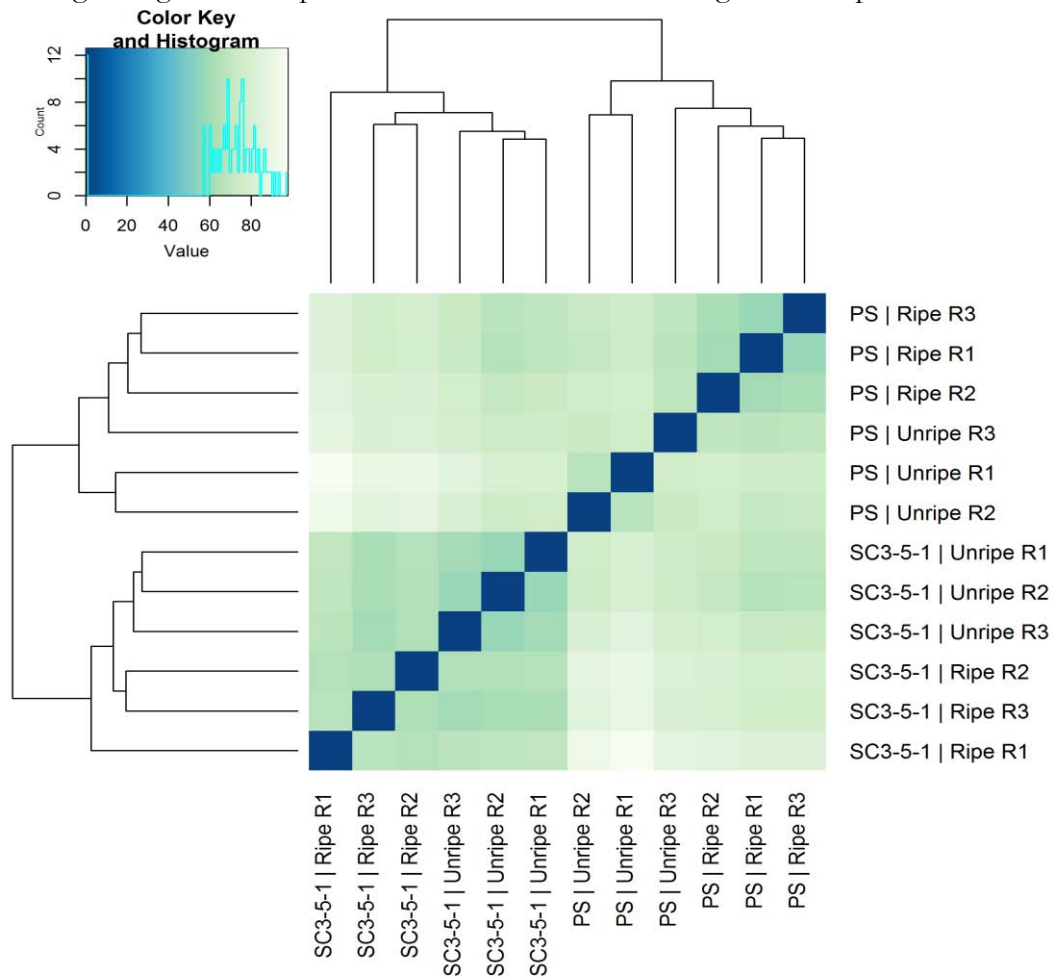
Visualización y análisis de expresión diferencial

En un experimento de RNA-Seq el análisis de la expresión diferencial se basa en contar el número de lecturas mapeadas en cada uno de los genes y comparar este número entre las distintas muestras, realizando una prueba estadística para dotar de un nivel de significación a las diferencias encontradas. De entre la gran cantidad de herramientas bioinformáticas desarrolladas durante los últimos años para realizar este tipo de análisis, en este proyecto se utiliza Stringtie 1.0.4 para detectar nuevos transcritos no presentes en la anotación de referencia y añadirlos a la misma, el script de Python HTSeq-count 0.6.1 para realizar el recuento de lecturas utilizando la nueva anotación, y finalmente el paquete de R DESeq2 1.8.0 para la normalización, visualización y análisis de los resultados.

Tras la generación de la nueva anotación, el conteo de lecturas y su normalización, se inició un primer análisis exploratorio con el objetivo de visualizar las diferencias entre las muestras a nivel de expresión génica global por medio de la construcción de una matriz de distancias y su representación gráfica por medio de un “heatmap”. Mediante este método encontramos que las muestras están divididas en dos grupos que separan las genotecas de las líneas PS y SC3-5-1, aunque la agrupación de los triplicados pertenecientes a las muestras SC3-5-1|RIPE y PS|UNRIPE no es del todo clara (Figura 4.5.6). Realizamos también un análisis de componentes principales (PCA) en el que también observamos una clara separación de las muestras de PS respecto a las de SC3-5-1, pero dentro de cada línea, especialmente en el caso de la climatérica, la separación entre los estadios de maduración es menos clara (Figura 4.5.7). Otra forma de estudiar las diferencias de expresión a nivel global entre las muestras es mediante el cálculo del número de genes expresados, es decir,

aquellos genes con al menos una lectura mapeada en dos de las tres réplicas biológicas. El número total de genes expresados entre todas las muestras fue de 10.861 (40% de los genes anotados en el genoma de referencia) siendo las dos muestras de la línea SC3-5-1 las que mayor número de genes expresan (Tabla 4.5.1). Si comparamos las cuatro muestras encontramos que 4.936 genes se expresan en todas ellas simultáneamente y que la muestra SC3-5-1|UNRIPE es la que presenta un mayor número de genes específicamente expresados (686) frente a PS|RIPE con solamente 323 genes (Figura 4.5.8). Desde el punto de vista del número de genes comúnmente expresados, las muestras de fruto maduro e inmaduro de la línea climatérica SC3-5-1 son las más parecidas entre sí (6.844 genes) y, en el otro extremo, las más distantes son las muestras PS|RIPE y PS|UNRIPE con 5.595 genes en común.

Figura 4.5.6: Agrupación jerárquica de las muestras tras el análisis de expresión. Cladograma generado a partir de una matriz de distancias generada a partir de los niveles de



expresión con el paquete de R DESeq2 1.8.0. La escala de color (blanco-verde) indica la fuerza de la correlación (a mayor intensidad mayor correlación).

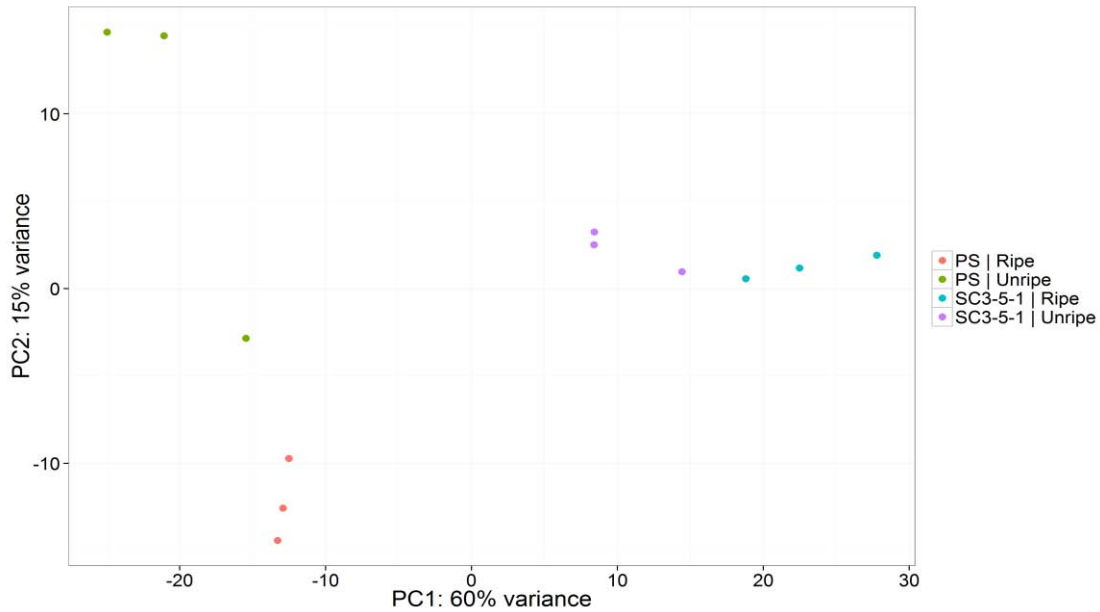


Figura 4.5.7: Diferencias en el patrón de expresión de las muestras. Análisis de componentes principales de las muestras según los 500 genes con mayores diferencias de expresión realizado con el paquete de R DESeq2 1.8.0.

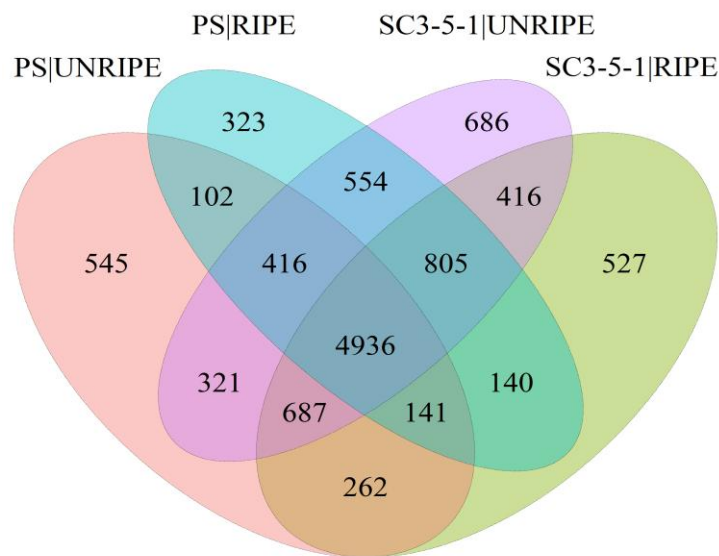


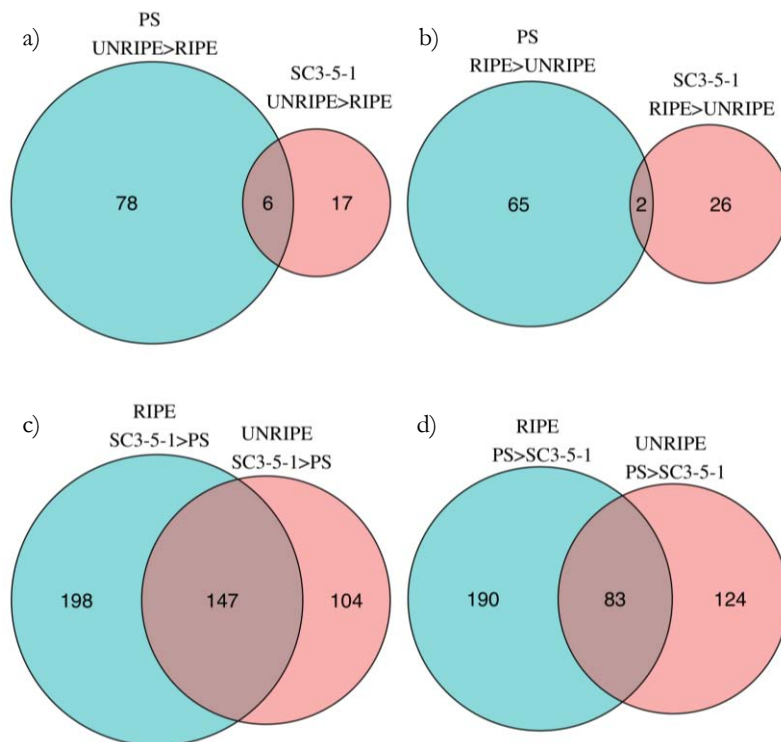
Figura 4.5.8: Diagrama de Venn que contiene los genes expresados en común por las cuatro muestras. Las elipses representan las muestras (rojo: PS|UNRIPE; azul: PS|RIPE; morado: SC3-5-1|UNRIPE; verde: SC3-5-1|RIPE) y los números, situados en todas las intersecciones posibles entre ellas, se indican los genes expresados en común.

Tras explorar la expresión génica a nivel global comenzamos el análisis de expresión diferencial realizando cuatro comparaciones entre las muestras (contrastes 1-4 en la Tabla 4.5.2) tomando como genes diferencialmente expresados (DE) aquellos con un p-valor ajustado para comparaciones múltiples menor de 0,05, que es el que se utiliza habitualmente en este tipo de análisis. Como cada contraste se ha realizado de forma independiente, el p-valor límite correspondiente al p-valor ajustado es diferente para cada caso y puede consultarse en la Tabla 4.5.2. En la misma tabla se indica el número de genes sobreexpresados (SE) o infraexpresados (IE) en cada contraste tomando como referencia la primera muestra. Cabe destacar que, aunque para realizar los análisis estadísticos se ha

utilizado una anotación que incluye los nuevos transcritos descubiertos por Stringtie durante el mapeado, a partir de este punto solamente se han tenido en cuenta los genes anotados en la versión 3.5.1 del genoma. El número de genes DE varía enormemente entre los contrastes pero de nuevo refleja que las diferencias de expresión a lo largo de la maduración de cada línea (151 y 51 genes, contrastes 1 y 2 respectivamente) son menores que las diferencias entre las líneas SC3-5-1 y PS tanto en el fruto maduro (617 genes, contraste 3) como en el inmaduro (458 genes, contraste 4). Si comparamos los contrastes 1 y 2 a nivel de genes DE, encontramos un total de 8 genes en común, que son aquellos que tanto en PS como en SC3-5-1 están más expresados en el fruto inmaduro (6 genes, Figura 4.5.9a) o maduro (2 genes, Figura 4.5.9b). La misma comparación con los contrastes 3 y 4 nos permite descubrir genes DE en una línea respecto a la otra en ambos puntos de maduración. De esta forma encontramos 147 genes SE (Figura 4.5.9c) y 83 genes IE (Figura 4.5.9d) en SC3-5-1 respecto a PS tanto en fruto inmaduro como maduro. Todos los datos relativos a los genes DE de los cuatro contrastes como los niveles de expresión, los resultados del test estadístico y su anotación, están recogidos en la Tabla A.4.5.1a-d del Anexo.

Tabla 4.5.2: Análisis de expresión diferencial. Para cada contraste (1-4) se especifican las muestras comparadas, el p-valor límite equivalente a un p-valor ajustado de 0,05 y el número de genes sobreexpresados (SE) e infraexpresados (IE). 1>2 y 2>1 equivale a mayor expresión de Muestra 1 que Muestra 2, y de Muestra 2 que Muestra 1, respectivamente.

Contraste	Muestra 1	Muestra 2	p-valor límite	Genes SE (1>2)	Genes IE (2>1)
1	PS UNRIPE	PS RIPE	$3,5 \times 10^{-3}$	84	67
2	SC3-5-1 UNRIPE	SC3-5-1 RIPE	$1,2 \times 10^{-3}$	23	28
3	SC3-5-1 RIPE	PS RIPE	$5,1 \times 10^{-3}$	345	273
4	SC3-5-1 UNRIPE	PS UNRIPE	$5,6 \times 10^{-3}$	251	207



Página anterior:

Figura 4.5.9: Diagramas de Venn. Representación de los genes diferencialmente expresados en común entre los contrastes de la Tabla 4.5.2. **A:** genes sobreexpresados (SE) en los contrastes 1 y 2; **B:** genes infraexpresados (IE) en los contrastes 1 y 2; **C:** genes SE en los contrastes 3 y 4; y **D:** genes IE en los contrastes 3 y 4.

Caracterización de genes DE en los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1

La comparación entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1 es uno de los más interesantes desde un punto de vista biológico al encontrarse activos muchos de los procesos específicos de cada tipo de maduración. Por tanto, decidimos profundizar en el tercer contraste realizando una anotación funcional de los genes DE y analizando cómo podrían afectar a la maduración del fruto. Para ello se estudiaron las diferencias de expresión de algunos genes implicados en procesos como la biosíntesis y señalización de etileno, la regulación génica (factores de transcripción), el metabolismo de azúcares y pared celular y la biosíntesis de compuestos aromáticos.

Fruto de trabajos anteriores realizados por otros miembros del departamento está disponible una relación de los términos GO asociados con cada gen del genoma de referencia, por lo que la anotación funcional de los genes DE consistió en extraer los datos necesarios y prepararlos para su análisis. Como la cantidad de información contenida en un archivo de anotación funcional es mucha y difícil de interpretar, realizamos un resumen de los grupos de genes SE e IE utilizando una ontología abreviada específica de plantas (GOSlim-Plant) con la herramienta GOSlim. Los resultados, recogidos en la Tabla A.4.5.2 del Anexo, están representados gráficamente en la Figura 4.5.10 e indican que el resumen de los genes SE (SC3-5-1 > PS) contiene una mayor representación de términos GO que los genes IE en las tres categorías, aunque el tamaño del primer grupo es mayor que el del segundo (345 genes SE frente a 273 IE).

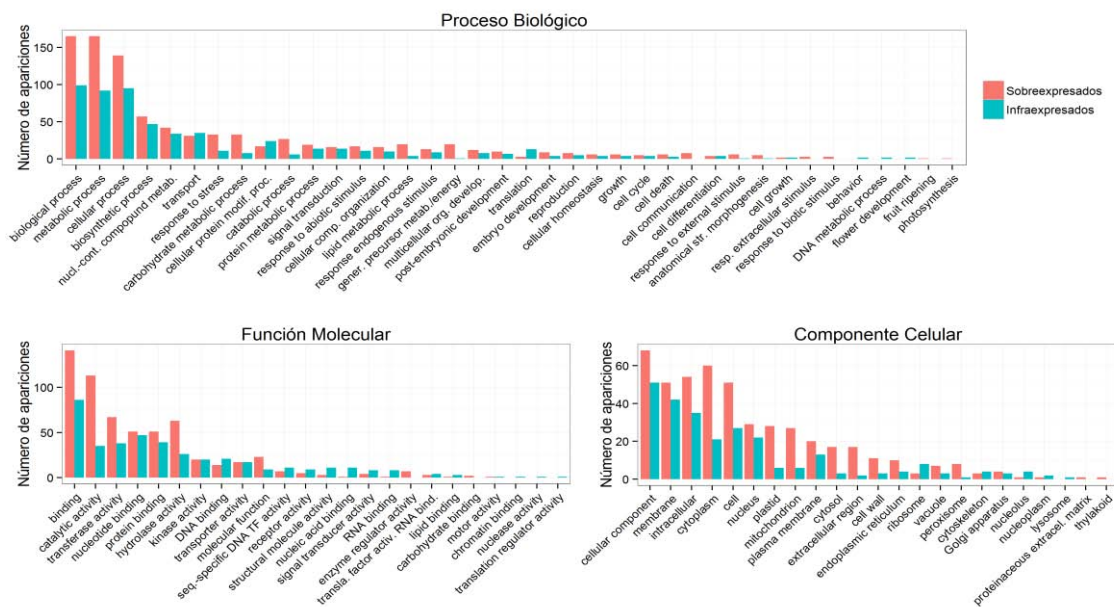


Figura 4.5.10: Abundancia de términos GO en los genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1. Resumen de términos GO obtenido con GOSlim utilizando la ontología GOSlim-Plant. Los términos sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (azul) son en SC3-5-1 | RIPE respecto a PS | RIPE.

También analizamos si hay un enriquecimiento de términos GO asociados con los conjuntos de genes SE y IE respecto al genoma de referencia utilizando la herramienta BiNGO 2.44 desarrollada para el programa Cytoscape (Tabla A.4.5.3 en el anexo). En el grupo de genes SE (más expresados en SC3-5-1 que en PS) encontramos enriquecimiento en diez términos de las tres categorías (Figura 4.5.11), mientras que en los genes IE (más expresados en PS que en SC3-5-1) solamente un término relacionado con las categorías de función molecular y proceso biológico está enriquecido (Figura 4.5.12).

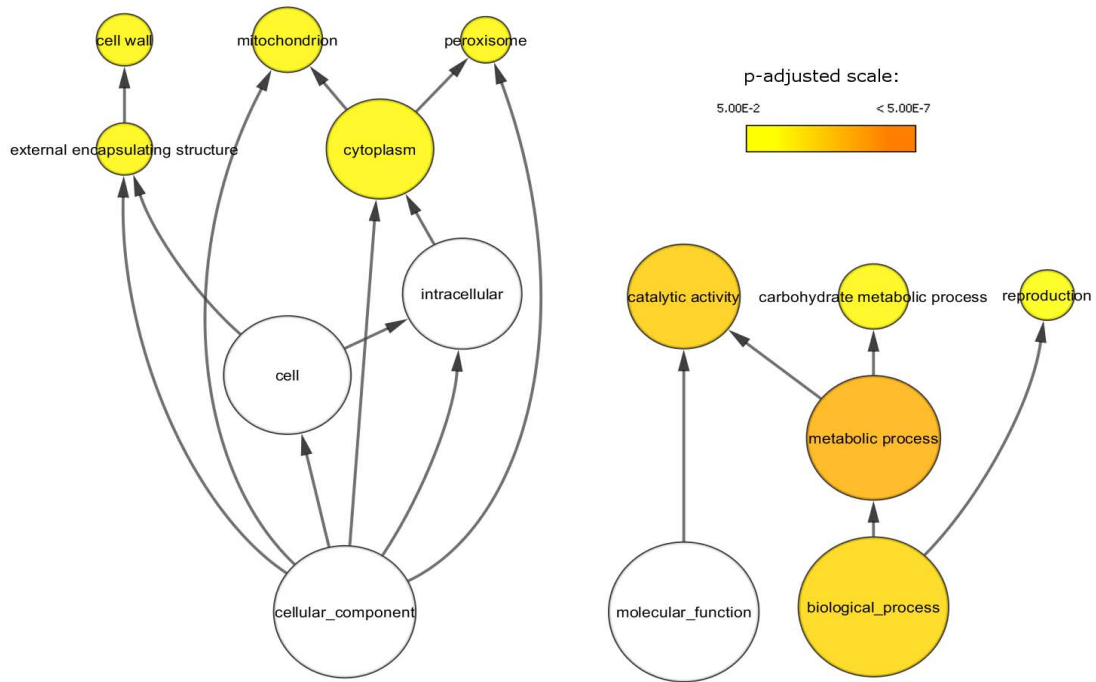
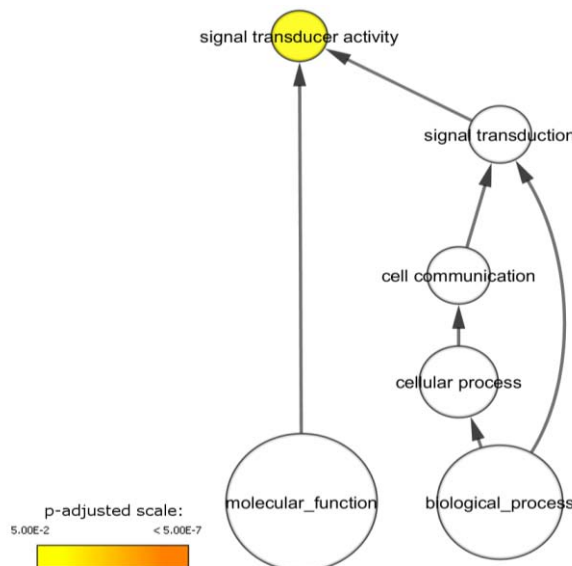


Figura 4.5.11: Análisis de enriquecimiento de términos GO en los genes SE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1. Resultados obtenidos con el plugin BinGO 2.44 de Cytoscape. Las relaciones jerárquicas entre los términos se representan mediante la posición y las conexiones por flechas, la cantidad de genes relacionados se indica mediante el tamaño y el nivel de significación del test estadístico mediante el color. Los términos están enriquecidos en el conjunto de genes sobreexpresados (SC3-5-1 | RIPE > PS | RIPE) respecto al genoma de referencia.



Página anterior:

Figura 4.5.12: Análisis de enriquecimiento de términos GO en los genes IE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1. Resultados obtenidos con el plugin BinGO 2.44 de Cytoscape. Las relaciones jerárquicas entre los términos se representan mediante la posición y las conexiones por flechas, la cantidad de genes relacionados se indica mediante el tamaño y el nivel de significación del test estadístico mediante el color. Los términos están enriquecidos en el conjunto de genes infraexpresados (SC3-5-1 | RIPE < PS | RIPE) respecto al genoma de referencia.

Tras la caracterización de los genes DE mediante anotación funcional se analizó su distribución a lo largo de los 12 cromosomas del genoma de referencia mediante un “Manhattan plot” (Figura 4.5.13) para averiguar si están situados dentro de las regiones introgresadas en los cromosomas III y VI de la línea SC3-5-1, y en la introgresión contaminante detectada recientemente en esta misma línea en el cromosoma XI (Pereira, sin publicar). Los resultados indican que los genes con expresión diferencial significativa están distribuidos por todos los cromosomas, siendo el IV el que más concentra (53) y el XII el que menos (12, sin contar el 0 con 8 genes). Por otro lado, el número de genes DE dentro de la introgresión del cromosoma III fue 34, 20 en la del VI y 5 en la del XI.

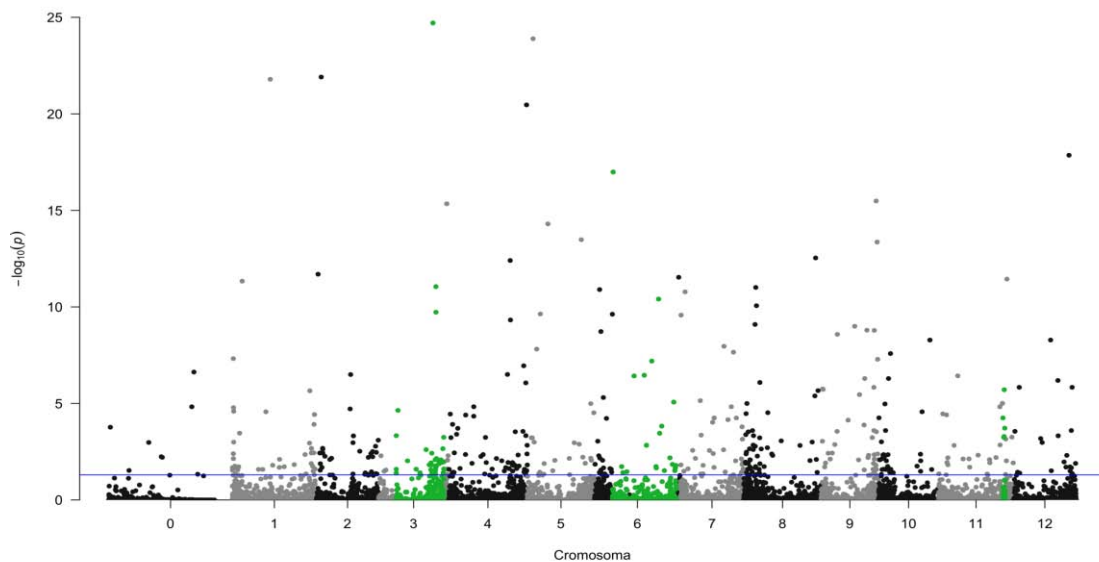


Figura 4.5.13: Manhattan plot. Cada punto del gráfico representa un gen DE, en el eje de las abscisas las coordenadas genómicas y en el de las ordenadas el logaritmo negativo del p-valor ajustado obtenido en el contraste entre frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1. En verde se destacan los genes dentro de las introgresiones de SC3-5-1 (Pereira, sin publicar) y la línea azul señala el límite de significación (p-valor < 0,05). 0 corresponde al cromosoma 0 de melón (secuencias sin asignar)

El proceso más importante de los relacionados con la maduración del fruto es la ruta de biosíntesis y señalización de etileno, que es estudiada en detalle a nivel de expresión génica en la Figura 4.5.14. En ella se observan grandes diferencias de expresión en las primeras etapas de la síntesis, siendo estadísticamente significativos en el caso de los genes *CmSAM2* (sobreexpresado en PS), *CmACS5* (sobreexpresado en SC3-5-1) y dos ACO (*CmACO1* y *CmACO5*) más expresados en SC3-5-1 que en PS. De los componentes de la vía de señalización encontramos significativamente más expresados en SC3-5-1 dos receptores de etileno (*CmETR1* y *CmETR2*), un gen *CmEIN3* y tres genes de respuesta a etileno

(*CmEREBP*) mientras que en PS solamente dos *CmEREBP* están sobreexpresados. Las diferencias de expresión, los resultados del test estadístico y la anotación de los genes DE implicados tanto en este proceso como en los siguientes está indicada en la Tabla 4.5.3.

Cuatro familias de factores de transcripción, MADS-box, NAC/NAM, F-box y HD-Zip, con miembros implicados en la regulación de la síntesis de etileno y otros procesos de maduración en tomate, fueron estudiadas en este apartado. Para ello se representaron también en la Figura 4.5.14 las diferencias de expresión de los miembros anotados en el genoma de melón. A pesar de que hay cambios de expresión entre las dos líneas, no se observa ninguna tendencia clara ya que en todas las familias hay genes con diferencias de expresión en ambos sentidos. Dentro de la familia MADS-box no encontramos diferencias significativas, pero sí en las familias NAC (4 genes SE en SC3-5-1), F-box (1 gen SE en SC3-5-1 y 4 en PS) y HD-Zip (1 en PS).

Algunos de los genes implicados en el metabolismo de azúcares también mostraron diferencias de expresión entre los dos tipos de maduración: en la línea climatérica SC3-5-1 encontramos una fructoquinasa (*CmFK*) y tres 6-fosfofructoquinasas (*CmPFK*), implicadas en la conversión de fructosa en fructosa-6-P, hasta 11 veces más expresadas que en PS. También más expresadas en SC3-5-1 encontramos otras enzimas relacionadas con en la degradación de almidón (α - y β -amilasas y sacarosa-P sintasa) mientras que en PS se sobreexpresa una almidón sintasa (*CmGBSS*). También encontramos tres transportadores diferencialmente expresados (dos se expresan más en la línea SC3-5-1 y el otro en PS) que podrían estar implicados en la movilización de azúcares hacia el fruto durante la maduración.

El reblandecimiento de la pulpa tiene lugar en ambos tipos de maduración debido a la acción de enzimas que degradan la pared celular, aunque en frutos climatéricos es más intenso. En la línea SC3-5-1 encontramos fuertemente sobreexpresados varios genes implicados en el proceso como poligalacturonasas (*CmPG*), pectinesterasas (*CmPE*), xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas (*CmXTH*), una xilosa isomerasa (*CmXI*), una β -galactosidasa (*CmGAL*), una expansina (*CmEXP1*) y una BETA-D-xilosidasa (*CmXYL*). En la línea no climatérica PS también se sobreexpresa una *CmPG* y dos celulosa sintasas (*CmCEL*).

El último de los procesos relacionados con la maduración del fruto que estudiaremos en este apartado es la producción de compuestos aromáticos típicos de las variedades aromáticas de melón. Encontramos expresión diferencial en genes implicados en la producción de ésteres, aldehídos y alcoholes entre los que destacan transferasas de grupos metil, acil y acetil, esterasas, acyl-CoA sintasas, una alcohol deshidrogenasa (*CmADH*), una metionina gamma liasa (*CmMGL*), una dioxigenasa de ruptura de carotenoides (*CmCCD*), una lipooxigenasa (*CmLOX*) y una alcohol-acil transferasa (*CmAAT1*). Aunque la mayoría de estos genes se expresan más en SC3-5-1, dos aciltransferasas, una esterasa/lipasa y *CmLOX* están más expresadas en PS.

Página siguiente:

Tabla 4.5.3: Genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1. Se indican los datos de expresión diferencial junto con la anotación y el nombre corto de los genes relacionados con los procesos de maduración del fruto. Los genes sobreexpresados e infraexpresados son en SC3-5-1 | RIPE respecto a PS | RIPE.

4.5. Estudio transcriptómico de la maduración del fruto

Proceso	Gen	log2(FoldChange)	FoldChange	p-valor	p-adjustado	SE/IE	Nombre corto	Anotación
Etileno	MEL03C014437	10,5	1474,0	1,8E-28	5,3E-25	SE	Cm1C10T	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 (Cucumis melo) (uniprot_sprotscp Q46441 ACGCO1_CUCUME)
	MEL03C021366	2,4	5,3	9,1E-09	8,4E-07	SE	Cm1ERLBP	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2.3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P42736 RAP23_ARATHI)
	MEL03C017940	3,9	14,9	1,3E-06	7,0E-05	SE	Cm1ERLBP	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2.3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P42736 RAP23_ARATHI)
	MEL03C003696	1,9	3,6	3,6E-06	1,7E-04	SE	Cm1FN3	Similar to F-box-binding F-box protein 2 (Panicum urticoides) (uniprot_sprotscp Q98K90 FBF1_ARATHI)
	MEL03C012211	-1,5	2,8	6,3E-05	1,9E-03	IE	Cm1AM2	Similar to S-adenosylmethionine synthase 2 (Panicum urticoides) (uniprot_sprotscp Q2AT15 METK2_ELAUM)
	MEL03C010735	2,3	4,9	7,1E-05	2,0E-03	SE	Cm1ERLBP	Similar to AP2/ERF and BR domain-containing transcription repressor RAV2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P82280 RAV2_ARATHI)
	MEL03C006451	2,8	7,0	1,0E-04	2,7E-03	SE	Cm1TJ2	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (Pennis setosa) (uniprot_sprotscp Q8VY90 EF106_ARATHI)
	MEL03C010485	-2,1	4,5	1,7E-04	3,3E-02	IE	Cm1R35	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C010779	3,6	12,4	3,1E-03	3,5E-02	SE	Cm1R35	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C011572	-3,8	13,8	3,2E-03	3,5E-02	SE	Cm1R35	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C010366	1,2	4,2	3,9E-03	3,8E-02	SE	Cm1TJ2	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C010532	3,9	15,3	1,4E-07	9,9E-06	SE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C016632	3,9	15,3	1,4E-07	9,9E-06	SE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C007122	-2,5	5,5	2,2E-07	1,5E-05	IE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C025768	2,6	6,2	1,7E-05	6,1E-04	SE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C007834	-2,0	3,9	8,4E-05	3,2E-03	IE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C017898	-4,6	24,2	1,3E-04	3,2E-03	IE	Cm1NAC	Similar to Ubiquitin-protein ligase putative (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotscp Q9ZG09 TLP5_ORYXS)
	MEL03C022162	-4,3	19,7	4,6E-04	8,4E-03	IE	Cm1NAC	Similar to Ubiquitin-protein ligase putative (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotscp Q9ZG09 TLP5_ORYXS)
	MEL03C019845	1,4	2,7	7,3E-04	1,2E-02	SE	Cm1NAC	Similar to BZIP transcription factor (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotscp Q84K00 NAC78_ARATHI)
	MEL03C023195	-3,2	16,5	1,4E-03	1,9E-02	SE	Cm1NAC	Similar to BZIP transcription factor (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotscp Q84K00 NAC78_ARATHI)
	MEL03C010742	-4,0	8,9	1,5E-03	2,0E-02	IE	Cm1NAC	Similar to BZIP transcription factor (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotscp Q84K00 NAC78_ARATHI)
	MEL03C005869	6,9	116,3	1,6E-10	2,2E-08	SE	Cm1WE1E1	Similar to Bidirectional sugar transporter SWEET13b (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscp Q8NAZ9 SW13B_ORYSA)
	MEL03C005795	-3,3	9,8	2,6E-06	1,3E-04	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C022452	4,3	20,3	5,5E-06	2,4E-04	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C007294	1,9	3,7	6,2E-06	2,4E-04	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C026184	-2,5	5,7	8,3E-06	3,5E-04	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C018966	1,1	11,7	4,9E-04	8,9E-03	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C015428	1,2	2,3	7,8E-04	1,2E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C020357	2,0	4,1	8,4E-04	1,3E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C025367	2,2	4,6	1,3E-03	2,0E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C010257	2,8	7,2	2,9E-03	3,5E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C015735	3,4	9,2	3,1E-03	3,5E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C010475	4,1	23,2	2,5E-02	1,4E-14	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C004075	4,1	23,2	2,5E-02	1,4E-14	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C031334	4,8	28,6	2,6E-16	1,3E-13	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
	MEL03C005245	2,0	4,0	1,0E-06	5,6E-05	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)
MEL03C021281	4,7	25,6	1,6E-06	8,3E-05	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C006208	3,7	12,9	8,0E-05	2,2E-03	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C000985	1,5	2,9	9,2E-05	2,5E-03	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C017480	2,8	7,2	1,2E-04	2,7E-03	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C022701	4,4	20,8	1,0E-04	3,1E-03	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C016494	4,4	20,8	1,0E-04	3,1E-03	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C024951	-1,6	3,1	6,9E-04	1,1E-02	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C017478	3,0	8,2	1,8E-03	2,3E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C003441	1,5	2,8	1,8E-03	2,3E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C006690	-2,9	7,7	2,0E-03	2,5E-02	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C025351	-3,0	7,8	2,7E-03	3,1E-02	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C013774	4,6	24,5	3,2E-15	1,3E-12	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C024190	2,7	6,5	5,7E-15	2,0E-12	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C011389	2,8	7,2	3,2E-13	8,1E-11	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C025110	4,4	21,4	2,2E-12	4,3E-10	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C024711	4,0	15,5	1,4E-09	1,6E-07	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C031282	2,6	5,0	2,0E-06	7,4E-05	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C003242	4,8	32,2	4,4E-08	2,4E-07	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C009187	-4,8	38,7	4,4E-06	2,4E-04	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C014482	-3,5	11,0	6,3E-06	2,4E-04	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C006144	3,1	8,7	9,7E-06	3,9E-04	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C024317	-4,3	19,4	4,9E-05	1,6E-03	IE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C009663	2,2	4,5	7,0E-05	2,0E-03	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C003803	3,6	12,0	5,8E-04	1,0E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C012182	4,2	18,5	6,5E-04	1,1E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C006545	1,7	3,3	1,7E-03	2,3E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C013705	-1,9	3,6	1,9E-03	3,2E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C014090	3,8	14,0	2,7E-03	3,2E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C016290	3,6	12,3	3,0E-03	3,4E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C008100	1,6	3,2	3,0E-03	3,4E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C016224	1,7	3,9	3,1E-03	3,4E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C014897	1,6	3,0	3,8E-03	4,0E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
MEL03C014899	1,2	2,3	3,8E-03	4,0E-02	SE	Cm1RBY	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (amylolipase) (Amaranthus nutans) (uniprot_sprotscp O82627 SSG1_ANTMA)	
Metabolismo de azúcares	MEL03C001592	10,5	1474,0	1,8E-28	5,3E-25	SE	Cm1C10T	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 (Cucumis melo) (uniprot_sprotscp Q46441 ACGCO1_CUCUME)
	MEL03C021366	2,4	5,3	9,1E-09	8,4E-07	SE	Cm1ERLBP	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2.3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P42736 RAP23_ARATHI)
	MEL03C017940	3,9	14,9	1,3E-06	7,0E-05	SE	Cm1ERLBP	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2.3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P42736 RAP23_ARATHI)
	MEL03C003696	1,9	3,6	3,6E-06	1,7E-04	SE	Cm1FN3	Similar to F-box-binding F-box protein 2 (Panicum urticoides) (uniprot_sprotscp Q98K90 FBF1_ARATHI)
	MEL03C012211	-1,5	2,8	6,3E-05	1,9E-03	IE	Cm1AM2	Similar to S-adenosylmethionine synthase 2 (Panicum urticoides) (uniprot_sprotscp Q2AT15 METK2_ELAUM)
	MEL03C010735	2,3	4,9	7,1E-05	2,0E-03	SE	Cm1ERLBP	Similar to AP2/ERF and BR domain-containing transcription repressor RAV2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P82280 RAV2_ARATHI)
	MEL03C006451	2,8	7,0	1,0E-04	2,7E-03	SE	Cm1TJ2	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (Pennis setosa) (uniprot_sprotscp Q8VY90 EF106_ARATHI)
	MEL03C010485	-2,1	4,5	1,7E-04	3,3E-02	IE	Cm1R35	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C010779	3,6	12,4	3,1E-03	3,5E-02	SE	Cm1R35	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C011572	-3,8	13,8	3,2E-03	3,5E-02	SE	Cm1R35	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C010366	1,2	4,2	3,9E-03	3,8E-02	SE	Cm1TJ2	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C010532	3,9	15,3	1,4E-07	9,9E-06	SE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C016632	3,9	15,3	1,4E-07	9,9E-06	SE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C007122	-2,5	5,5	2,2E-07	1,5E-05	IE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C025768	2,6	6,2	1,7E-05	6,1E-04	SE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C007834	-2,0	3,9	8,4E-05	3,2E-03	IE	Cm1NAC	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9CA47 ERF105_ARATHI)
	MEL03C017898	-4,6	24,2	1,3E-04	3,2E-03	IE	Cm1NAC	Similar to Ubiquitin-protein ligase putative (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotscp Q9ZG09 TLP5_ORYXS)
	MEL03C022162	-4,3	19,7	4,6E-04	8,4E-03	IE	Cm1NAC	Similar to Ubiquitin-protein ligase putative (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotscp Q9ZG09 TLP5_ORYXS)
	MEL03C019845	1,4	2,7	7,3E-04	1,2E-02	SE	Cm1NAC	Similar to BZIP transcription factor (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotscp Q84K00 NAC78_ARATHI)
	MEL03C023195	-3,2	16,5	1,4E-03	1,9E-02			

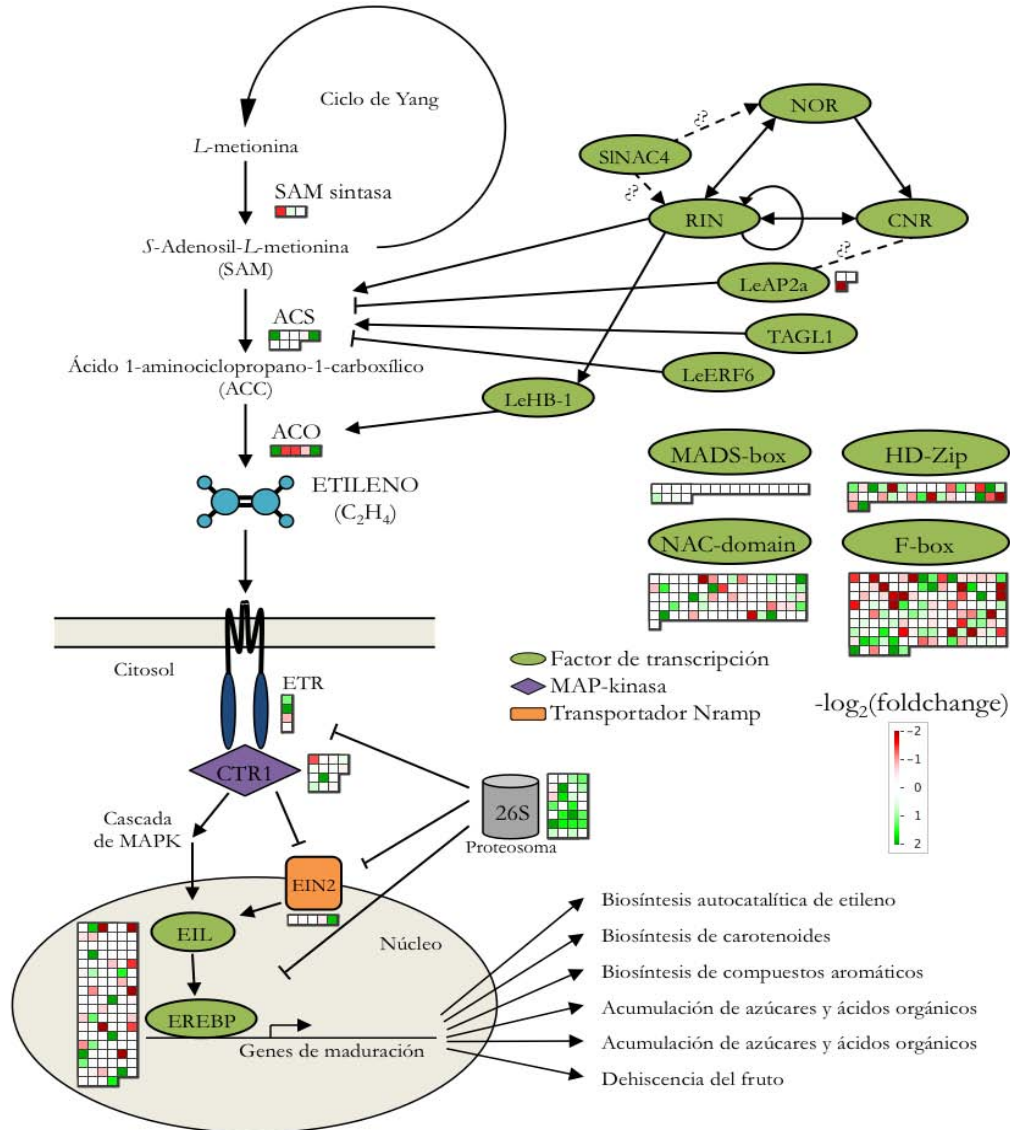


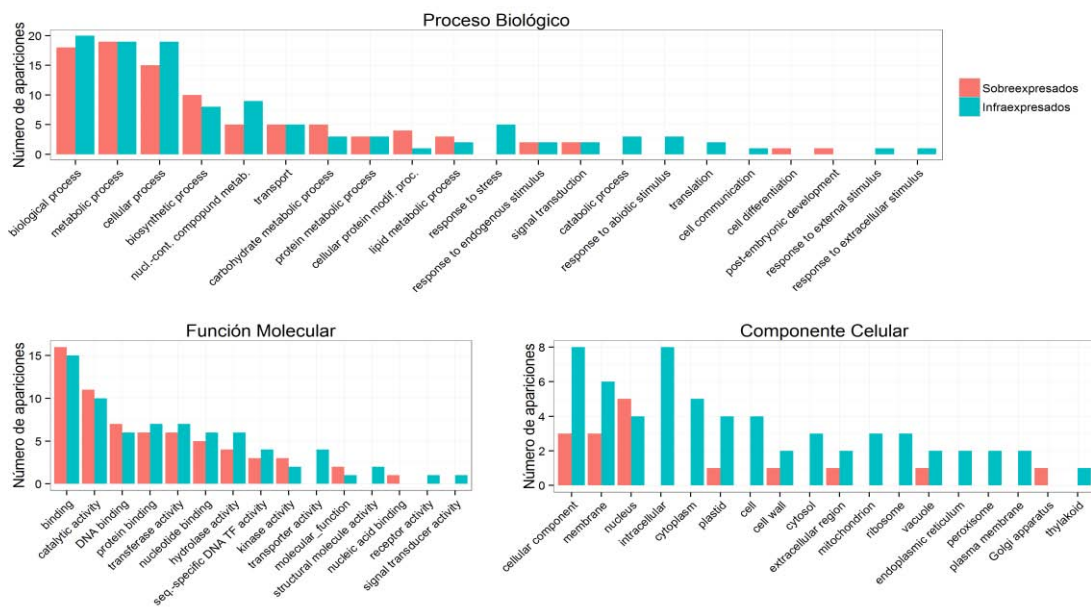
Figura 4.5.14: Diferencias de expresión de los genes implicados en la ruta del etileno entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1 y de factores de transcripción relacionados con su regulación. Representación realizada en Mapman 3.6.0 con los datos obtenidos de DESeq2 1.8.0 y la Figura 1.4 de este trabajo de tesis. Cada cuadrado representa un gen de la Tabla A.4.5.6 del Anexo, el color rojo indica mayor expresión en PS y el color verde en SC3-5-1.

Caracterización de genes con expresión diferencial entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración

Con el programa DESeq2, a través de la opción para realizar análisis multivariantes conceptualmente similares a un ANOVA, se extrajeron aquellos genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo del proceso de maduración. Utilizando el mismo criterio que con los contrastes de los apartados anteriores (p-valor ajustado < 0.05), fueron encontrados 82 genes DE, de los cuales 39 son SE y 43 IE (Tabla A.4.5.1e en el Anexo). En este caso los conceptos de SE e IE varían respecto a los utilizados anteriormente: en un gen SE la expresión aumenta a lo largo de la maduración en la línea PS y disminuye en la línea SC3-5-1, mientras que en un gen IE ocurre lo contrario: su expresión disminuye en PS y aumenta en SC3-5-1 durante la maduración. Para la caracterización de los genes DE detectados en este apartado se siguieron los mismos pasos que en el anterior: primero se

realizó una anotación funcional y después se analizó la expresión de genes involucrados en los principales procesos relacionados con la maduración del fruto. El resumen de la anotación funcional (Tabla A.4.5.4 en el Anexo, representados en la Figura 4.5.15) indica que los dos conjuntos de genes contienen un número similar de términos GO asociados en las categorías de proceso biológico y función molecular pero que en el componente celular existen diferencias entre ambos. Tras el análisis de enriquecimiento de términos GO asociados con los genes DE respecto al genoma de referencia (Tabla A.4.5.5 en el anexo), encontramos enriquecimiento solamente en los genes IE dentro de las categorías de proceso biológico y función molecular, entre las que destacan los canales de agua y la respuesta al nivel de oxígeno (Figura 4.5.16).

Figura 4.5.15: Abundancia de términos GO en los genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración. Resumen de términos GO obtenido con GOSlim utilizando la ontología GOSlim-Plant. Los términos sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (azul) son en SC3-5-1 | RIPE respecto a PS | RIPE.



Los genes relacionados con los procesos de maduración del fruto estudiados a continuación están recogidos en la Tabla 4.5.4 y su expresión está representada en la Figura 4.5.17. En el conjunto de genes DE encontramos 4 factores de transcripción *CmEREBP* implicados en la señalización de etileno cuya expresión incrementa en SC3-5-1 y baja en PS a lo largo de la maduración. De las familias de factores de transcripción MADS-box, NAC/NAM, F-box y HD-Zip ninguno de sus miembros mostraron diferencias de expresión significativas en este análisis. Relacionados con el metabolismo de azúcares encontramos solamente un gen DE: un *CmFRU* cuya expresión disminuye en PS pero se mantiene alta en SC3-5-1; y con el metabolismo de pared celular encontramos tres genes diferencialmente expresados: dos *CmXTH*, un *CmXI* (ambos IE) y un *CmPG* (SE). En cuanto a la producción de compuestos aromáticos, en este análisis se ha encontrado un gen sobreexpresado (*CmGLIP*) y dos infraexpresados (*CmDCR* y *CmCCOAO*). A raíz de que el transporte y los canales de agua son dos términos GO enriquecidos en el conjunto de genes IE (Tabla A.4.5.5 en el Anexo) buscamos genes DE relacionados con estos procesos y encontramos tres genes que codifican acuaporinas infraexpresados (dos *CmPIP* y un *CmTIP*). Tal y como puede verse en la Figura 4.5.17, el patrón de expresión de los tres genes es distinto y sugiere que el transporte de agua en las dos líneas estudiadas se lleva a cabo con proteínas diferentes según el estadio de maduración del fruto.

Figura 4.5.16: Análisis de enriquecimiento de términos GO en los genes IE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración. Resultados obtenidos con el plugin BinGO 2.44 de Cytoscape. Las relaciones jerárquicas entre los términos se representan mediante la posición y las conexiones por flechas, la cantidad de genes relacionados se indica mediante el tamaño y el nivel de significación del test estadístico mediante el color. Los términos están enriquecidos en el conjunto de genes infraexpresados (SC3-5-1|RIPE < PS|RIPE) respecto al genoma de referencia (v3.5.1).

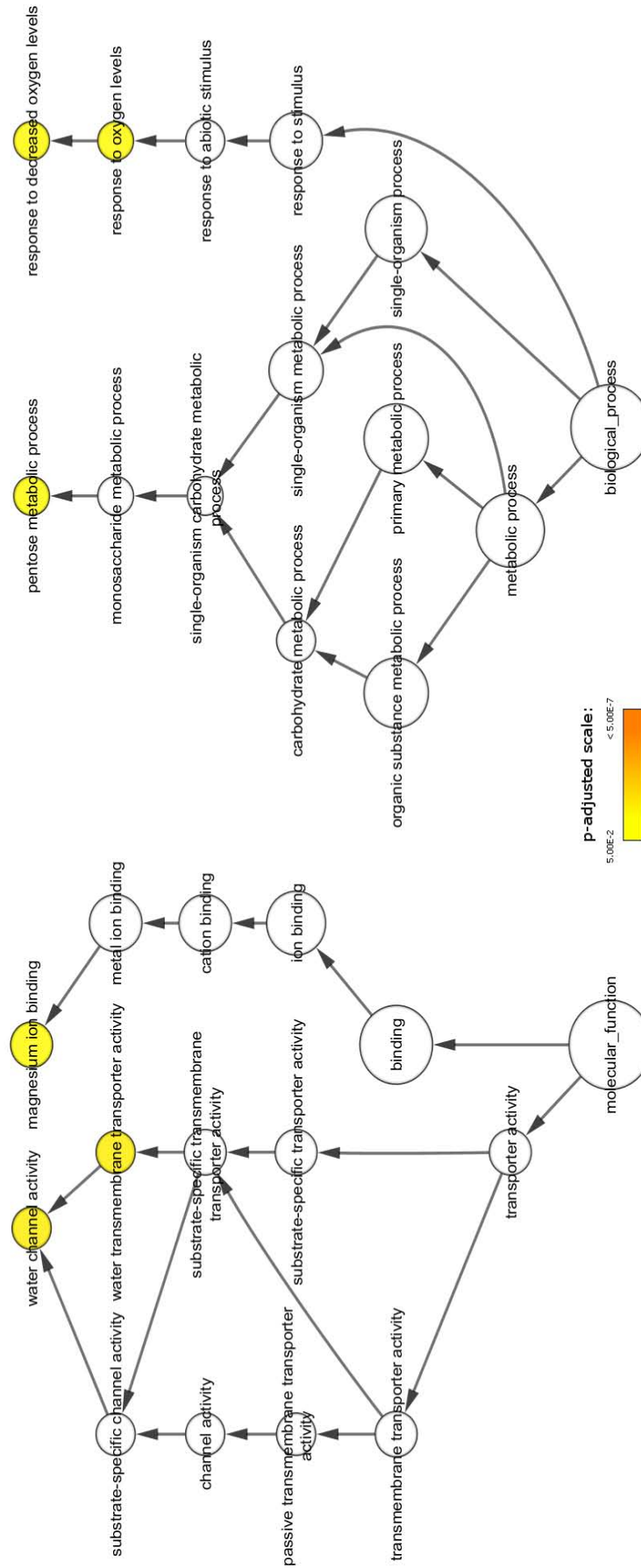


Figura 4.5.17: Expresión de algunos genes de interés DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración. Se indica el nombre abreviado y entre paréntesis el código del gen en la versión 3.5.1 del genoma. Los resultados estadísticos de los genes mostrados se encuentran en la Tabla 4.5.4.

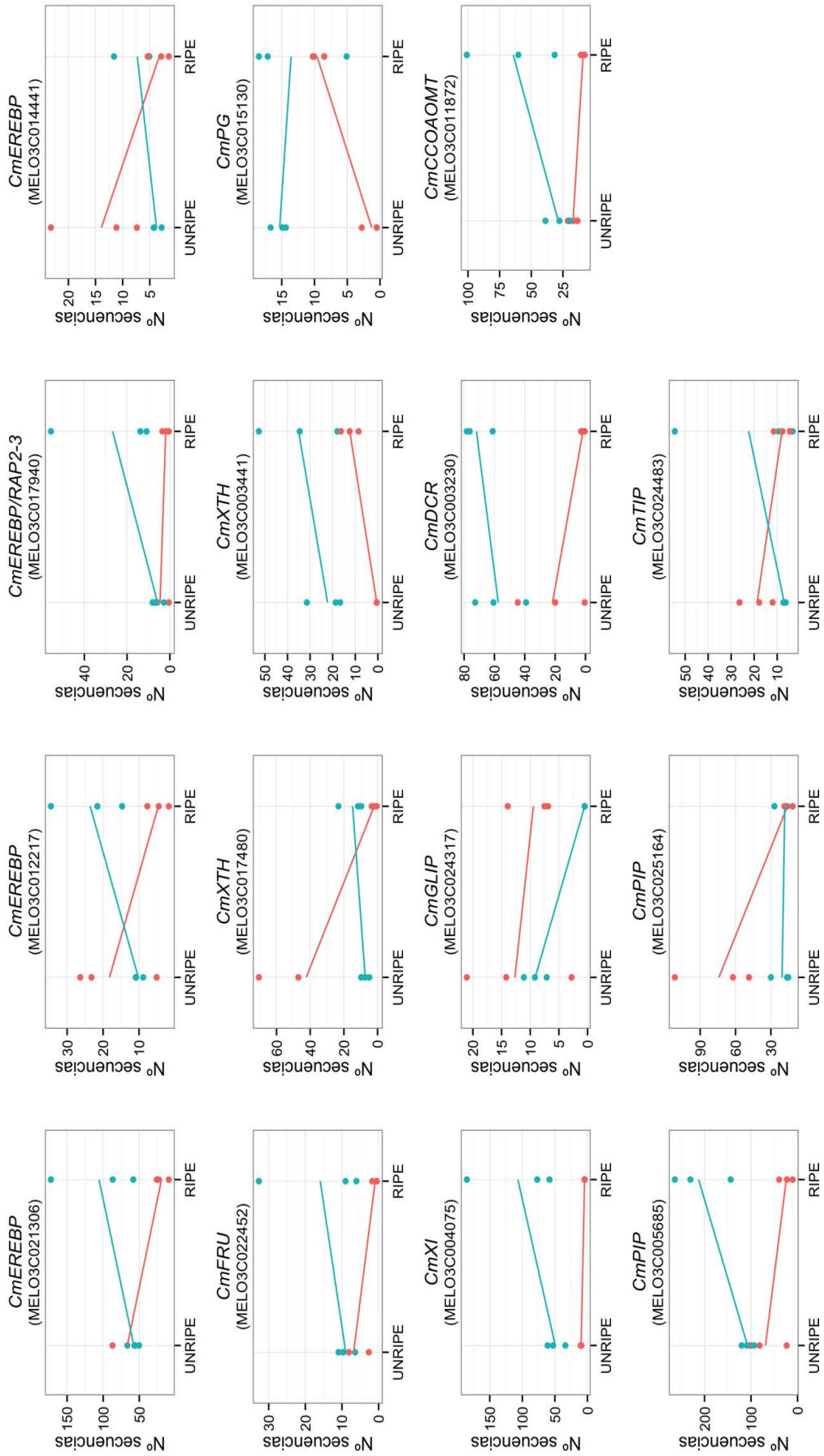


Tabla 4.5.4: Genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración. Se indican los datos de expresión diferencial junto con la anotación y el nombre corto de los genes relacionados con los procesos de maduración del fruto. En los genes sobreexpresados la expresión aumenta a lo largo de la maduración en la línea PS y disminuye en la línea SC3-5-1, y en los infraexpresados su expresión disminuye en PS y aumenta en SC3-5-1 durante la maduración.

Proceso	Gen	p-valor	p-ajustado	SE/IE	Nombre corto	Anotación
Etileno	MELO3C021306	6,2E-06	1,2E-03	IE	<i>CmEREBP</i>	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42736 RAP23_ARATH)
	MELO3C012217	2,0E-05	2,7E-03	IE	<i>CmEREBP</i>	Similar to AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor RAV2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P82280 RAV2_ARATH)
	MELO3C017940	4,7E-04	2,1E-02	IE	<i>CmEREBP/RAP2-3</i>	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42736 RAP23_ARATH)
	MELO3C014441	9,1E-04	3,1E-02	IE	<i>CmEREBP</i>	Similar to Ethylene-responsive transcription factor 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O80339 ERF82_ARATH)
	MELO3C022452	3,5E-04	1,8E-02	IE	<i>CmFRL1</i>	Similar to Probable fructokinase-4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M1B9 SCRK4_ARATH)
Metabolismo de azúcares	MELO3C017480	1,0E-09	1,1E-06	IE	<i>CmXTH</i>	Similar to Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38857 XTH22_ARATH)
	MELO3C003441	1,8E-05	2,6E-03	SE	<i>CmXTH</i>	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38908 XTH30_ARATH)
	MELO3C015130	1,3E-04	9,7E-03	SE	<i>CmPG</i>	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P48979 PGLR_PRSEE)
	MELO3C004075	1,8E-03	4,5E-02	IE	<i>CmXI</i>	Similar to Xylose isomerase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9PHK7 XYL_A_ARATH)
	MELO3C024317	1,7E-04	1,1E-02	SE	<i>CmGLIP</i>	Similar to GDSL esterase/lipase 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SSA7 GLIP5_ARATH)
Metabolismo de compuestos aromáticos	MELO3C003230	8,4E-04	2,9E-02	IE	<i>CmDCR</i>	Similar to BAH1D acyltransferase DCR (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9HF86 DCR_ARATH)
	MELO3C011872	2,0E-05	4,9E-02	IE	<i>CmCCO4OMT</i>	Similar to Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (Populus kitalamiensis PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P93711 CAMT1_POPIK)
	MELO3C005685	6,0E-05	6,1E-03	IE	<i>CmPIP</i>	Similar to Aquaporin PIP1-2 (Zea mays) (uniprot_sprotsp Q9X159 PIP12_MAIZE)
	MELO3C025164	8,7E-04	3,0E-02	IE	<i>CmPIP</i>	Similar to Probable aquaporin PIP1-5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LAA6 PIP15_ARATH)
	MELO3C024483	1,5E-03	4,1E-02	IE	<i>CmTIP</i>	Similar to Aquaporin TIP1-1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P25818 TIP1_ARATH)

Tabla 4.5.5: Comparativa de genes DE en este trabajo y en Saladié y colaboradores (2015). Se comparan los valores de la transformación logarítmica en base 2 del “fold change” de los dos trabajos. Se indica el nombre corto del gen utilizado anteriormente (Saladié *et al.* 2015) y la anotación según la versión 3.5.1 del genoma de referencia.

Gen	Nombre corto	log ₂ (FoldChange) (capítulo 4.5)	log ₂ (FoldChange) (Saladié et al., 2015)	Anotación
MELO3C014437	<i>CmACO1</i>	10,5	7,21	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 (Cucumis melo) (uniprot_sprotsp Q04644 ACCO1_CUCME)
MELO3C017940	<i>CmEREBP/CmR-AP2-3</i>	3,9	3,64	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42736 RAP23_ARATH)
MELO3C010779	<i>CmACS5</i>	3,6	8,46	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9STIR4 HA17_ARATH)
MELO3C016536	<i>CmNAC</i>	4,0	5,80	Similar to NAC domain-containing protein 72 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q93YV3 NAC72_ARATH)
MELO3C010632	<i>CmNAC</i>	3,9	2,58	Similar to NAC domain-containing protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q39013 NAC2_ARATH)
MELO3C023195	<i>CmNAC</i>	4,0	2,14	Similar to NAC domain-containing protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q39013 NAC2_ARATH)
MELO3C022062	<i>CmHD-3ip</i>	-4,3	-7,32	Similar to BZIP transcription factor (Cucumis melo subsp. melo) (uniref90 UniRef90_E5GCT10)
MELO3C005795	<i>CmGBVS</i>	-3,3	-4,14	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic (Antirrhinum majus) (uniprot_sprotsp O82627 SSG_ANTMA)
MELO3C022452	<i>CmFK</i>	4,3	2,44	Similar to Probable fructokinase-4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M1B9 SCRK4_ARATH)
MELO3C016494	<i>CmPG</i>	4,4	6,54	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C006690	<i>CmPG</i>	-2,9	-2,90	Similar to Probable polygalacturonase (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp A7PZL3 PGLR_VITV1)
MELO3C017478	<i>CmXTH</i>	3,0	-2,25	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38910 XTH23_ARA)
MELO3C021281	<i>CmXYL</i>	4,7	3,06	Similar to Beta-D-xylosidase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9JFGY BXL_ARATH)

4.5.3. Discusión

La secuenciación masiva del transcriptoma de frutos maduros e inmaduros de las líneas PS y SC3-5-1 y el estudio de expresión diferencial realizado en este capítulo han puesto de manifiesto las grandes diferencias a nivel de expresión génica que hay entre la maduración climatérica y no climatérica en melón. Antes de comenzar con la discusión de los resultados es necesario aclarar que aunque todo el trabajo de análisis bioinformático ya ha sido realizado, éste todavía necesita ser validado mediante la comprobación de los niveles de expresión de algunos genes mediante PCR cuantitativa, como es habitual para este tipo de experimento (Fang & Cui 2011).

El preprocesamiento de las secuencias es un paso necesario en cualquier experimento de RNA-Seq, ya que la calidad de las genotecas tras la secuenciación es muy inferior a lo aceptable. Teniendo en cuenta la rápida evolución de las tecnologías de secuenciación masiva, los archivos de lecturas obtenidos del equipo 454-Roche estaban por debajo de los estándares actuales tal y como se refleja en el número de nucleótidos y secuencias eliminadas. Tras este paso de limpieza el mapeado contra el genoma de referencia fue comparable al de experimentos de RNA-seq recientes en cuanto a la eficiencia (Kumar *et al.* 2012; Fujisawa *et al.* 2014). Aunque el número de lecturas es bajo (casi un millón en total) comparado con trabajos de RNA-seq actuales utilizando tecnología Illumina (alrededor de 40 millones de lecturas por muestra) la calidad del mapeado (88% de lecturas mapeadas en genes) nos indica que los resultados son fiables.

Tras el recuento de lecturas realizamos un análisis exploratorio de la expresión génica que nos permitió separar perfectamente las muestras de las líneas PS y SC3-5-1, pero no los triplicados pertenecientes a cada punto de maduración. Esto sugiere que la expresión en frutos maduros e inmaduros dentro de cada línea no es muy diferente, especialmente en el caso de SC3-5-1 (Figura 4.5.7), pero las diferencias son más grandes entre PS y SC3-5-1 sea cual sea el punto de maduración que se compare. El bajo número de genes DE entre frutos maduros e inmaduros de la misma línea (Tabla 4.5.2 contrastes 1 y 2) y el bajo número de genes IE y SE en común a lo largo de la maduración de cada línea (Figura 4.5.9A-B) también apoyan esta posibilidad. El hecho de que una de las tres réplicas de fruto inmaduro de cada genotipo esté más cerca de las muestras maduras en las figuras 4.5.6 y 4.5.7 indica que los frutos supuestamente inmaduros ya habían comenzado a expresar genes relacionados con la maduración. En este capítulo se decidió continuar adelante con el análisis estadístico utilizando los triplicados, pero se podría valorar la posibilidad de eliminar estas dos réplicas para maximizar el número de genes DE a lo largo de la maduración.

Expresión diferencial entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1

Un trabajo muy similar al que aquí se presenta es el realizado por Saladié y colaboradores (2015) y consistió en comparar el transcriptoma de frutos maduros de las líneas PS y “Védrantais” utilizando una micromatriz de DNA con aproximadamente el 38% de los genes actualmente anotados en el genoma de referencia. La Tabla 4.5.5 contiene aquellos genes que muestran diferencias de expresión en los dos experimentos y que están relacionados con la maduración del fruto. Utilizando los valores del \log_2 (“fold change”) encontramos una correlación significativa entre ambos experimentos (corr. 0,84, p-valor = 0,0004) y solamente el gen *CmXTH MELO3C01748* muestra diferencias de expresión en sentidos opuestos. Este hecho sugiere que, a pesar de que SC3-5-1 tiene un fondo genético

inodorus y “Védrantais” *cantalupensis*, la regulación de la expresión de una parte de los genes implicados en la maduración climatérica del fruto es muy parecida.

De todos los genes diferencialmente expresados relacionados con la biosíntesis y señalización del etileno destaca *CmACO1*, que es el que mayor diferencia de expresión presenta en todo el análisis: en SC3-5-1 se detectan un promedio de 1.084 lecturas mapeadas contra el gen en los triplicados mientras que en PS no se detecta ninguna. Hasta donde sabemos, *CmACO1* era el único gen de la familia que mostraba sobreexpresión durante la maduración del fruto climatérico (Lasserre *et al.* 1996; Saladie *et al.* 2015), pero en este experimento *CmACO5* también se sobreexpresa en el fruto maduro de SC3-5-1. Igualmente cabe destacar el gen *CmACS5*, sobreexpresado en SC3-5-1 y que, además de participar en la biosíntesis de etileno durante la maduración, también está relacionado con la determinación sexual de las flores de melón (Boualem *et al.* 2015). Especial atención merecen los cuatro factores de transcripción *CmNAC* más expresados en SC3-5-1 que en PS ya que tres de ellos (*MELO3C016536*, *MELO3C01632* y *MELO3C023195*) también se sobreexpresan en “Védrantais” (el cuarto *CmNAC*, *MELO3C019845*, no estaba incluido en la micromatriz). La expresión del gen *CmNAC MELO3C016540*, identificado y validado como responsable del QTL *eth6.3* en los capítulos anteriores de esta tesis, no mostró diferencias significativas, aunque la expresión en la línea SC3-5-1 fue superior a la de PS en los dos puntos de maduración. En la micromatriz de DNA, el gen *MELO3C016540* mostró una expresión muy alta en las líneas PS, SC, “Védrantais” y “Dulce” durante todo el desarrollo del fruto y la maduración sin diferencias significativas (Saladie *et al.* 2015). El *CmNAC MELO3C016536* mencionado anteriormente es el que está situado a tan solo 139 Kb del anterior y se expresa en SC3-5-1 unas 15 veces más que en PS. Respecto al resto de familias de factores de transcripción, solamente hay un *CmHD-zip* (*MELO3C0122063*) sobreexpresado en ambas líneas climatéricas respecto a PS en los dos trabajos.

El reblandecimiento de la pared celular es un proceso que en melón está regulado parcialmente por etileno (Guis *et al.* 1997) y se cree que los conjuntos de enzimas implicadas son diferentes en frutos climatéricos y no climatéricos (Saladie *et al.* 2015). En nuestro trabajo, la mayoría de genes DE involucrados en este proceso se expresan más en el fruto maduro de SC3-5-1, pero también encontramos varios genes expresados en PS cuya regulación podría ser independiente de etileno: un *CmPG* (*MELO3C006690*) y dos *CmCEL* (*MELO3C023551* y *MELO3C023951*). La síntesis de azúcar es un proceso independiente de etileno pero encontramos un mayor número de genes sobreexpresados en SC3-5-1. El contenido de sólidos solubles en los frutos maduros de esta línea y PS no muestra diferencias significativas (Vegas *et al.* 2013) por lo que el papel de estas enzimas durante la maduración de SC3-5-1 podría no estar relacionado con la síntesis o degradación de azúcares sino con su movilización (hay tres transportadores de azúcar DE). Finalmente, el balance del número de genes diferencialmente expresados en el apartado de biosíntesis de aromas está claramente desplazado hacia la línea SC3-5-1 pero no es extraño teniendo en cuenta que es un proceso regulado por el etileno y que PS produce muy pocos compuestos aromáticos (Ayub *et al.* 1996; Obando-Ulloa *et al.* 2008).

Como hemos visto, la distribución de los 617 genes DE es desigual entre las introgresiones. La introgresión en el cromosoma III contiene 34 genes DE, lo que supone un 0,027% del total de 1.270 genes dentro de la introgresión. La introgresión en el cromosoma VI contiene 20 genes DE (0,015% de 1.378 genes) y por último la introgresión contaminante del XI contiene 5 genes DE (0,040% de 127 genes). Si consideramos todos los genes DE dentro de las tres introgresiones y las comparamos con los genes DE en el resto del genoma no se obtienen diferencias significativas según un test de Fischer. El hecho de que

no se encuentre un enriquecimiento de genes DE dentro de las introgresiones de la línea SC3-5-1 sugiere que las diferencias de expresión son a nivel global y que probablemente sean debidos a la acción en *trans* de un factor de transcripción situado muy arriba en la escala de regulación de la biosíntesis de etileno y de la maduración climatérica en general.

Expresión diferencial a lo largo de la maduración entre las líneas PS y SC3-5-1

El contraste entre las muestras SC3-5-1|RIPE y PS|RIPE resultó muy informativo por cuanto que fueron encontrados muchos genes DE relacionados con los principales procesos de maduración del fruto. Sin embargo, el análisis multivariante realizado en la segunda parte del análisis del RNA-Seq ha destacado dos aspectos que pasaron desapercibidos en el contraste anterior: el transporte de agua y la respuesta al nivel de oxígeno. Durante la maduración del fruto de la línea SC3-5-1 encontramos SE tres genes que codifican acuaporinas, un tipo de canal de agua cuya expresión ha sido asociada con cambios en el nivel hídrico del fruto de tomate y fresa, aunque no se conoce bien su función (Shiota *et al.* 2006; Alleva *et al.* 2010). La respuesta al nivel de oxígeno podría estar relacionada con el aumento de la tasa de respiración típico de los frutos climatéricos como SC3-5-1 y que no ocurre en PS (Obando-Ulloa *et al.* 2008). El futuro estudio de estos dos procesos puede complementar al resto de los anteriormente descritos, completando el esquema de los cambios metabólicos ocurridos durante la maduración climatérica y no climatérica.

Perspectivas de futuro

Actualmente se está preparando un nuevo experimento transcriptómico del fruto en el que se utilizarán, además de las líneas PS y SC3-5-1, las dos líneas que contienen alelos de SC en homocigosis para uno de los dos QTL: GF35 (*eth3.5*) y GF40 (*eth6.3*) en tres estadios de la maduración (20 DAP, 30 DAP y H). Durante los últimos meses de esta tesis doctoral se han recogido las muestras y se han realizado la mayoría de extracciones de RNA, que pronto serán enviadas al CNAG (Centro Nacional de Análisis Genómico, Barcelona) para su secuenciación utilizando tecnología Illumina. Los resultados de este futuro experimento permitirán una caracterización más profunda de los cambios transcriptómicos ocurridos durante la maduración del fruto, qué relación pueden tener con los cambios fenotípicos observados entre las líneas y de qué modo el gen *MELO3C016540*, responsable del comportamiento climatérico en las líneas portadoras de *eth6.3*, podría estar regulando el componente climatérico de la maduración en melón.

La posibilidad de que los resultados de este segundo RNA-seq sean más completos que el presente es muy alta teniendo en cuenta que la tecnología de secuenciación que se utilizará ofrece una mayor profundidad de secuenciación. Por tanto el presente trabajo tiene que servir como un primer análisis exploratorio que guíe la interpretación de los resultados futuros, que sin duda será más compleja. De todas formas, los ficheros de lecturas obtenidos en este experimento ya han sido utilizados para producir una nueva anotación del genoma de referencia (versión 3.6) que facilitará el análisis del futuro RNA-seq.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados en esta tesis doctoral han permitido la identificación, caracterización y validación del gen *MELO3C016540* como el responsable del QTL *eth6.3*, que induce una maduración climatérica en los frutos de melón. De forma complementaria, se ha realizado un estudio transcriptómico del fruto de la línea SC3-5-1 (portadora de *eth3.5* y *eth6.3*) y PS observándose una reprogramación genética entre frutos maduros e inmaduros de las dos líneas. En conjunto, este trabajo ha permitido profundizar en el estudio de la regulación de la maduración en melón y comenzar a entender las diferencias entre frutos climatéricos y no climatéricos de esta especie.

Identificación y caracterización de *MELO3C016540* como candidato para *eth6.3*

El QTL *eth6.3*, objeto de estudio de esta tesis doctoral, fue detectado junto con *eth3.5* durante la caracterización de la NIL SC3-5-1, obtenida a partir del cruzamiento entre los parentales PS y SC (Eduardo *et al.* 2005; Moreno *et al.* 2008; Vegas *et al.* 2013). A pesar de que ambos parentales son no climatéricos, al menos desde un punto de vista clásico como veremos más adelante, los frutos de SC3-5-1 mostraron una maduración claramente climatérica que incluye, principalmente, la biosíntesis de etileno, el desarrollo de una capa de abscisión, el cambio de color externo de verde a amarillo, la producción de aromas característicos y el reblandecimiento de la pulpa (Obando-Ulloa *et al.* 2008; Vegas *et al.* 2013). Aunque ambos QTLs son capaces de inducir la maduración climatérica por separado, cuando los dos están presentes se produce una intensificación de la síntesis de etileno y, consecuentemente, de los demás procesos antes mencionados. Además, tanto *eth3.5* como *eth6.3* muestran un fuerte componente ambiental que provoca diferencias entre temporadas en el tiempo que tarda el fruto en madurar (Vegas *et al.* 2013; ver cap. 4.1). El gen *MELO3C016540* identificado en el cap. 4.1 como responsable de la maduración climatérica inducida por *eth6.3* es un factor de transcripción de la familia NAC, cuyos miembros han sido relacionados con la regulación de una gran variedad de procesos biológicos entre los que se encuentran la senescencia y la maduración del fruto (Puranik *et al.* 2012). Dos de los principales reguladores de la maduración del fruto en tomate pertenecen a esta familia: los genes *SINAC4* (Zhu *et al.* 2014) y *SINAC-NOR* (patente US 6.762.347 B1, Giovannoni 2004). La similitud a nivel de secuencia proteica de *MELO3C016540* con *SINAC-NOR* motivó su denominación como CmNOR en anteriores trabajos (Dahmani-Mardas *et al.* 2010; Saladie *et al.* 2015) que comentaremos a continuación. Como se puede observar en la Figura 5.1a, en la que se representa un árbol filogenético con las proteínas de la familia NAC en melón y otras proteínas NAC de distintas especies y función conocida (utilizadas en las figuras 4.2.1 y 4.2.6 del cap. 4.2, respectivamente), CmNOR forma parte del mismo clado que *SINAC-NOR* y no parece haber sufrido duplicaciones recientes.

En el primer trabajo se buscaron mutantes mediante TILLING en una colección generada a partir de la variedad climatérica “Charentais Mono” para algunos genes involucrados en maduración de fruto incluyendo CmNOR. En una de las familias de mutantes identificadas para CmNOR, portadora de la mutación E59K, se apreció un retraso en los días desde la polinización hasta el fruto maduro (Dahmani-Mardas *et al.*, no publicado). En esta tesis doctoral, las alteraciones fenotípicas observadas en frutos de dos familias mutantes en el dominio NAC de CmNOR (familias 246 y 432 con mutaciones E59K y P129L respectivamente) permitieron su validación como gen responsable de *eth6.3*. Por tanto, la familia 246 (mutación E59K) ha dado resultados significativos en estos dos trabajos, aunque el método de fenotipado utilizado para la caracterización de los mutantes fue distinto.

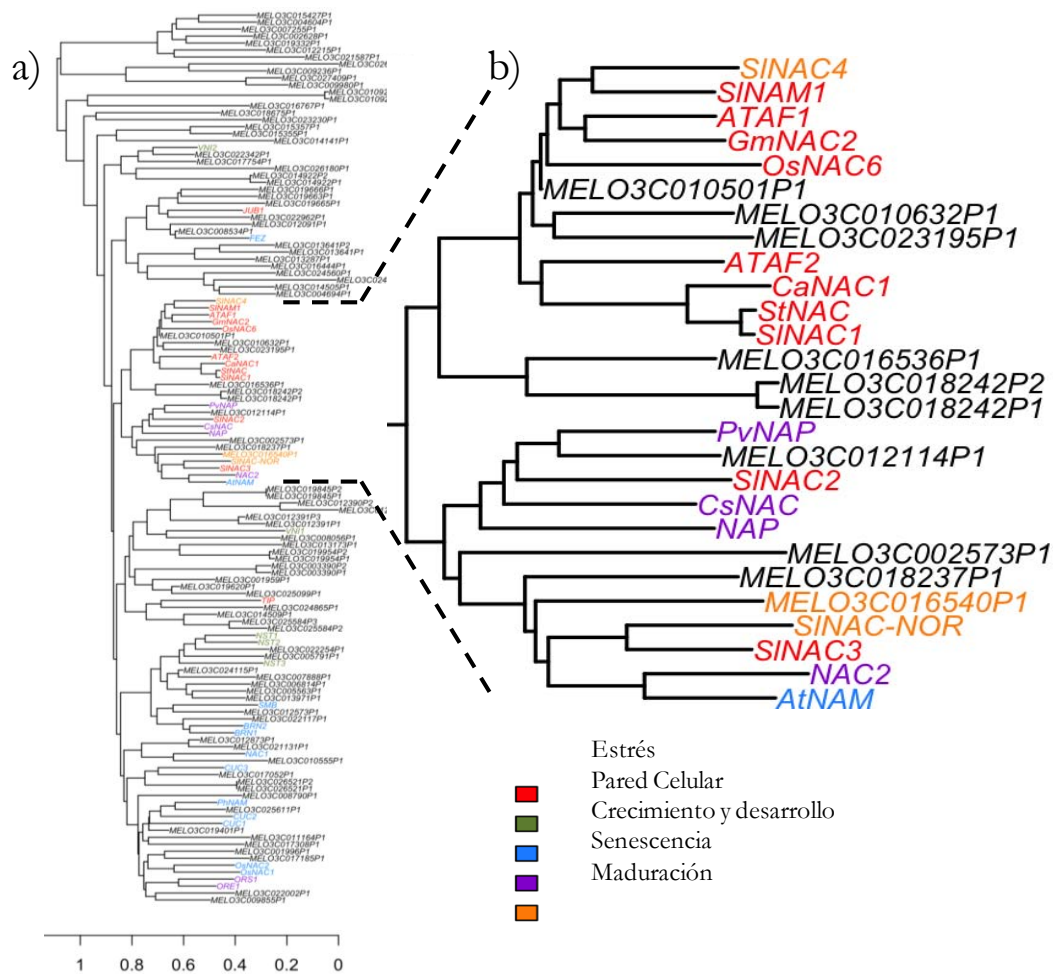


Figura 5.1: Análisis filogenético de las proteínas CmNAC y proteínas de la familia NAC de otras especies. a) Cladograma construido a partir del alineamiento múltiple de 128 secuencias proteicas provenientes de las figuras 4.2.1 y 4.2.6 (tablas 3.6 y A.4.2.1) mediante el método N-J en MEGA 6 y representado con R. **b)** detalle del clado señalado por líneas discontinuas en el que se encuentran la proteína CmNOR (MELO3C016540P1), SINAC-NOR y SINAC4. Los prefijos de las secuencias indican la especie de origen: Sl: *S. lycopersicum*. Os: *O. sativa*. Gm: *G. max*. Ca: *C. annuum*. St: *S. tuberosum*. Cs: *C. sinensis*. Ph: *P. hybrida*. Pv: *P. vulgaris*. Las proteínas de *Arabidopsis* no tienen prefijo a excepción de AtNAM. Los colores indican el proceso biológico en el que están implicadas: estrés biótico y abiótico (rojo), metabolismo de pared celular (verde), crecimiento y desarrollo vegetal (azul), senescencia (violeta) y maduración (naranja). Para mayor detalle ver cap. 4.2.

En el segundo de los trabajos antes mencionados se analizó el transcriptoma del fruto durante la maduración en variedades de melón tanto climatéricas como no climatéricas, detectándose una alta expresión de *CmNOR* durante todo el proceso de desarrollo y maduración del fruto pero sin observar diferencias significativas entre las líneas estudiadas: dos típicamente climatéricas (“Védrantais” y “Dulce”) y dos no climatéricas (PS y SC) (Figura 5.2a) (Saladie *et al.* 2015). En esta tesis doctoral se analizó la expresión de *CmNOR* a lo largo de la maduración en las líneas SC3-5-1 y PS observándose una ligera disminución en la primera y un leve aumento en la segunda, aunque las diferencias no son significativas (Figura 5.2b, ver cap. 4.5). Estos resultados sugieren que la inducción de la maduración climatérica observada en las líneas con *eth6.3* no sería debida a las diferencias de expresión

de *CmNOR* sino a otras causas, como mutaciones en su secuencia codificante o en la regulación de su traducción a proteína según se comentó anteriormente (cap. 4.5.).

En el estudio del panel de 54 variedades de melón realizado en el cap. 4.2 se detectaron 7 polimorfismos asociados con el tipo de maduración, dos de los cuales producen cambios no sinónimos (sustituciones A108S y S236N) que, sin embargo, podrían ser descartados por la posición del marcador FR14-P22 en el mapeo de *eth6.3* (Vegas *et al.* 2013; ver cap. 4.2). Por tanto, serían los polimorfismos situados aguas arriba de este marcador en *CmNOR* los causales de las diferencias fenotípicas, como el INDEL-126 situado en el 5'-UTR, que presenta diferencias de hasta 28 bp entre PS y “Védrantais” y que podría tener algún efecto en la traducción de *CmNOR*. En general, se observó una gran conservación de los alelos de *CmNOR* dentro las variedades con maduración climatérica (principalmente *cantalupensis*) y no climatérica (principalmente *inodorus*) compatible con un papel central en la regulación del proceso. Cabe destacar la gran similitud entre el alelo de SC de *CmNOR* y el de los tipos *cantalupensis*, con solamente 2 bp de diferencia en el INDEL-126 y una secuencia proteica idéntica.

La regulación de la maduración climatérica del fruto de melón es compleja

La presencia de variedades climatéricas con el alelo *inodorus* de *CmNOR* en el panel de variedades (ver cap. 4.2) podría parecer contradictorio, aunque puede ser explicado por la presencia de otro gen o genes que también estén implicados en la regulación de la maduración en melón y que no se ven afectados por *CmNOR*. Observamos un fenómeno similar en el estudio de los mutantes TILLING que, a pesar de portar el alelo mutado de *CmNOR* en homocigosis, todavía son capaces de madurar de forma climatérica. Este otro gen o genes podrían ser los responsables de alguno de los otros QTLs y genes mayores que han sido descritos como *eth3.5* (Moreno *et al.* 2008) y los detectados en la población de RILs desarrollada a partir del cruzamiento de la variedad típicamente climatérica “Charentais” (*cantalupensis*) con SC (Perin *et al.* 2002a). En esta población fue posible determinar que solamente dos *loci* (*Al-3* y *Al-4*) controlan la formación de una capa de abscisión y la producción de etileno, y otros cuatro (*eth1.1*, *eth2.1*, *eth3.1* y *eth11.1*) el nivel de producción de la hormona (Perin *et al.* 2002a). Es importante destacar que las posiciones de estos seis QTLs no solapan con *eth3.5* ni *eth6.3*, lo que sugiere un escenario complejo en la regulación de la maduración en melón. Tal y como se mencionaba anteriormente, SC ha sido considerado clásicamente como una variedad con frutos no climatéricos (Perin *et al.* 2002a) aunque estudios recientes lo situarían en algún punto intermedio entre PS y las climatéricas “Védrantais” y “Dulce” (Vegas *et al.* 2013; Saladie *et al.* 2015; ver cap. 4.1). El hecho de que se detectaran distintos QTLs cuando se cruzó SC con “Védrantais” o con PS y que ninguno de ellos solape, sugiere que las causas por las que SC no madura de forma climatérica serían diferentes de las de un no climatérico típico como PS y que estarían probablemente relacionadas con los genes *Al-3* y *Al-4*.

En general, se ha propuesto que los frutos no climatéricos podrían ser mutantes en genes implicados en la biosíntesis y señalización de etileno o en factores de transcripción análogos a RIN, NOR y CNR de tomate (Giovannoni 2004; Saladie *et al.* 2015). Partiendo de esta hipótesis, sugerimos un modelo que explicaría los resultados obtenidos en este trabajo de tesis en el contexto del conocimiento actual sobre la maduración del fruto en melón. Según nuestra hipótesis, la variedad no climatérica PS (así como todos los *inodorus* incluidos en el panel de variedades del cap. 4.2) sería portadora de un alelo mutado de *CmNOR* que inhibe la maduración climatérica del fruto. Para que la inhibición sea total, en PS sería imprescindible la presencia de al menos otro gen mutado en el *locus eth3.5*. Por otro

lado, la variedad SC (*conomon*), históricamente clasificada como no climatérica, sería portadora de un alelo funcional de estos genes, pero debido a mutaciones en otros *loci* (como mínimo dos: *Al-3* y *Al-4*) sus frutos no serían climatéricos. Al introgresar los alelos de SC de *CmNOR* y *eth3.5* en PS (por ejemplo la línea SC3-5-1 y sus derivadas GF35 y GF40, ver cap. 4.1) el fruto es capaz de iniciar una maduración de tipo climatérica con distintos grados según las combinaciones entre ellos. Por último, las variedades típicamente climatéricas como “Védrantais” y la mayor parte del grupo *cantalupensis* portarían alelos funcionales de, como mínimo, *CmNOR*, *Al-3*, *Al-4* y posiblemente *eth3.5*, de forma que son capaces de madurar de forma climatérica incluso cuando tienen el alelo *inodorus* de *CmNOR* (ver cap. 4.2) o cuando este gen está mutado en su dominio NAC, como demuestran los resultados de TILLING (ver cap. 4.5).

Interacción entre *CmNOR* y *eth3.5*

El QTL *eth3.5* está mapeado en el cromosoma III y se han comenzado trabajos de clonaje posicional en el laboratorio pero aún no se han obtenido resultados que permitan la selección de un gen candidato (L. Pereira, comunicación personal). Aunque en el intervalo de 20,2 Mbp donde mapea *eth3.5* no hay anotados genes implicados en la biosíntesis de etileno, sí hay diversos factores de transcripción. El intervalo contiene 1.270 genes anotados, lo que hace imposible la selección de un candidato. La envergadura de los cambios en el proceso de regulación que es capaz de inducir este QTL, muy similares los observados por *eth6.3* (ver cap. 4.1), podría indicar la presencia de otro factor de transcripción de la familia NAC, de la que encontramos cinco anotados en la región de *eth3.5*, o de algún otro de las implicadas en la maduración del fruto en tomate como MADS-box (dos genes anotados), F-box (nueve genes anotados) o HD-zip (tres genes anotados).

Durante los últimos años se ha demostrado que algunos factores de transcripción NAC son capaces de formar homo y heterodímeros, y que esta dimerización parece ser fundamental para su capacidad de unión a DNA en algunos casos (Olsen *et al.* 2005; Jeong *et al.* 2009; Nakashima *et al.* 2012; Welner *et al.* 2012). Se ha sugerido que la proteína SINAC4 podría dimerizar con SINAC-NOR y LeMADS-RIN, regulando sus actividades y, por tanto, influenciando la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de etileno y la maduración del fruto en tomate (Zhu *et al.* 2014). Las proteínas *CmNOR* podrían formar dímeros entre sí o con alguno de los otros 80 miembros putativos de la familia NAC en melón (ver cap. 4.2). De los ocho genes que codifican las nueve proteínas *CmNAC* (*MELO3C018242* codifica dos proteínas) situados en el mismo clado que *CmNOR*, SINAC4 y SINAC-NOR en la Figura 5.1b, los genes *MELO3C010632*, *MELO3C023195* y *MELO3C016536* están diferencialmente expresados entre frutos maduros de SC3-5-1 y PS (Figura 5.2d, f y h respectivamente), y de “Védrantais” y PS (Figura 5.2c, e, g respectivamente). Estos tres genes, además, están situados en el mismo subclado que SINAC4 en la Figura 5.1b, separado del de SINAC-NOR y *CmNOR*. Cabe destacar que *MELO3C016536* está situado a tan solo 139 Kb de *CmNOR* y que *MELO3C010632* está situado dentro del intervalo de *eth3.5*, por lo que podría ser un buen punto de partida para la búsqueda del gen candidato para este QTL en el futuro.

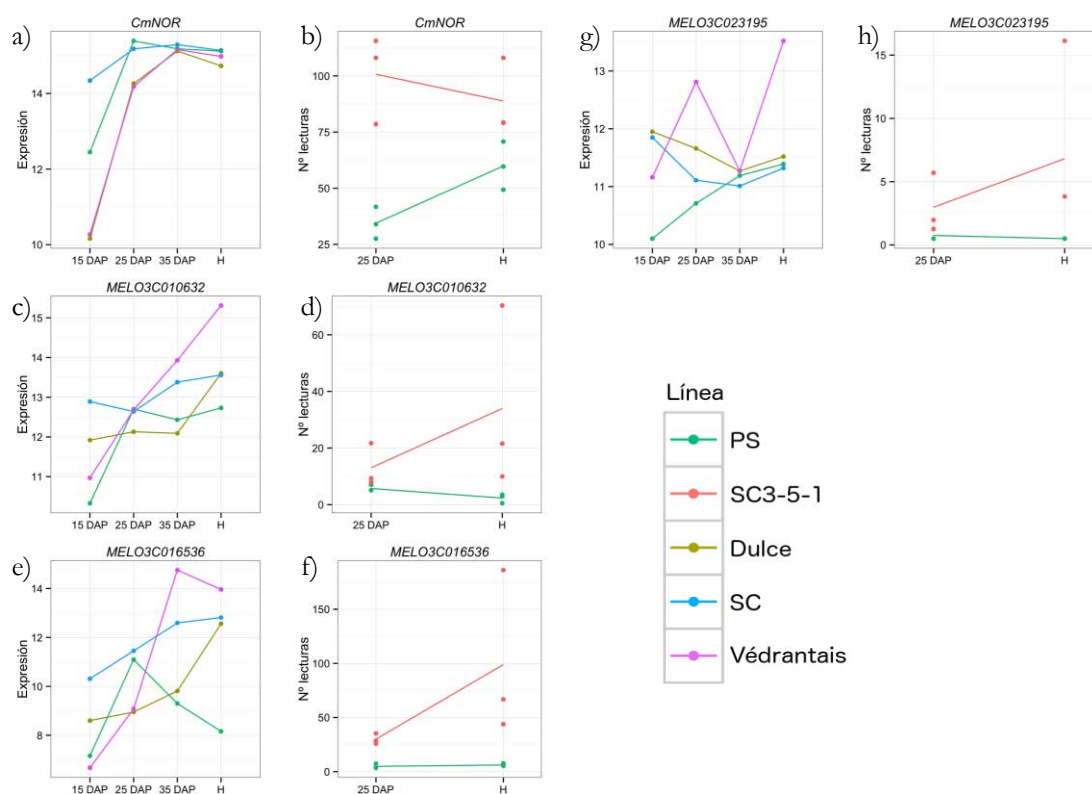


Figura 5.2: Expresión de los genes *CmNOR*, *MELO3C010632*, *MELO3C016536* y *MELO3C023195* durante la maduración del fruto de melón. a, c, e y g) Se representa la expresión normalizada detectada en una micromatriz de DNA. Cada línea representa una variedad y cada punto es el promedio de triplicados biológicos. Datos obtenidos de Saladie *et al.* (2015). b, d, f y h) Se representa el número de lecturas mapeadas en el RNA-Seq del cap. 4.5. Cada línea representa una variedad y cada punto un triplicado biológico (ver cap. 4.5). DAP: días tras la polinización; H: fruto maduro. PS: “Piel de Sapo”, SC: “Songwhan Charmi”. SC3-5-1 es una línea casi isogénica con fondo genético de PS y con introgresiones de SC en los QTLs *eth3.5* y *eth6.3* (Vegas *et al.* 2013).

Perspectivas de futuro del estudio de la maduración en melón

El avance en el estudio de la maduración del fruto durante los últimos años ha sido considerable en tomate e incluso en otras especies de interés agronómico (Gapper *et al.* 2014). Sin embargo, la mayor parte de los esfuerzos se han dirigido a la caracterización de la maduración climatérica y se sabe mucho menos sobre la no climatérica. En el caso del melón, las variedades más utilizadas en los estudios de maduración han sido las climatéricas “Védtrantais” y “Charentais” (Ezura & Owino 2008). Los estudios realizados con variedades no climatéricas son los derivados de la ya mencionada línea SC3-5-1 que, aunque climatérica, se originó tras el cruzamiento PS x SC (Vegas *et al.* 2013): un estudio del perfil aromático en el que se incluyeron variedades no climatéricas (Obando-Ulloa *et al.* 2008) y el estudio transcriptómico de los frutos de PS, SC, “Dulce” y “Védtrantais” durante la maduración (Saladie *et al.* 2015). Recientemente, también se ha realizado el clonaje posicional del gen *CmKFB* relacionado con la acumulación de flavonoides pigmentados en el exocarpo de algunas variedades *inodorus* (Feder *et al.* 2015).

Una población interesante que podría ayudar a clarificar la compleja regulación de la maduración climatérica y no climatérica es una colección de RILs, que ha sido desarrollada

en nuestro departamento a partir del cruzamiento PS x “Védrantais”, y que sería la primera población de mapeo generada a partir de una variedad típicamente no climatérica como PS y una muy climatérica como “Védrantais”. Actualmente la población consta de 92 líneas, se encuentra en generación F₈ y se prevé que a finales de 2016 todas las líneas hayan sido genotipadas mediante GBS (“Genotyping By Sequencing”) y caracterizadas fenotípicamente para caracteres de interés agronómico para el mapeado de QTLs. Los resultados preliminares indican una elevada segregación de caracteres de maduración como el desarrollo de la capa de abscisión, el cambio de color externo, el aroma y la biosíntesis de etileno (L. Pereira, comunicación personal). Para este último carácter se está utilizando un método de medición que permite recoger el etileno emitido en planta y cuantificarlo por GC-MS, lo que supone un importante avance técnico frente al método habitual que consiste, brevemente, en cortar el fruto antes del comienzo de la maduración, conservarlo en una urna de cristal ventilada y tomar medidas diarias de la concentración de etileno en el aire efluente mediante cromatografía de gases (Vegas *et al.* 2013). Los perfiles de producción de etileno preliminares muestran una gran segregación tanto en la cantidad máxima de etileno producido, en el tiempo que tarda el etileno en alcanzar el pico o en el patrón de síntesis a lo largo de la maduración (L. Pereira, comunicación personal).

La maduración del fruto y la mejora vegetal en melón

La gran diversidad en cuanto a la intensidad de la maduración nos obliga a replantear la división dicotómica clásica de los frutos entre climatéricos y no climatéricos en función de la síntesis de etileno y el aumento en la respiración del fruto (McMurchie *et al.* 1972), ya que resulta insuficiente para clasificar algunas de las variedades de melón utilizadas en esta tesis doctoral. Entre el fenotipo de una variedad completamente no climatérica como PS y el de otra muy climatérica como “Védrantais” hay toda una serie de grados intermedios que clásicamente serían clasificados como climatéricos, pero que es necesario diferenciar si queremos llegar a comprender la compleja regulación del proceso. Estos grados intermedios son los que distinguen las líneas portadoras de *eth3.5* o *eth6.3* de la línea SC3-5-1 (con ambos QTLs, en el cap. 4.1) o los mutantes en *CmNOR* respecto a los no mutantes en la población TILLING “CharMono” (ver cap. 4.3). La dificultad del fenotipado de la maduración ha motivado que durante esta tesis doctoral se hayan utilizado distintos métodos dependiendo del objetivo de cada capítulo como el tiempo de dehiscencia, el aroma y el color externo en el fruto cosechado (cap. 4.1) y el tiempo de cambio de color del exocarpo (cap. 4.3). Actualmente no existe un método generalizado de fenotipado para este carácter aunque también se han utilizado la firmeza, el color y la concentración de azúcares en la pulpa, mediciones de etileno durante la maduración y la percepción personal de los autores del ensayo (Perin *et al.* 2002a; Vegas *et al.* 2013; Saladie *et al.* 2015). En el fenotipado del panel de variedades del cap. 4.2 se utiliza una escala entre 1 y 4 para medir el grado de climaterio de los frutos basada en la experiencia de los autores del ensayo que podría servir como referencia para futuros trabajos.

Tanto PS como “Védrantais” representan dos de los extremos en cuanto a maduración del fruto pero ambas son variedades con un gran valor comercial y son el resultado de programas de mejora para caracteres relacionados con la calidad del fruto, resistencia a plagas y productividad, entre otros. Debido a la estrecha relación entre la maduración, la calidad y el valor económico del fruto pensamos que la mejora vegetal sería uno de los campos más beneficiados del estudio de los grados intermedios de maduración. Por un lado, las variedades no climatéricas de melón se caracterizan por ser poco aromáticas pero tienen una larga vida postcosecha, durante la cual el fruto apenas pierde calidad. Por otro lado, las climatéricas como “Védrantais” son mucho más aromáticas pero tras su

recolección el fruto pierde valor más rápidamente. Si de nuevo utilizamos el ejemplo del tomate, el mutante *rin* se ha venido utilizando como material de mejora aunque, como el mutante en homocigosis para este gen da lugar a un fruto con larga vida postcosecha pero con bajo valor organoléptico, solamente se ha utilizado en forma de híbridos. El mutante *nor*, en cambio, no se utiliza en mejora vegetal aunque otras mutaciones independientes en el mismo gen (*SINAC-NOR*) son las responsables de variedades de larga vida postcosecha como el tomate de colgar. En el caso del melón, las líneas semejantes a *nor*, es decir, las no climatéricas como PS, tienen un gran valor económico y son valoradas principalmente por el dulzor y la durabilidad del fruto. Por tanto creemos que los resultados de esta tesis doctoral podrían ser utilizados para la obtención de variedades climatéricas con una maduración más lenta y, por tanto, mayor estabilidad tras la cosecha sin perder el aroma tan valorado por el consumidor. De algún modo, las familias mutantes en *CmNOR* caracterizadas en el cap. 4.3 que muestran un retraso en el viraje de color, carácter ligado a la maduración del fruto, podrían servir como ejemplo de su aplicación.

En los programas de mejora de variedades climatéricas se explora la diversidad de caracteres de maduración en poblaciones segregantes obtenidas a partir de cruzamientos de líneas de larga vida con líneas élite precoces. En estas poblaciones se podría secuenciar *CmNOR* en aquellas líneas que mostraran un incremento significativo de vida postcosecha para ver si guarda relación con el alelo de este gen, de forma que pudiera ser utilizado como marcador demostrando así que los resultados de esta tesis son aplicables en la mejora genética de melón.

6. CONCLUSIONES

Los principales resultados obtenidos durante esta tesis doctoral nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado una nueva población de mapeo para el QTL *eth6.3* que ha permitido reducir su intervalo a una región de 78 Kbp entre los marcadores SEQ-3 y FR14-P22 en la región centromérica del GL VI de melón.
2. Se ha seleccionado el gen *MELO3C016540 (CmNOR)*, miembro de la familia de factores de transcripción NAC en melón, como candidato para *eth6.3* en función de su homología con otros miembros de la misma familia implicados en la maduración en tomate.
3. Se han buscado mutantes TILLING en *CmNOR* en la población con fondo climatérico “CharMono” para su validación, encontrándose nueve familias con cambios no sinónimos.
4. Se ha validado el gen *CmNOR* a través de la caracterización fenotípica de las familias de mutantes 246 (cambio E59K) y 432 (cambio P129L), cuyos frutos muestran un retraso de 7,2 y 5,6 días respectivamente en el tiempo transcurrido entre la polinización y el cambio de color del exocarpo, muy ligado con la síntesis de etileno, respecto a frutos sin mutar.
5. Se ha estudiado la secuencia de *CmNOR* en un panel con 54 variedades de melón representativo de la variabilidad existente en la especie encontrando 17 polimorfismos entre ellas. De los siete polimorfismos que muestran asociación significativa con el tipo de maduración del fruto, el INDEL-126, situado en el 5'-UTR, presenta 28 bp de diferencia entre los alelos de PS y “Védrantais”, y 26 bp entre los de PS y SC.
6. Se ha encontrado una alta conservación de haplotipos de *CmNOR* entre variedades con el mismo tipo de maduración, especialmente dentro de los grupos *inodorus* y *cantalupensis*. El haplotipo de la variedad SC es más parecido al de las variedades climatéricas (*cantalupensis*) que al de las no climatéricas (*inodorus*).
7. Se han desarrollado las herramientas genéticas necesarias para el silenciamiento de *CmNOR* mediante RNAi en líneas portadoras de *eth6.3*. De este modo se ha dado comienzo a una nueva aproximación para el estudio de la regulación de la maduración del fruto mediada por este gen.
8. Se ha realizado un estudio transcriptómico de la maduración del fruto entre las líneas PS y SC3-5-1 encontrando una reprogramación genética a nivel global entre ambos tipos de maduración.
9. Se han encontrado 618 genes diferencialmente expresados entre los frutos maduros de PS y SC3-5-1, incluyendo en genes implicados en la biosíntesis y señalización de etileno, reblandecimiento de la pulpa, metabolismo de azúcares y síntesis de compuestos aromáticos. El gen *CmNOR* no se encuentra diferencialmente expresado entre los frutos maduros de PS y SC3-5-1.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles F.B., Morgan P.W. & Saltveit M.E. (1992) *Ethylene in plant biology*. Academic Press, San Diego.
- Adams-Phillips L., Barry C., Kannan P., Leclercq J., Bouzayen M. & Giovannoni J. (2004) Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. *Plant Mol Biol* **54**, 387-404.
- Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H. & Tasaka M. (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841-57.
- Alba R., Payton P., Fei Z., McQuinn R., Debbie P., Martin G.B., Tanksley S.D. & Giovannoni J.J. (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* **17**, 2954-65.
- Alexander L. & Grierson D. (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of experimental botany* **53**, 2039-55.
- Ali N., Paul S., Gayen D., Sarkar S.N., Datta S.K. & Datta K. (2013) RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice (N Y)* **6**, 12.
- Alleva K., Marquez M., Villarreal N., Mut P., Bustamante C., Bellati J., Martinez G., Civello M. & Amodeo G. (2010) Cloning, functional characterization, and co-expression studies of a novel aquaporin (FaPIP2;1) of strawberry fruit. *J Exp Bot* **61**, 3935-45.
- Alonso J.M. & Ecker J.R. (2006) Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nature Reviews Genetics* **7**, 524-36.
- Anders S., Pyl P.T. & Huber W. (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166-9.
- Ando K., Carr K.M. & Grumet R. (2012) Transcriptome analyses of early cucumber fruit growth identifies distinct gene modules associated with phases of development. *BMC Genomics* **13**, 518.
- Arent S., Pye V.E. & Henriksen A. (2008) Structure and function of plant acyl-CoA oxidases. *Plant Physiol Biochem* **46**, 292-301.
- Argyris J.M., Pujol M., Martin-Hernandez A.M. & Garcia-Mas J. (2015a) Combined use of genetic and genomics resources to understand virus resistance and fruit quality traits in melon. *Physiol Plant* **155**, 4-11.
- Argyris J.M., Ruiz-Herrera A., Madriz-Masis P., Sanseverino W., Morata J., Pujol M., Ramos-Onsins S.E. & Garcia-Mas J. (2015b) Use of targeted SNP selection for an improved anchoring of the melon (*Cucumis melo* L.) scaffold genome assembly. *BMC Genomics* **16**, 4.
- Arumuganathan K. & Earle E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**, 208-18.
- Ayub R., Guis M., Ben Amor M., Gillot L., Roustan J.P., Latche A., Bouzayen M. & Pech J.C. (1996) Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat Biotechnol* **14**, 862-6.
- Baker A., Graham I.A., Holdsworth M., Smith S.M. & Theodoulou F.L. (2006) Chewing the fat: beta-oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci* **11**, 124-32.
- Balazadeh S., Kwasniewski M., Caldana C., Mehrnia M., Zanon M.I., Xue G.P. & Mueller-Roeber B. (2011) ORS1, an H₂O₂-responsive NAC transcription factor, controls senescence in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* **4**, 346-60.
- Balazadeh S., Siddiqui H., Allu A.D., Matallana-Ramirez L.P., Caldana C., Mehrnia M., Zanon M.I., Kohler B. & Mueller-Roeber B. (2010) A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J* **62**, 250-64.

- Barry C.S. & Giovannoni J.J. (2007) Ethylene and fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 143-59.
- Barry C.S., Llop-Tous M.I. & Grierson D. (2000) The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol* **123**, 979-86.
- Bauchot A.D., Mottram D.S., Dodson A.T. & John P. (1998) Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe Charentais melon (cv. Vedrandais). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4787-92.
- Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-63.
- Baulcombe D.C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 109-13.
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N.J. & Nekrasov V. (2015) Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol* **32**, 76-84.
- Bemer M., Karlova R., Ballester A.R., Tikunov Y.M., Bovy A.G., Wolters-Arts M., Rossetto Pde B., Angenent G.C. & de Maagd R.A. (2012) The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *Plant Cell* **24**, 4437-51.
- Bennett T., van den Toorn A., Sanchez-Perez G.F., Campilho A., Willemsen V., Snel B. & Scheres B. (2010) SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 640-54.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. & Hannon G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6.
- Bertani G. (1951) STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli1. *Journal of bacteriology* **62**, 293.
- Bezirganoglu I., Hwang S.Y., Shaw J.F. & Fang T.J. (2014) Efficient production of transgenic melon via Agrobacterium-mediated transformation. *Genet Mol Res* **13**, 3218-27.
- Blanca J., Esteras C., Ziarsolo P., Perez D., Ferna Ndez-Pedrosa V., Collado C., Rodra Guez de Pablos R., Ballester A., Roig C., Canizares J. & Pico B. (2012) Transcriptome sequencing for SNP discovery across Cucumis melo. *BMC Genomics* **13**, 280.
- Blanca J.M., Cañizares J., Ziarsolo P., Esteras C., Mir G., Nuez F., Garcia-Mas J. & Picó M.B. (2011) Melon Transcriptome Characterization: Simple Sequence Repeats and Single Nucleotide Polymorphisms Discovery for High Throughput Genotyping across the Species. *The Plant Genome* **4**, 118-31.
- Bolger A.M., Lohse M. & Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-20.
- Botton A., Eccher G., Forcato C., Ferrarini A., Begheldo M., Zermiani M., Moscatello S., Battistelli A., Velasco R., Ruperti B. & Ramina A. (2011) Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission. *Plant Physiol* **155**, 185-208.
- Boualem A., Fergany M., Fernandez R., Troadec C., Martin A., Morin H., Sari M.A., Collin F., Flowers J.M., Pitrat M., Purugganan M.D., Dogimont C. & Bendahmane A. (2008) A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* **321**, 836-8.
- Boualem A., Troadec C., Camps C., Lemhemdi A., Morin H., Sari M.A., Fraenkel-Zagouri R., Kovalski I., Dogimont C., Perl-Treves R. & Bendahmane A. (2015) A cucurbit androecy gene reveals how unisexual flowers develop and dioecy emerges. *Science* **350**, 688-91.

- Brookfield P.L., Nicoll S., Gunson F.A., Harker F.R. & Wohlers M. (2011) Sensory evaluation by small postharvest teams and the relationship with instrumental measurements of apple texture. *Postharvest Biology and Technology* **59**, 179-86.
- Brotman Y., Kovalski I., Dogimont C., Pitrat M., Portnoy V., Katzir N. & Perl-Treves R. (2005) Molecular markers linked to papaya ring spot virus resistance and Fusarium race 2 resistance in melon. *Theor Appl Genet* **110**, 337-45.
- Brotman Y., Normantovich M., Goldenberg Z., Zvirin Z., Kovalski I., Stovbun N., Doniger T., Bolger A.M., Troadec C., Bendahmane A., Cohen R., Katzir N., Pitrat M., Dogimont C. & Perl-Treves R. (2013) Dual resistance of melon to Fusarium oxysporum races 0 and 2 and to Papaya ring-spot virus is controlled by a pair of head-to-head-oriented NB-LRR genes of unusual architecture. *Mol Plant* **6**, 235-8.
- Brummell D.A. (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* **33**, 103-19.
- Brummell D.A., Hall B.D. & Bennett A.B. (1999a) Antisense suppression of tomato endo-1,4-beta-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Mol Biol* **40**, 615-22.
- Brummell D.A. & Harpster M.H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. In: *Plant Cell Walls* (pp. 311-40. Springer.
- Brummell D.A., Harpster M.H., Civello P.M., Palys J.M., Bennett A.B. & Dunsmuir P. (1999b) Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* **11**, 2203-16.
- Brummell D.A. & Labavitch J.M. (1997) Effect of Antisense Suppression of Endopolygalacturonase Activity on Polyuronide Molecular Weight in Ripening Tomato Fruit and in Fruit Homogenates. *Plant Physiol* **115**, 717-25.
- Burger Y., Paris H.S., Cohen R., Katzir N., Tadmor Y., Lewinsohn E. & Schaffer A.A. (2009) Genetic diversity of Cucumis melo. *Hortic Rev* **36**, 165-98.
- Burger Y., Sa'ar U., Distelfeld A., Katzir N., Yeselson Y., Shen S. & Schaffer A.A. (2003) Development of sweet melon (Cucumis melo) genotypes combining high sucrose and organic acid content. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**, 537-40.
- Cara B. & Giovannoni J.J. (2008) Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science* **175**, 106-13.
- Carpita N.C. & Gibeaut D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**, 1-30.
- Cazzonelli C.I., Yin K. & Pogson B.J. (2009) Potential implications for epigenetic regulation of carotenoid biosynthesis during root and shoot development. *Plant Signal Behav* **4**, 339-41.
- Centeno D.C., Osorio S., Nunes-Nesi A., Bertolo A.L., Carneiro R.T., Araujo W.L., Steinhauser M.C., Michalska J., Rohrmann J., Geigenberger P., Oliver S.N., Stitt M., Carrari F., Rose J.K. & Fernie A.R. (2011) Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *Plant Cell* **23**, 162-84.
- Chaparro-Torres L.A., Bueso M.C. & Fernandez-Trujillo J.P. (2015) Aroma volatiles obtained at harvest by HS-SPME/GC-MS and INDEX/MS-E-nose fingerprint discriminate climacteric behaviour in melon fruit. *J Sci Food Agric*.
- Chen F., Tholl D., Bohlmann J. & Pichersky E. (2011) The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J* **66**, 212-29.
- Chen H. & Boutros P.C. (2011) VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **12**, 35.

- Chen J.-f., Staub J. & Jiang J. (1998) A reevaluation of karyotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* **45**, 301-5.
- Chen W., Kong J., Qin C., Yu S., Tan J., Chen Y.R., Wu C., Wang H., Shi Y., Li C., Li B., Zhang P., Wang Y., Lai T., Yu Z., Zhang X., Shi N., Wang H., Osman T., Liu Y., Manning K., Jackson S., Rolin D., Zhong S., Seymour G.B., Gallusci P. & Hong Y. (2015a) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for somatic inheritance of the spontaneous tomato epimutation Colourless non-ripening. *Sci Rep* **5**, 9192.
- Chen X., Lu S., Wang Y., Zhang X., Lv B., Luo L., Xi D., Shen J., Ma H. & Ming F. (2015b) OsNAC2 encoding a NAC transcription factor that affects plant height through mediating the gibberellic acid pathway in rice. *Plant J* **82**, 302-14.
- Choi Y., Sims G.E., Murphy S., Miller J.R. & Chan A.P. (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* **7**, e46688.
- Chung M.Y., Vrebalov J., Alba R., Lee J., McQuinn R., Chung J.D., Klein P. & Giovannoni J. (2010) A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SlAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant J* **64**, 936-47.
- Clayberg C.D. (1992) Interaction and Linkage Tests of Flesh Color Genes in *Cucumis melo* L. *Cucurbit Genetics Cooperative* **15**.
- Clepet C., Joobeur T., Zheng Y., Jublot D., Huang M., Truniger V., Boualem A., Hernandez-Gonzalez M.E., Dolcet-Sanjuan R., Portnoy V., Mascarell-Creus A., Cano-Delgado A.I., Katzir N., Bendahmane A., Giovannoni J.J., Aranda M.A., Garcia-Mas J. & Fei Z. (2011) Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC Genomics* **12**, 252.
- Cohen S., Itkin M., Yeselson Y., Tzuri G., Portnoy V., Harel-Baja R., Lev S., Sa'ar U., Davidovitz-Rikanati R. & Baranes N. (2014) The PH gene determines fruit acidity and contributes to the evolution of sweet melons. *Nature communications* **5**.
- Collinge M. & Boller T. (2001) Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* **46**, 521-9.
- Cookson P.J., Kiano J.W., Shipton C.A., Fraser P.D., Romer S., Schuch W., Bramley P.M. & Pyke K.A. (2003) Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the high pigment-1 mutant of tomato. *Planta* **217**, 896-903.
- Corbacho J., Romojaro F., Pech J.C., Latche A. & Gomez-Jimenez M.C. (2013) Transcriptomic events involved in melon mature-fruit abscission comprise the sequential induction of cell-wall degrading genes coupled to a stimulation of endo and exocytosis. *PLoS One* **8**, e58363.
- Cosgrove D.J., Li L.C., Cho H.T., Hoffmann-Benning S., Moore R.C. & Blecker D. (2002) The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol* **43**, 1436-44.
- Cuevas H.E., Staub J.E., Simon P.W. & Zalapa J.E. (2009) A consensus linkage map identifies genomic regions controlling fruit maturity and beta-carotene-associated flesh color in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* **119**, 741-56.
- Cuevas H.E., Staub J.E., Simon P.W., Zalapa J.E. & McCreight J.D. (2008) Mapping of genetic loci that regulate quantity of beta-carotene in fruit of US Western Shipping melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* **117**, 1345-59.
- Dahmani-Mardas F., Troadec C., Boualem A., Leveque S., Alsadon A.A., Aldoss A.A., Dogimont C. & Bendahmane A. (2010) Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PLoS One* **5**, e15776.
- Dai N., Cohen S., Portnoy V., Tzuri G., Harel-Beja R., Pompan-Lotan M., Carmi N., Zhang G., Diber A., Pollock S., Karchi H., Yeselson Y., Petreikov M., Shen S., Sahar U., Hovav R., Lewinsohn E., Tadmor Y., Granot D., Ophir R., Sherman A., Fei Z., Giovannoni J., Burger Y., Katzir N. & Schaffer A.A. (2011) Metabolism of

- soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant Mol Biol* **76**, 1-18.
- Davies C., Boss P.K. & Robinson S.P. (1997) Treatment of Grape Berries, a Nonclimacteric Fruit with a Synthetic Auxin, Retards Ripening and Alters the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Plant Physiol* **115**, 1155-61.
- Davies C. & Böttcher C. (2014) Other hormonal signals during ripening. In: *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC), pp. x, 321 pages, 8 unnumbered pages of plates. CABI, Boston, MA.
- Defilippi B.G., Manriquez D., Luengwilai K. & González-Agüero M. (2009) Aroma volatiles: biosynthesis and mechanisms of modulation during fruit ripening. *Advances in botanical research* **50**, 1-37.
- Delessert C., Kazan K., Wilson I.W., Van Der Straeten D., Manners J., Dennis E.S. & Dolferus R. (2005) The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. *Plant J* **43**, 745-57.
- Deleu W., Esteras C., Roig C., Gonzalez-To M., Fernandez-Silva I., Gonzalez-Ibeas D., Blanca J., Aranda M.A., Arus P., Nuez F., Monforte A.J., Pico M.B. & Garcia-Mas J. (2009) A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. *BMC Plant Biol* **9**, 90.
- Diaz A., Fergany M., Formisano G., Ziarsolo P., Blanca J., Fei Z., Staub J.E., Zalapa J.E., Cuevas H.E., Dace G., Oliver M., Boissot N., Dogimont C., Pitrat M., Hofstede R., van Koert P., Harel-Beja R., Tzuri G., Portnoy V., Cohen S., Schaffer A., Katzir N., Xu Y., Zhang H., Fukino N., Matsumoto S., Garcia-Mas J. & Monforte A.J. (2011) A consensus linkage map for molecular markers and quantitative trait loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol* **11**, 111.
- Diaz A., Zarouri B., Fergany M., Eduardo I., Alvarez J.M., Pico B. & Monforte A.J. (2014) Mapping and introgression of QTL involved in fruit shape transgressive segregation into 'piel de sapo' melon (*cucumis melo* l.) [corrected]. *PLoS One* **9**, e104188.
- Dong J.-Z., Yang M.-Z., Jia S.-R. & Chua N.-H. (1991) Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Nature Biotechnology* **9**, 858-63.
- Donze T., Qu F., Twigg P. & Morris T.J. (2014) Turnip crinkle virus coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in Arabidopsis by binding to the NAC transcription factor TIP. *Virology* **449**, 207-14.
- Doyle J.J. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-5.
- Dudareva N., Pichersky E. & Gershenzon J. (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* **135**, 1893-902.
- Dutt M., Dhekney S.A., Soriano L., Kandel R. & Grosser J.W. (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Hortic Res* **1**, 14047.
- Duval M., Hsieh T.F., Kim S.Y. & Thomas T.L. (2002) Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Mol Biol* **50**, 237-48.
- Eduardo I., Arus P. & Monforte A.J. (2005) Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theor Appl Genet* **112**, 139-48.
- Eduardo I., Arús P., Monforte A.J., Obando J., Fernández-Trujillo J.P., Martínez J.A., Alarcón A.L., María Álvarez J. & van der Knaap E. (2007) Estimating the Genetic Architecture of Fruit Quality Traits in Melon Using a Genomic Library of Near Isogenic Lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**, 80-9.

- El-Sharkawy I., Manriquez D., Flores F.B., Regad F., Bouzayen M., Latche A. & Pech J.C. (2005) Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity*. *Plant Mol Biol* **59**, 345-62.
- Ernst H.A., Olsen A.N., Larsen S. & Lo Leggio L. (2004) Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep* **5**, 297-303.
- Eshed Y. & Zamir D. (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **141**, 1147-62.
- Essafi A., Diaz-Pendon J.A., Moriones E., Monforte A.J., Garcia-Mas J. & Martin-Hernandez A.M. (2009) Dissection of the oligogenic resistance to Cucumber mosaic virus in the melon accession PI 161375. *Theor Appl Genet* **118**, 275-84.
- Esteras C., Formisano G., Roig C., Diaz A., Blanca J., Garcia-Mas J., Gomez-Guillamon M.L., Lopez-Sese A.I., Lazaro A., Monforte A.J. & Pico B. (2013) SNP genotyping in melons: genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theor Appl Genet* **126**, 1285-303.
- Ezura H. & Fukino N. (2009) Research tools for functional genomics in melon (*Cucumis melo* L.): Current status and prospects. *Plant biotechnology* **26**, 359-68.
- Ezura H. & Owino W.O. (2008) Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. *Plant Science* **175**, 121-9.
- Fait A., Hanhineva K., Beleggia R., Dai N., Rogachev I., Nikiforova V.J., Fernie A.R. & Aharoni A. (2008) Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiol* **148**, 730-50.
- Falara V., Akhtar T.A., Nguyen T.T., Spyropoulou E.A., Bleeker P.M., Schauvinhold I., Matsuba Y., Bonini M.E., Schillmiller A.L., Last R.L., Schuurink R.C. & Pichersky E. (2011) The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiol* **157**, 770-89.
- Fang Z. & Cui X. (2011) Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Briefings in bioinformatics*, bbr004.
- Feder A., Burger J., Gao S., Lewinsohn E., Katzir N., Schaffer A.A., Meir A., Davidovich-Rikanati R., Portnoy V. & Gal-On A. (2015) A Kelch domain-containing F-box coding gene negatively regulates flavonoid accumulation in *Cucumis melo* L. *Plant Physiology*, pp. 01008.2015.
- Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D.L., Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao Y. & Zhu J.K. (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* **23**, 1229-32.
- Fernández-Trujillo J.P., Obando J., Martínez J.A., Alarcón A.L., Eduardo I., Arús P. & Monforte A.J. (2007) Mapping fruit susceptibility to postharvest physiological disorders and decay using a collection of near-isogenic lines of melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**, 739-48.
- Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E.L., Tate J. & Punta M. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* **42**, D222-30.
- Finn R.D., Clements J. & Eddy S.R. (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* **39**, W29-37.
- Flores F., Ben Amor M., Jones B., Pech J.C., Bouzayen M., Latché A. & Romojaro F. (2001) The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. *Physiologia plantarum* **113**, 128-33.
- Flutre T., Duprat E., Feuillet C. & Quesneville H. (2011) Considering transposable element diversification in de novo annotation approaches. *PLoS One* **6**, e16526.

- Freilich S., Lev S., Gonda I., Reuveni E., Portnoy V., Oren E., Lohse M., Galpaz N., Bar E., Tzuri G., Wissotsky G., Meir A., Burger J., Tadmor Y., Schaffer A., Fei Z., Giovannoni J., Lewinsohn E. & Katzir N. (2015) Systems approach for exploring the intricate associations between sweetness, color and aroma in melon fruits. *BMC Plant Biol* **15**, 71.
- Fujisawa M., Nakano T. & Ito Y. (2011) Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biol* **11**, 26.
- Fujisawa M., Shima Y., Higuchi N., Nakano T., Koyama Y., Kasumi T. & Ito Y. (2012) Direct targets of the tomato-ripening regulator RIN identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses. *Planta* **235**, 1107-22.
- Fujisawa M., Shima Y., Nakagawa H., Kitagawa M., Kimbara J., Nakano T., Kasumi T. & Ito Y. (2014) Transcriptional regulation of fruit ripening by tomato FRUITFULL homologs and associated MADS box proteins. *Plant Cell* **26**, 89-101.
- Fukino N., Ohara T., Monforte A.J., Sugiyama M., Sakata Y., Kuniyama M. & Matsumoto S. (2008) Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* **118**, 165-75.
- Gao C., Ju Z., Cao D., Zhai B., Qin G., Zhu H., Fu D., Luo Y. & Zhu B. (2015) MicroRNA profiling analysis throughout tomato fruit development and ripening reveals potential regulatory role of RIN on microRNAs accumulation. *Plant Biotechnol J* **13**, 370-82.
- Gapper N.E., Giovannoni J.J. & Watkins C.B. (2014) Understanding development and ripening of fruit crops in an 'omics' era. *Hortic Res* **1**, 14034.
- García-Alcalde F., Okonechnikov K., Carbonell J., Cruz L.M., Gotz S., Tarazona S., Dopazo J., Meyer T.F. & Conesa A. (2012) Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics* **28**, 2678-9.
- García-Mas J., Benjak A., Sanseverino W., Bourgeois M., Mir G., Gonzalez V.M., Henaff E., Camara F., Cozzuto L., Lowy E., Alioto T., Capella-Gutierrez S., Blanca J., Canizares J., Ziarsolo P., Gonzalez-Ibeas D., Rodriguez-Moreno L., Droege M., Du L., Alvarez-Tejado M., Lorente-Galdos B., Mele M., Yang L., Weng Y., Navarro A., Marques-Bonet T., Aranda M.A., Nuez F., Pico B., Gabaldon T., Roma G., Guigo R., Casacuberta J.M., Arus P. & Puigdomenech P. (2012) The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11872-7.
- García-Mas J., Oliver M., Gomez-Paniagua H. & De Vicente M. (2000) Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theoretical and Applied Genetics* **101**, 860-4.
- Gimenez E., Pineda B., Capel J., Anton M.T., Atares A., Perez-Martin F., Garcia-Sogo B., Angosto T., Moreno V. & Lozano R. (2010) Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One* **5**, e14427.
- Giovannoni J. (2001) Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 725-49.
- Giovannoni J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* **16 Suppl**, S170-80.
- Giovannoni J.J. (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 283-9.
- Giovannoni J.J., Noensie E.N., Ruezinsky D.M., Lu X., Tracy S.L., Ganai M.W., Martin G.B., Pillein K., Alpert K. & Tanksley S.D. (1995) Molecular genetic analysis of the ripening-inhibitor and non-ripening loci of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol Gen Genet* **248**, 195-206.

- Giuliano G., Bartley G.E. & Scolnik P.A. (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* **5**, 379-87.
- Gleave A.P. (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* **20**, 1203-7.
- Goff S.A. & Klee H.J. (2006) Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? *Science* **311**, 815-9.
- Goldberg A.D., Allis C.D. & Bernstein E. (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**, 635-8.
- Gonda I., Bar E., Portnoy V., Lev S., Burger J., Schaffer A.A., Tadmor Y., Gepstein S., Giovannoni J.J., Katzir N. & Lewinsohn E. (2010) Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *J Exp Bot* **61**, 1111-23.
- Gonda I., Lev S., Bar E., Sikron N., Portnoy V., Davidovich-Rikanati R., Burger J., Schaffer A.A., Tadmor Y., Giovannoni J.J., Huang M., Fei Z., Katzir N., Fait A. & Lewinsohn E. (2013) Catabolism of L-methionine in the formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Plant J* **74**, 458-72.
- Gonzalez M., Xu M., Esteras C., Roig C., Monforte A.J., Troadec C., Pujol M., Nuez F., Bendahmane A., Garcia-Mas J. & Pico B. (2011) Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de Sapo melons. *BMC Res Notes* **4**, 289.
- Gonzalez V.M., Garcia-Mas J., Arus P. & Puigdomenech P. (2010) Generation of a BAC-based physical map of the melon genome. *BMC Genomics* **11**, 339.
- Gonzalez-Ibeas D., Blanca J., Donaire L., Saladié M., Mascarell-Creus A., Cano-Delgado A., Garcia-Mas J., Llave C. & Aranda M.A. (2011) Analysis of the melon (*Cucumis melo*) small RNAome by high-throughput pyrosequencing. *BMC Genomics* **12**, 393.
- Gonzalez-Ibeas D., Blanca J., Roig C., Gonzalez-To M., Pico B., Truniger V., Gomez P., Deleu W., Cano-Delgado A., Arus P., Nuez F., Garcia-Mas J., Puigdomenech P. & Aranda M.A. (2007) MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC Genomics* **8**, 306.
- Gonzalo M.J., Oliver M., Garcia-Mas J., Monfort A., Dolcet-Sanjuan R., Katzir N., Arus P. & Monforte A.J. (2005) Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* **110**, 802-11.
- Grassi S., Piro G., Lee J.M., Zheng Y., Fei Z., Dalessandro G., Giovannoni J.J. & Lenucci M.S. (2013) Comparative genomics reveals candidate carotenoid pathway regulators of ripening watermelon fruit. *BMC Genomics* **14**, 781.
- Greene E.A., Codomo C.A., Taylor N.E., Henikoff J.G., Till B.J., Reynolds S.H., Enns L.C., Burtner C., Johnson J.E., Odden A.R., Comai L. & Henikoff S. (2003) Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**, 731-40.
- Grierson D. (2014) Ethylene biosynthesis. In: *Fruit ripening : physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC), pp. x, 321 pages, 8 unnumbered pages of plates. CABI, Boston, MA.
- Guis M., Bouquin T., Zegzouti H., Ayub R., Amor M.B., Lasserre E., Botondi R., Raynal J., Latche A. & Bouzayen M. (1997) Differential expression of ACC oxidase genes in melon and physiological characterization of fruit expressing an antisense ACC oxidase gene. In: *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene* (pp. 327-37. Springer.
- Guiu-Aragónés C., Monforte A.J., Saladié M., Corrêa R.X., Garcia-Mas J. & Martín-Hernández A.M. (2014) The complex resistance to cucumber mosaic cucumovirus (CMV) in the melon accession PI161375 is governed by one gene and at least two quantitative trait loci. *Molecular Breeding* **34**, 351-62.

- Guo H. & Ecker J.R. (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667-77.
- Guo S., Zhang J., Sun H., Salse J., Lucas W.J., Zhang H., Zheng Y., Mao L., Ren Y., Wang Z., Min J., Guo X., Murat F., Ham B.K., Zhang Z., Gao S., Huang M., Xu Y., Zhong S., Bombarely A., Mueller L.A., Zhao H., He H., Zhang Y., Zhang Z., Huang S., Tan T., Pang E., Lin K., Hu Q., Kuang H., Ni P., Wang B., Liu J., Kou Q., Hou W., Zou X., Jiang J., Gong G., Klee K., Schoof H., Huang Y., Hu X., Dong S., Liang D., Wang J., Wu K., Xia Y., Zhao X., Zheng Z., Xing M., Liang X., Huang B., Lv T., Wang J., Yin Y., Yi H., Li R., Wu M., Levi A., Zhang X., Giovannoni J.J., Wang J., Li Y., Fei Z. & Xu Y. (2013) The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat Genet* **45**, 51-8.
- Guo Y. & Gan S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J* **46**, 601-12.
- Gupta S.K., Sharma S., Santisree P., Kilambi H.V., Appenroth K., Sreelakshmi Y. & Sharma R. (2014) Complex and shifting interactions of phytochromes regulate fruit development in tomato. *Plant Cell Environ* **37**, 1688-702.
- Hadfield K.A., Rose J.K., Yaver D.S., Berka R.M. & Bennett A.B. (1998) Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant Physiol* **117**, 363-73.
- Han Q., Zhang J., Li H., Luo Z., Ziaf K., Ouyang B., Wang T. & Ye Z. (2012) Identification and expression pattern of one stress-responsive NAC gene from *Solanum lycopersicum*. *Mol Biol Rep* **39**, 1713-20.
- Handa A.K., Anwar R. & Mattoo A.K. (2014) Biotechnology of fruit quality. In: *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC), pp. x, 321 pages, 8 unnumbered pages of plates. CABI, Boston, MA.
- Harel-Beja R., Tzuri G., Portnoy V., Lotan-Pompan M., Lev S., Cohen S., Dai N., Yeselson L., Meir A., Libhaber S.E., Avisar E., Melame T., van Koert P., Verbakel H., Hofstede R., Volpin H., Oliver M., Fougedoire A., Stalh C., Fauve J., Copes B., Fei Z., Giovannoni J., Ori N., Lewinsohn E., Sherman A., Burger J., Tadmor Y., Schaffer A.A. & Katzir N. (2010) A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theor Appl Genet* **121**, 511-33.
- Helliwell C.A., Wesley S.V., Wielopolska A.J. & Waterhouse P.M. (2002) High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology* **29**, 1217-25.
- Hibara K., Takada S. & Tasaka M. (2003) CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant J* **36**, 687-96.
- Hirayama T. & Alonso J.M. (2000) Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant Cell Physiol* **41**, 548-55.
- Hiwasa K., Kinugasa Y., Amano S., Hashimoto A., Nakano R., Inaba A. & Kubo Y. (2003) Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J Exp Bot* **54**, 771-9.
- Hiwasa-Tanase K. & Ezura H. (2014) Climacteric and non-climacteric ripening. In: *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC), pp. x, 321 pages, 8 unnumbered pages of plates. CABI, Boston, MA.
- Ho L., Sjut V. & Hoad G. (1982) The effect of assimilate supply on fruit growth and hormone levels in tomato plants. *Plant Growth Regulation* **1**, 155-71.
- Hothorn T., Bretz F. & Westfall P. (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* **50**, 346-63.

- Hu H., Dai M., Yao J., Xiao B., Li X., Zhang Q. & Xiong L. (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12987-92.
- Hu R., Qi G., Kong Y., Kong D., Gao Q. & Zhou G. (2010) Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* **10**, 145.
- Hu W., Wei Y., Xia Z., Yan Y., Hou X., Zou M., Lu C., Wang W. & Peng M. (2015) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the NAC Transcription Factor Family in Cassava. *PLoS One* **10**, e0136993.
- Huang S., Li R., Zhang Z., Li L., Gu X., Fan W., Lucas W.J., Wang X., Xie B., Ni P., Ren Y., Zhu H., Li J., Lin K., Jin W., Fei Z., Li G., Staub J., Kilian A., van der Vossen E.A., Wu Y., Guo J., He J., Jia Z., Ren Y., Tian G., Lu Y., Ruan J., Qian W., Wang M., Huang Q., Li B., Xuan Z., Cao J., Asan, Wu Z., Zhang J., Cai Q., Bai Y., Zhao B., Han Y., Li Y., Li X., Wang S., Shi Q., Liu S., Cho W.K., Kim J.Y., Xu Y., Heller-Uszynska K., Miao H., Cheng Z., Zhang S., Wu J., Yang Y., Kang H., Li M., Liang H., Ren X., Shi Z., Wen M., Jian M., Yang H., Zhang G., Yang Z., Chen R., Liu S., Li J., Ma L., Liu H., Zhou Y., Zhao J., Fang X., Li G., Fang L., Li Y., Liu D., Zheng H., Zhang Y., Qin N., Li Z., Yang G., Yang S., Bolund L., Kristiansen K., Zheng H., Li S., Zhang X., Yang H., Wang J., Sun R., Zhang B., Jiang S., Wang J., Du Y. & Li S. (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat Genet* **41**, 1275-81.
- Hubbard N.L., Huber S.C. & Pharr D.M. (1989) Sucrose Phosphate Synthase and Acid Invertase as Determinants of Sucrose Concentration in Developing Muskmelon (*Cucumis melo* L.) Fruits. *Plant Physiol* **91**, 1527-34.
- Huerta-Cepas J., Capella-Gutierrez S., Pryszcz L.P., Marcet-Houben M. & Gabaldon T. (2014) PhylomeDB v4: zooming into the plurality of evolutionary histories of a genome. *Nucleic Acids Res* **42**, D897-902.
- Huijser P., Klein J., Lonig W.E., Meijer H., Saedler H. & Sommer H. (1992) Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* **11**, 1239-49.
- Hussey S.G., Mizrahi E., Spokevicius A.V., Bossinger G., Berger D.K. & Myburg A.A. (2011) SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol* **11**, 173.
- Ibdah M., Azulay Y., Portnoy V., Wasserman B., Bar E., Meir A., Burger Y., Hirschberg J., Schaffer A.A., Katzir N., Tadmor Y. & Lewinsohn E. (2006) Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* **67**, 1579-89.
- Ishiki Y., Oda A., Yaegashi Y., Orihara Y., Arai T., Hirabayashi T., Nakagawa H. & Sato T. (2000) Cloning of an auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (CMe-ACS2) from melon and the expression of ACS genes in etiolated melon seedlings and melon fruits. *Plant Sci* **159**, 173-81.
- Itkin M., Seybold H., Breitel D., Rogachev I., Meir S. & Aharoni A. (2009) TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant J* **60**, 1081-95.
- Ito Y., Kitagawa M., Ihashi N., Yabe K., Kimbara J., Yasuda J., Ito H., Inakuma T., Hiroi S. & Kasumi T. (2008) DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the *rin* mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *Plant J* **55**, 212-23.
- Jaakola L., Poole M., Jones M.O., Kamarainen-Karppinen T., Koskimaki J.J., Hohtola A., Haggman H., Fraser P.D., Manning K., King G.J., Thomson H. & Seymour G.B.

- (2010) A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiol* **153**, 1619-29.
- Jackson A.L. & Linsley P.S. (2004) Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* **20**, 521-4.
- Jeffrey C. (1980) A review of the Cucurbitaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **81**, 233-47.
- Jensen M.K., Kjaersgaard T., Petersen K. & Skriver K. (2010) NAC genes: time-specific regulators of hormonal signaling in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **5**, 907-10.
- Jeong J.S., Park Y.T., Jung H., Park S.-H. & Kim J.-K. (2009) Rice NAC proteins act as homodimers and heterodimers. *Plant Biotechnology Reports* **3**, 127-34.
- Jia H.F., Chai Y.M., Li C.L., Lu D., Luo J.J., Qin L. & Shen Y.Y. (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol* **157**, 188-99.
- Jin H., Huang F., Cheng H., Song H. & Yu D. (2013) Overexpression of the GmNAC2 gene, an NAC transcription factor, reduces abiotic stress tolerance in tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**, 435-42.
- Joo S., Liu Y., Lueth A. & Zhang S. (2008) MAPK phosphorylation- induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non- catalytic C- terminal domain, which also contains the cis- determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *The Plant Journal* **54**, 129-40.
- Joobeur T., King J.J., Nolin S.J., Thomas C.E. & Dean R.A. (2004) The Fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J* **39**, 283-97.
- Karlova R., Rosin F.M., Busscher-Lange J., Parapunova V., Do P.T., Fernie A.R., Fraser P.D., Baxter C., Angenent G.C. & de Maagd R.A. (2011) Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* **23**, 923-41.
- Karvouni Z., John I., Taylor J.E., Watson C.F., Turner A.J. & Grierson D. (1995) Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol Biol* **27**, 1153-62.
- Kawaguchi R. & Bailey-Serres J. (2005) mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* **33**, 955-65.
- Kerje T. & Grum M. (2000) The origin of melon, *Cucumis melo*: A review of the literature. pp. 37-44. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
- Kevany B.M., Tieman D.M., Taylor M.G., Cin V.D. & Klee H.J. (2007) Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant J* **51**, 458-67.
- Kim D., Langmead B. & Salzberg S.L. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**, 357-60.
- Kim Y., Lee G., Jeon E., Sohn E.J., Lee Y., Kang H., Lee D.W., Kim D.H. & Hwang I. (2014) The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* **42**, 485-98.
- Kirkbride J.H. (1993) *Biosystematic monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae) : botanical identification of cucumbers and melons*. Parkway Publishers, Boone, N.C.
- Klee H.J. (2004) Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**, 660-7.
- Klee H.J. & Giovannoni J.J. (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu Rev Genet* **45**, 41-59.
- Knox J.P. (1995) The extracellular matrix in higher plants. 4. Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *FASEB J* **9**, 1004-12.

- Kocyan A., Zhang L.B., Schaefer H. & Renner S.S. (2007) A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. *Mol Phylogenet Evol* **44**, 553-77.
- Konieczny A. & Ausubel F.M. (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**, 403-10.
- Kovacs K., Fray R.G., Tikunov Y., Graham N., Bradley G., Seymour G.B., Bovy A.G. & Grierson D. (2009) Effect of tomato pleiotropic ripening mutations on flavour volatile biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 1003-8.
- Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., Horiguchi G., Yamaguchi M., Ito J., Mimura T., Fukuda H. & Demura T. (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* **19**, 1855-60.
- Kumar R., Sharma M.K., Kapoor S., Tyagi A.K. & Sharma A.K. (2012) Transcriptome analysis of rin mutant fruit and in silico analysis of promoters of differentially regulated genes provides insight into LeMADS-RIN-regulated ethylene-dependent as well as ethylene-independent aspects of ripening in tomato. *Mol Genet Genomics* **287**, 189-203.
- Kumar R., Tyagi A.K. & Sharma A.K. (2011) Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Mol Genet Genomics* **285**, 245-60.
- Kurowska M., Daszkowska-Golec A., Gruszka D., Marzec M., Szurman M., Szarejko I. & Maluszynski M. (2011) TILLING: a shortcut in functional genomics. *J Appl Genet* **52**, 371-90.
- Lanahan M.B., Yen H.C., Giovannoni J.J. & Klee H.J. (1994) The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* **6**, 521-30.
- Langley K.R., Martin A., Stenning R., Murray A.J., Hobson G.E., Schuch W.W. & Bird C.R. (1994) Mechanical and optical assessment of the ripening of tomato fruit with reduced polygalacturonase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **66**, 547-54.
- Lashbrook C.C., Giovannoni J.J., Hall B.D., Fischer R.L. & Bennett A.B. (1998) Transgenic analysis of tomato endo- β -1,4-glucanase gene function. Role of cell in floral abscission. *The Plant Journal* **13**, 303-10.
- Lashbrook C.C., Gonzalez-Bosch C. & Bennett A.B. (1994) Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* **6**, 1485-93.
- Lasserre E., Bouquin T., Hernandez J.A., Pech J.-C., Balague C. & Bull J. (1996) Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular and General Genetics MGG* **251**, 81-90.
- Law J.A. & Jacobsen S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* **11**, 204-20.
- Le D.T., Nishiyama R., Watanabe Y., Mochida K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. & Tran L.S. (2011) Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res* **18**, 263-76.
- Leclercq J., Adams-Phillips L.C., Zegzouti H., Jones B., Latche A., Giovannoni J.J., Pech J.C. & Bouzayen M. (2002) LeCTR1, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiol* **130**, 1132-42.
- Lee J.M., Joung J.G., McQuinn R., Chung M.Y., Fei Z., Tieman D., Klee H. & Giovannoni J. (2012) Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SlERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *Plant J* **70**, 191-204.

- Leida C., Moser C., Esteras C., Sulpice R., Lunn J.E., de Langen F., Monforte A.J. & Pico B. (2015) Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genet* **16**, 28.
- Lelièvre J.M., Latché A., Jones B., Bouzayen M. & Pech J.C. (1997) Ethylene and fruit ripening. *Physiologia plantarum* **101**, 727-39.
- Lers A., Sonogo L., Green P.J. & Burd S. (2006) Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission. *Plant Physiol* **142**, 710-21.
- Lin Z., Zhong S. & Grierson D. (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* **60**, 3311-36.
- Lingle S.E. & Dunlap J.R. (1987) Sucrose Metabolism in Netted Muskmelon Fruit during Development. *Plant Physiol* **84**, 386-9.
- Liu Q., Zhu A., Chai L., Zhou W., Yu K., Ding J., Xu J. & Deng X. (2009a) Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development. *J Exp Bot* **60**, 801-13.
- Liu R., How-Kit A., Stammitti L., Teyssier E., Rolin D., Mortain-Bertrand A., Halle S., Liu M., Kong J., Wu C., Degraeve-Guibault C., Chapman N.H., Maucourt M., Hodgman T.C., Tost J., Bouzayen M., Hong Y., Seymour G.B., Giovannoni J.J. & Gallusci P. (2015) A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10804-9.
- Liu Y., Roof S., Ye Z., Barry C., van Tuinen A., Vrebalov J., Bowler C. & Giovannoni J. (2004) Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9897-902.
- Liu Y. & Zhang S. (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 3386-99.
- Liu Y.-Z., Baig M., Fan R., Ye J.-L., Cao Y.-C. & Deng X.-X. (2009b) Identification and expression pattern of a novel NAM, ATAF, and CUC-like gene from *Citrus sinensis* Osbeck. *Plant Molecular Biology Reporter* **27**, 292-7.
- Liu Z., Zhang M., Kong L., Lv Y., Zou M., Lu G., Cao J. & Yu X. (2014) Genome-wide identification, phylogeny, duplication, and expression analyses of two-component system genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *DNA Res* **21**, 379-96.
- Longhurst T., Lee E., Hinde R., Brady C. & Speirs J. (1994) Structure of the tomato Adh2 gene and Adh2 pseudogenes, and a study of Adh2 gene expression in fruit. *Plant Mol Biol* **26**, 1073-84.
- Love M.I., Huber W. & Anders S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550.
- Lucchetta L., Manríquez D., El-Sharkawy I., Flores F., Latché A. & Pech J. (2007) The role of ethylene in the expression of genes involved in the biosynthesis of aroma volatiles in melon. In: *Advances in Plant Ethylene Research* (pp. 189-95. Springer.
- Luo M., Wang Y.H., Frisch D., Joobeur T., Wing R.A. & Dean R.A. (2001) Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon *Fusarium* wilt (Fom-2). *Genome* **44**, 154-62.
- Luo Z., Zhang J., Li J., Yang C., Wang T., Ouyang B., Li H., Giovannoni J. & Ye Z. (2013) A STAY-GREEN protein SISGR1 regulates lycopene and beta-carotene accumulation by interacting directly with SPSY1 during ripening processes in tomato. *New Phytol* **198**, 442-52.

- Maere S., Heymans K. & Kuiper M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**, 3448-9.
- Manning K., Tor M., Poole M., Hong Y., Thompson A.J., King G.J., Giovannoni J.J. & Seymour G.B. (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* **38**, 948-52.
- Manriquez D., El-Sharkawy I., Flores F.B., El-Yahyaoui F., Regad F., Bouzayen M., Latche A. & Pech J.C. (2006) Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant Mol Biol* **61**, 675-85.
- Mao X., Zhang H., Qian X., Li A., Zhao G. & Jing R. (2012) TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in Arabidopsis. *J Exp Bot* **63**, 2933-46.
- Martel C., Vrebalov J., Tafelmeyer P. & Giovannoni J.J. (2011) The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiol* **157**, 1568-79.
- Martin A., Troadec C., Boualem A., Rajab M., Fernandez R., Morin H., Pitrat M., Dogimont C. & Bendahmane A. (2009) A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* **461**, 1135-8.
- Mascarell-Creus A., Canizares J., Vilarrasa-Blasi J., Mora-Garcia S., Blanca J., Gonzalez-Ibeas D., Saladie M., Roig C., Deleu W., Pico-Silvent B., Lopez-Bigas N., Aranda M.A., Garcia-Mas J., Nuez F., Puigdomenech P. & Cano-Delgado A.I. (2009) An oligo-based microarray offers novel transcriptomic approaches for the analysis of pathogen resistance and fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genomics* **10**, 467.
- Matile P., Hortensteiner S. & Thomas H. (1999) Chlorophyll Degradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 67-95.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A. & Henikoff S. (2000) Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**, 439-42.
- McCarthy F.M., Wang N., Magee G.B., Nanduri B., Lawrence M.L., Camon E.B., Barrell D.G., Hill D.P., Dolan M.E., Williams W.P., Luthe D.S., Bridges S.M. & Burgess S.C. (2006) AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics* **7**, 229.
- McMurchie E.J., McGlasson W.B. & Eaks I.L. (1972) Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* **237**, 235-6.
- Meir S., Philosoph-Hadas S., Sundaresan S., Selvaraj K.S., Burd S., Ophir R., Kochanek B., Reid M.S., Jiang C.Z. & Lers A. (2010) Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. *Plant Physiol* **154**, 1929-56.
- Meli V.S., Ghosh S., Prabha T., Chakraborty N., Chakraborty S. & Datta A. (2010) Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2413-8.
- Miedes E. & Lorences E.P. (2009) Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) during tomato fruit growth and ripening. *J Plant Physiol* **166**, 489-98.
- Miki T., Yamamoto M., Nakagawa H., Ogura N., Mori H., Imaseki H. & Sato T. (1995) Nucleotide sequence of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from melon fruits. *Plant Physiol* **107**, 297-8.

- Minoia S., Boualem A., Marcel F., Troadec C., Quemener B., Cellini F., Petrozza A., Vigouroux J., Lahaye M., Carriero F. & Bendahmane A. (2016) Induced mutations in tomato SLExp1 alter cell wall metabolism and delay fruit softening. *Plant Sci* **242**, 195-202.
- Mitsuda N., Seki M., Shinozaki K. & Ohme-Takagi M. (2005) The NAC transcription factors NST1 and NST2 of Arabidopsis regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* **17**, 2993-3006.
- Monforte A.J., Garcia-Mas J. & Arus P. (2003) Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding* **122**, 153-7.
- Monforte A.J., Oliver M., Gonzalo M.J., Alvarez J.M., Dolcet-Sanjuan R. & Arus P. (2004) Identification of quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* **108**, 750-8.
- Morales M., Roig E., Monforte A.J., Arus P. & Garcia-Mas J. (2004) Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.). *Genome* **47**, 352-60.
- Moreno E., Obando J.M., Dos-Santos N., Fernandez-Trujillo J.P., Monforte A.J. & Garcia-Mas J. (2008) Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theor Appl Genet* **116**, 589-602.
- Moya-León M.A., Moya M. & Herrera R. (2004) Ripening of mountain papaya (*Vasconcellea pubescens*) and ethylene dependence of some ripening events. *Postharvest Biology and Technology* **34**, 211-8.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**, 473-97.
- Murphy E. & De Smet I. (2014) Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci* **19**, 664-71.
- Nakashima K., Takasaki H., Mizoi J., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 97-103.
- Nakashima K., Tran L.S., Van Nguyen D., Fujita M., Maruyama K., Todaka D., Ito Y., Hayashi N., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J* **51**, 617-30.
- Nieto C., Morales M., Orjeda G., Clepet C., Monfort A., Sturbois B., Puigdomenech P., Pitrat M., Caboche M. & Dogimont C. (2006) An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal* **48**, 452-62.
- Nishiyama K., Guis M., Rose J.K., Kubo Y., Bennett K.A., Wangjin L., Kato K., Ushijima K., Nakano R., Inaba A., Bouzayen M., Latche A., Pech J.C. & Bennett A.B. (2007) Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *J Exp Bot* **58**, 1281-90.
- Nunez-Paleniuss H.G., Gomez-Lim M., Ochoa-Alejo N., Grumet R., Lester G. & Cantliffe D.J. (2008) Melon fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Crit Rev Biotechnol* **28**, 13-55.
- Nuñez-Paleniuss H.G., Huber D.J., Klee H.J. & Cantliffe D.J. (2007) Fruit ripening characteristics in a transgenic 'Galia' male parental muskmelon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) line. *Postharvest Biology and Technology* **44**, 95-100.
- Nuruzzaman M., Manimekalai R., Sharoni A.M., Satoh K., Kondoh H., Ooka H. & Kikuchi S. (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* **465**, 30-44.

- Obando-Ulloa J.M., Eduardo I., Monforte A.J. & Fernández-Trujillo J.P. (2009) Identification of QTLs related to sugar and organic acid composition in melon using near-isogenic lines. *Scientia Horticulturae* **121**, 425-33.
- Obando-Ulloa J.M., Moreno E., García-Mas J., Nicolai B., Lammertyn J., Monforte A.J. & Fernández-Trujillo J.P. (2008) Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit: 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biology and Technology* **49**, 27-37.
- Obando-Ulloa J.M., Ruiz J., Monforte A.J. & Fernández-Trujillo J.P. (2010) Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.). *Food chemistry* **118**, 815-22.
- Oh S.K., Lee S., Yu S.H. & Choi D. (2005) Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta* **222**, 876-87.
- Ohba T., Takahashi S. & Asada K. (2011) Alteration of fruit characteristics in transgenic tomatoes with modified expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene. *Plant biotechnology* **28**, 25-32.
- Oliver M., Garcia-Mas J., Cardus M., Pueyo N., Lopez-Sese A.L., Arroyo M., Gomez-Paniagua H., Arus P. & de Vicente M.C. (2001) Construction of a reference linkage map for melon. *Genome* **44**, 836-45.
- Olsen A.N., Ernst H.A., Leggio L.L. & Skriver K. (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci* **10**, 79-87.
- Ooka H., Satoh K., Doi K., Nagata T., Otomo Y., Murakami K., Matsubara K., Osato N., Kawai J., Carninci P., Hayashizaki Y., Suzuki K., Kojima K., Takahara Y., Yamamoto K. & Kikuchi S. (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* **10**, 239-47.
- Ordaz-Ortiz J.J., Marcus S.E. & Knox J.P. (2009) Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Mol Plant* **2**, 910-21.
- Osorio S., Alba R., Damasceno C.M., Lopez-Casado G., Lohse M., Zanol M.I., Tohge T., Usadel B., Rose J.K., Fei Z., Giovannoni J.J. & Fernie A.R. (2011) Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol* **157**, 405-25.
- Osorio S. & Fernie A.R. (2014) Fruit ripening: primary metabolism. In: *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC), pp. x, 321 pages, 8 unnumbered pages of plates. CABI, Boston, MA.
- Osorio S., Scossa F. & Fernie A.R. (2013) Molecular regulation of fruit ripening. *Front Plant Sci* **4**, 198.
- Paradis E., Claude J. & Strimmer K. (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**, 289-90.
- Paris M., Zalapa J., McCreight J. & Staub J. (2008) Genetic dissection of fruit quality components in melon (*Cucumis melo* L.) using a RIL population derived from exotic × elite US Western Shipping germplasm. *Molecular Breeding* **22**, 405-19.
- Park S.O., Hwang H.Y. & Crosby K.M. (2009) A genetic linkage map including loci for male sterility, sugars, and ascorbic acid in melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **134**, 67-76.
- Parra-Lobato M.C. & Gomez-Jimenez M.C. (2011) Polyamine-induced modulation of genes involved in ethylene biosynthesis and signalling pathways and nitric oxide production during olive mature fruit abscission. *J Exp Bot* **62**, 4447-65.
- Pauquet J., Burget E., Hagen L., Chovelon V., Menn A.I., Valot N., Desloire S., Caboche M., Rousselle P. & Pitrat M. (2004) Map-based cloning of the Vat gene from melon conferring resistance to both aphid colonization and aphid transmission of several

- viruses. In: *Progress in cucurbit genetics and breeding research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPLA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Olomouc, Czech Republic, 12-17 July, 2004.*, pp. 325-9. Palacký University in Olomouc.
- Pech J.-C., Bouzayen M. & Latché A. (2008) Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science* **175**, 114-20.
- Pech J.C., Bouzayen M. & Latché A. (2014) Cellular, metabolic and molecular aspects of chromoplast differentiation in ripening fruit. In: *Fruit ripening : physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC), pp. x, 321 pages, 8 unnumbered pages of plates. CABI, Boston, MA.
- Pecker I., Chamovitz D., Linden H., Sandmann G. & Hirschberg J. (1992) A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4962-6.
- Pecker I., Gabbay R., Cunningham F.X., Jr. & Hirschberg J. (1996) Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol* **30**, 807-19.
- Percheviel L., Bardin M., Dogimont C. & Pitrat M. (2005a) Relationship between Loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait Loci mapping. *Phytopathology* **95**, 556-65.
- Percheviel L., Dogimont C. & Pitrat M. (2005b) Strain-specific and recessive QTLs involved in the control of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis race 1.2 in a recombinant inbred line population of melon. *Theor Appl Genet* **111**, 65-74.
- Perin C., Gomez-Jimenez M., Hagen L., Dogimont C., Pech J.C., Latche A., Pitrat M. & Lelievre J.M. (2002a) Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiol* **129**, 300-9.
- Perin C., Hagen S., De Conto V., Katzir N., Danin-Poleg Y., Portnoy V., Baudracco-Arnas S., Chadoeuf J., Dogimont C. & Pitrat M. (2002b) A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theor Appl Genet* **104**, 1017-34.
- Pertea M., Pertea G.M., Antonescu C.M., Chang T.C., Mendell J.T. & Salzberg S.L. (2015) StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* **33**, 290-5.
- Pitrat M. (2008) Melon. In: *Vegetables I* (eds. by Prohens J & Nuez F), pp. 283-315. Springer New York.
- Pitrat M., Chauvet M. & Foury C. (1999) Diversity, history and production of cultivated cucurbits. pp. 21-8. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
- Portnoy V., Benyamini Y., Bar E., Harel-Beja R., Gepstein S., Giovannoni J.J., Schaffer A.A., Burger J., Tadmor Y., Lewinsohn E. & Katzir N. (2008) The molecular and biochemical basis for varietal variation in sesquiterpene content in melon (*Cucumis melo* L.) rinds. *Plant Mol Biol* **66**, 647-61.
- Portnoy V., Diber A., Pollock S., Karchi H., Lev S., Tzuri G., Harel-Beja R., Forer R., Portnoy V.H., Lewinsohn E., Tadmor Y., Burger J., Schaffer A. & Katzir N. (2011) Use of Non-Normalized, Non-Amplified cDNA for 454-Based RNA Sequencing of Fleshy Melon Fruit. *The Plant Genome* **4**, 36-46.
- Puranik S., Sahu P.P., Mandal S.N., B V.S., Parida S.K. & Prasad M. (2013) Comprehensive genome-wide survey, genomic constitution and expression profiling of the NAC transcription factor family in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PLoS One* **8**, e64594.

- Puranik S., Sahu P.P., Srivastava P.S. & Prasad M. (2012) NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci* **17**, 369-81.
- Qin G., Wang Y., Cao B., Wang W. & Tian S. (2012) Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. *Plant J* **70**, 243-55.
- Qiu K., Li Z., Yang Z., Chen J., Wu S., Zhu X., Gao S., Gao J., Ren G., Kuai B. & Zhou X. (2015) EIN3 and ORE1 Accelerate Degreening during Ethylene-Mediated Leaf Senescence by Directly Activating Chlorophyll Catabolic Genes in Arabidopsis. *PLoS Genet* **11**, e1005399.
- Rasori A., Ruperti B., Bonghi C., Tonutti P. & Ramina A. (2002) Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *J Exp Bot* **53**, 2333-9.
- Ren T., Qu F. & Morris T.J. (2000) HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* **12**, 1917-26.
- Renner S.S., Schaefer H. & Kocyan A. (2007) Phylogenetics of Cucumis (Cucurbitaceae): cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evol Biol* **7**, 58.
- Robinson R. & Tomes M. (1968) Ripening inhibitor: a gene with multiple effects on ripening. *Rep Tomato Genet Coop* **18**, 36-7.
- Robinson R.W. & Decker-Walters D.S. (1997) *Cucurbits*. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K. ; New York, N.Y.
- Rodriguez-Hernandez A.M., Gosalvez B., Sempere R.N., Burgos L., Aranda M.A. & Truniger V. (2012) Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for Cm-eIF4E show broad virus resistance. *Mol Plant Pathol* **13**, 755-63.
- Rodriguez-Moreno L., Gonzalez V.M., Benjak A., Marti M.C., Puigdomenech P., Aranda M.A. & Garcia-Mas J. (2011) Determination of the melon chloroplast and mitochondrial genome sequences reveals that the largest reported mitochondrial genome in plants contains a significant amount of DNA having a nuclear origin. *BMC Genomics* **12**, 424.
- Roman G., Lubarsky B., Kieber J.J., Rothenberg M. & Ecker J.R. (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* **139**, 1393-409.
- Ronen G., Carmel-Goren L., Zamir D. & Hirschberg J. (2000) An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11102-7.
- Rose J.K., Saladie M. & Catala C. (2004) The plot thickens: New perspectives of primary cell wall modification. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 296-301.
- Ruperti B., Cattivelli L., Pagni S. & Ramina A. (2002) Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *J Exp Bot* **53**, 429-37.
- Rushton P.J., Bokowiec M.T., Han S., Zhang H., Brannock J.F., Chen X., Laudeman T.W. & Timko M.P. (2008) Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. *Plant Physiol* **147**, 280-95.
- Saladie M., Canizares J., Phillips M.A., Rodriguez-Concepcion M., Larrigaudiere C., Gibon Y., Stitt M., Lunn J.E. & Garcia-Mas J. (2015) Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. *BMC Genomics* **16**, 440.
- Saladie M., Matas A.J., Isaacson T., Jenks M.A., Goodwin S.M., Niklas K.J., Xiaolin R., Labavitch J.M., Shackel K.A., Fernie A.R., Lytovchenko A., O'Neill M.A., Watkins

- C.B. & Rose J.K. (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol* **144**, 1012-28.
- Saladie M., Rose J.K., Cosgrove D.J. & Catala C. (2006) Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. *Plant J* **47**, 282-95.
- Saladie M., Wright L.P., Garcia-Mas J., Rodriguez-Concepcion M. & Phillips M.A. (2014) The 2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway in melon is regulated by specialized isoforms for the first and last steps. *J Exp Bot* **65**, 5077-92.
- Sanseverino W., Henaff E., Vives C., Pinosio S., Burgos-Paz W., Morgante M., Ramos-Onsins S.E., Garcia-Mas J. & Casacuberta J.M. (2015) Transposon Insertions, Structural Variations, and SNPs Contribute to the Evolution of the Melon Genome. *Mol Biol Evol* **32**, 2760-74.
- Satheesh V., Jagannadham P.T., Chidambaranathan P., Jain P.K. & Srinivasan R. (2014) NAC transcription factor genes: genome-wide identification, phylogenetic, motif and cis-regulatory element analysis in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Mol Biol Rep* **41**, 7763-73.
- Sato-Nara K., Yuhashi K.I., Higashi K., Hosoya K., Kubota M. & Ezura H. (1999) Stage- and tissue-specific expression of ethylene receptor homolog genes during fruit development in muskmelon. *Plant Physiol* **120**, 321-30.
- Schaffer A.A. & Petreikov M. (1997) Sucrose-to-Starch Metabolism in Tomato Fruit Undergoing Transient Starch Accumulation. *Plant Physiol* **113**, 739-46.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R. & Lewinsohn E. (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J* **54**, 712-32.
- Sebastian P., Schaefer H., Telford I.R. & Renner S.S. (2010) Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14269-73.
- Selth L.A., Dogra S.C., Rasheed M.S., Healy H., Randles J.W. & Rezaian M.A. (2005) A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell* **17**, 311-25.
- Seymour G.B., Ostergaard L., Chapman N.H., Knapp S. & Martin C. (2013) Fruit development and ripening. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 219-41.
- Seymour G.B., Ryder C.D., Cevik V., Hammond J.P., Popovich A., King G.J., Vrebalov J., Giovannoni J.J. & Manning K. (2011) A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *J Exp Bot* **62**, 1179-88.
- Shalit M., Katzir N., Tadmor Y., Larkov O., Burger Y., Shalekhet F., Lastochkin E., Ravid U., Amar O., Edelstein M., Karchi Z. & Lewinsohn E. (2001) Acetyl-coa: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *J Agric Food Chem* **49**, 794-9.
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B. & Ideker T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **13**, 2498-504.
- Sharma M.K., Kumar R., Solanke A.U., Sharma R., Tyagi A.K. & Sharma A.K. (2010) Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Mol Genet Genomics* **284**, 455-75.
- Shiomi S., Yamamoto M., Nakamura R. & Inaba A. (1999) Expression of ACC Synthase and ACC Oxidase Genes in Melons Harvested at Different Stages of Maturity. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **68**, 10-7.

- Shiota H., Sudoh T. & Tanaka I. (2006) Expression analysis of genes encoding plasma membrane aquaporins during seed and fruit development in tomato. *Plant Science* **171**, 277-85.
- Shiriga K., Sharma R., Kumar K., Yadav S.K., Hossain F. & Thirunavukkarasu N. (2014) Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the NAC family in maize. *Meta Gene* **2**, 407-17.
- Sienkiewicz-Porzucek A., Sulpice R., Osorio S., Krahnert I., Leisse A., Urbanczyk-Wochniak E., Hodges M., Fernie A.R. & Nunes-Nesi A. (2010) Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. *Mol Plant* **3**, 156-73.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Soding J., Thompson J.D. & Higgins D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539.
- Silva J.A., da Costa T.S., Lucchetta L., Marini L.J., Zanuzo M.R., Nora L., Nora F.R., Twyman R.M. & Rombaldi C.V. (2004) Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. *Postharvest Biology and Technology* **32**, 263-8.
- Simkin A.J., Schwartz S.H., Auldridge M., Taylor M.G. & Klee H.J. (2004) The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J* **40**, 882-92.
- Sinclair J.W., Park S.O., Lester G.E., Yoo K.S. & Crosby K.M. (2006) Identification and Confirmation of RAPD Markers and Andromonoecious Associated with Quantitative Trait Loci for Sugars in Melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **131**, 360-71.
- Singh A. & Yadava K. (1984) An analysis of interspecific hybrids and phylogenetic implications in Cucumis (Cucurbitaceae). *Plant systematics and evolution* **147**, 237-52.
- Slade A.J. & Knauf V.C. (2005) TILLING moves beyond functional genomics into crop improvement. *Transgenic Res* **14**, 109-15.
- Smith D.L., Abbott J.A. & Gross K.C. (2002) Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol* **129**, 1755-62.
- Solano R., Stepanova A., Chao Q. & Ecker J.R. (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* **12**, 3703-14.
- Souer E., van Houwelingen A., Kloos D., Mol J. & Koes R. (1996) The no apical meristem gene of Petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159-70.
- Speirs J., Lee E., Holt K., Yong-Duk K., Steele Scott N., Loveys B. & Schuch W. (1998) Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiol* **117**, 1047-58.
- Stepansky A., Kovalski I., Schaffer A.A. & Perl-Treves R. (1999) Variation in sugar levels and invertase activity in mature fruit representing a broad spectrum of Cucumis melo genotypes. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 53-62.
- Stothard P. (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**, 1102, 4.
- Stoutjesdijk P.A., Singh S.P., Liu Q., Hurlstone C.J., Waterhouse P.A. & Green A.G. (2002) hpRNA-mediated targeting of the Arabidopsis FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol* **129**, 1723-31.

- Su H., Zhang S., Yin Y., Zhu D. & Han L. (2015) Genome-wide analysis of NAM-ATAF1, 2-CUC2 transcription factor family in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **24**, 176-83.
- Sun L., Sun Y., Zhang M., Wang L., Ren J., Cui M., Wang Y., Ji K., Li P., Li Q., Chen P., Dai S., Duan C., Wu Y. & Leng P. (2012) Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato. *Plant Physiol* **158**, 283-98.
- Sweeney J.P., Chapman V.J. & Hepner P.A. (1970) Sugar, acid, and flavor in fresh fruits. *J Am Diet Assoc* **57**, 432-5.
- Sweetman C., Wong D.C., Ford C.M. & Drew D.P. (2012) Transcriptome analysis at four developmental stages of grape berry (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) provides insights into regulated and coordinated gene expression. *BMC Genomics* **13**, 691.
- Szabó Z., Gyulai G., Humphreys M., Horváth L., Bittsánszky A., Lágler R. & Heszky L. (2005) Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica* **146**, 87-94.
- Tadmor Y., Burger J., Yaakov I., Feder A., Libhaber S.E., Portnoy V., Meir A., Tzuri G., Sa'ar U., Rogachev I., Aharoni A., Abeliovich H., Schaffer A.A., Lewinsohn E. & Katzir N. (2010) Genetics of flavonoid, carotenoid, and chlorophyll pigments in melon fruit rinds. *J Agric Food Chem* **58**, 10722-8.
- Tadmor Y., Katzir N., Meir A., Yaniv-Yaakov A., Sa'ar U., Baumkoler F., Lavee T., Lewinsohn E., Schaffer A. & Burger J. (2007) Induced mutagenesis to augment the natural genetic variability of melon (*Cucumis melo* L.). *Israel Journal of Plant Sciences* **55**, 159-69.
- Takada S., Hibara K., Ishida T. & Tasaka M. (2001) The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**, 1127-35.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-9.
- Team R.C. (2000) R Language Definition. Available from CRAN sites.
- Thimm O., Blasing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Muller L.A., Rhee S.Y. & Stitt M. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**, 914-39.
- Thompson A.J., Tor M., Barry C.S., Vrebalov J., Orfila C., Jarvis M.C., Giovannoni J.J., Grierson D. & Seymour G.B. (1999) Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiol* **120**, 383-90.
- Tieman D., Taylor M., Schauer N., Fernie A.R., Hanson A.D. & Klee H.J. (2006) Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8287-92.
- Tieman D.M., Ciardi J.A., Taylor M.G. & Klee H.J. (2001) Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant J* **26**, 47-58.
- Tieman D.M., Harriman R.W., Ramamohan G. & Handa A.K. (1992) An Antisense Pectin Methylesterase Gene Alters Pectin Chemistry and Soluble Solids in Tomato Fruit. *Plant Cell* **4**, 667-79.
- Tigchelaar E. & McGlasson W. (1978) Genetic regulation of tomato ripening. *CSIRO Food Research Quarterly*.
- Tigchelaar E., Tomes M., Kerr E. & Barman R. (1973) A new fruit ripening mutant, non-ripening (nor). *Rep Tomato Genet Coop* **23**, 33.

- Tournier B., Sanchez-Ballesta M.T., Jones B., Pesquet E., Regad F., Latche A., Pech J.C. & Bouzayen M. (2003) New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett* **550**, 149-54.
- Trainotti L., Bonghi C., Ziliotto F., Zanin D., Rasori A., Casadoro G., Ramina A. & Tonutti P. (2006) The use of microarray μ PEACH1.0 to investigate transcriptome changes during transition from pre-climacteric to climacteric phase in peach fruit. *Plant Science* **170**, 606-13.
- Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L. & Pachter L. (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* **31**, 46-53.
- Tucker M.L. (2014) Cell-wall metabolism and softening during ripening. In: *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC), pp. x, 321 pages, 8 unnumbered pages of plates. CABI, Boston, MA.
- Tucker M.L. & Kim J. (2015) Abscission research: what we know and what we still need to study. *Stewart Postharvest Review* **11**, 1-7.
- Tucker M.L., Whitelaw C.A., Lyssenko N.N. & Nath P. (2002) Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic leucine zipper transcription factors. *Plant Physiol* **130**, 1487-96.
- Turner S.D. (2014) qqman: an R package for visualizing GWAS results using QQ and manhattan plots.
- Tzin V. & Galili G. (2010) New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant* **3**, 956-72.
- Tzuri G., Zhou X., Chayut N., Yuan H., Portnoy V., Meir A., Sa'ar U., Baumkoler F., Mazourek M., Lewinsohn E., Fei Z., Schaffer A.A., Li L., Burger J., Katzir N. & Tadmor Y. (2015) A 'golden' SNP in CmOr governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*). *Plant J* **82**, 267-79.
- Uppalapati S.R., Ishiga Y., Wangdi T., Urbanczyk-Wochniak E., Ishiga T., Mysore K.S. & Bender C.L. (2008) Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. tomato on tomato seedlings: phenotypic and gene expression analyses of the virulence function of coronatine. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 383-95.
- van Leeuwen H., Monfort A., Zhang H.B. & Puigdomenech P. (2003) Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**, 703-18.
- Vegas J. (2014) Estudio genético de la maduración del fruto en melón en la línea isogénica SC3-5-1. In: *Departamento de Genética*. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Vegas J., Garcia-Mas J. & Monforte A.J. (2013) Interaction between QTLs induces an advance in ethylene biosynthesis during melon fruit ripening. *Theor Appl Genet* **126**, 1531-44.
- Voorrips R.E. (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* **93**, 77-8.
- Vrebalov J., Pan I.L., Arroyo A.J., McQuinn R., Chung M., Poole M., Rose J., Seymour G., Grandillo S., Giovannoni J. & Irish V.F. (2009) Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *Plant Cell* **21**, 3041-62.
- Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W. & Giovannoni J. (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* **296**, 343-6.

- Vroemen C.W., Mordhorst A.P., Albrecht C., Kwaaitaal M.A. & de Vries S.C. (2003) The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1563-77.
- Wang N., Zheng Y., Xin H., Fang L. & Li S. (2013) Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep* **32**, 61-75.
- Wang Z., Gerstein M. & Snyder M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57-63.
- Watanabe K., Saito T., Hirota S., Takahashi B. & Fujishita N. (1991) Carotenoid Pigments in Orange, Light Orange, Green and White Flesh Colored Fruits of Melon (*Cucumis melo* L.). *NIPPON SHOKUHIN KOGYO GAKKAISHI* **38**, 153-9.
- Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M., Clamp M. & Barton G.J. (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-91.
- Waterhouse P.M., Graham M.W. & Wang M.B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13959-64.
- Waterhouse P.M. & Helliwell C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* **4**, 29-38.
- Waterhouse P.M., Wang M.B. & Lough T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-42.
- Welner D.H., Lindemose S., Grossmann J.G., Mollegaard N.E., Olsen A.N., Helgstrand C., Skriver K. & Lo Leggio L. (2012) DNA binding by the plant-specific NAC transcription factors in crystal and solution: a firm link to WRKY and GCM transcription factors. *Biochem J* **444**, 395-404.
- Welsch R., Maass D., Voegel T., Dellapenna D. & Beyer P. (2007) Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **145**, 1073-85.
- Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G. & Waterhouse P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**, 581-90.
- Willemsen V., Bauch M., Bennett T., Campilho A., Wolkenfelt H., Xu J., Haseloff J. & Scheres B. (2008) The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells. *Dev Cell* **15**, 913-22.
- Wood A.J., Lo T.W., Zeitler B., Pickle C.S., Ralston E.J., Lee A.H., Amora R., Miller J.C., Leung E., Meng X., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D. & Meyer B.J. (2011) Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* **333**, 307.
- Woycicki R., Witkowicz J., Gawronski P., Dabrowska J., Lomsadze A., Pawelkowicz M., Siedlecka E., Yagi K., Plader W., Seroczynska A., Smiech M., Gutman W., Niemirowicz-Szczytt K., Bartoszewski G., Tagashira N., Hoshi Y., Borodovsky M., Karpinski S., Malepszy S. & Przybecki Z. (2011) The genome sequence of the North-European cucumber (*Cucumis sativus* L.) unravels evolutionary adaptation mechanisms in plants. *PLoS One* **6**, e22728.
- Wu A., Allu A.D., Garapati P., Siddiqui H., Dortay H., Zanol M.I., Asensi-Fabado M.A., Munne-Bosch S., Antonio C., Tohge T., Fernie A.R., Kaufmann K., Xue G.P., Mueller-Roeber B. & Balazadeh S. (2012) JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 482-506.

- Wu J., Xu Z., Zhang Y., Chai L., Yi H. & Deng X. (2014) An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. *J Exp Bot* **65**, 1651-71.
- Wu Y., Deng Z., Lai J., Zhang Y., Yang C., Yin B., Zhao Q., Zhang L., Li Y., Yang C. & Xie Q. (2009) Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res* **19**, 1279-90.
- Wu Z., Xu X., Xiong W., Wu P., Chen Y., Li M., Wu G. & Jiang H. (2015) Genome-Wide Analysis of the NAC Gene Family in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). *PLoS One* **10**, e0131890.
- Wyllie S.G. & Fellman J.K. (2000) Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *J Agric Food Chem* **48**, 3493-6.
- Xie Q., Frugis G., Colgan D. & Chua N.H. (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* **14**, 3024-36.
- Xie X., Song Y., Liu X., Wang S., Zhu C. & Wen F. (2014) Different target genes and chimeric-gene hairpin structures affect virus resistance mediated by RNA silencing in transgenic tobacco. *Biologia Plantarum* **58**, 575-81.
- Yahyaoui F.E., Wongs-Aree C., Latche A., Hackett R., Grierson D. & Pech J.C. (2002) Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *Eur J Biochem* **269**, 2359-66.
- Yamaguchi M., Ohtani M., Mitsuda N., Kubo M., Ohme-Takagi M., Fukuda H. & Demura T. (2010) VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 1249-63.
- Yamamoto M., Miki T., Ishiki Y., Fujinami K., Yanagisawa Y., Nakagawa H., Ogura N., Hirabayashi T. & Sato T. (1995) The synthesis of ethylene in melon fruit during the early stage of ripening. *Plant and cell physiology* **36**, 591-6.
- Yang R., Deng C., Ouyang B. & Ye Z. (2011a) Molecular analysis of two salt-responsive NAC-family genes and their expression analysis in tomato. *Mol Biol Rep* **38**, 857-63.
- Yang S.F. & Hoffman N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 155-89.
- Yang X., Song J., Fillmore S., Pang X. & Zhang Z. (2011b) Effect of high temperature on color, chlorophyll fluorescence and volatile biosynthesis in green-ripe banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* **62**, 246-57.
- Yen H.C., Lee S., Tanksley S.D., Lanahan M.B., Klee H.J. & Giovannoni J.J. (1995) The tomato Never-ripe locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the Arabidopsis ETR1 gene. *Plant Physiol* **107**, 1343-53.
- Yi S., Akashi Y., Tanaka K., Cho T., Khaing M., Yoshino H., Nishida H., Yamamoto T., Win K. & Kato K. (2009) Molecular analysis of genetic diversity in melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Myanmar and their relationship with melon germplasm from East and South Asia. *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**, 1149-61.
- Yokotani N., Nakano R., Imanishi S., Nagata M., Inaba A. & Kubo Y. (2009) Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. *J Exp Bot* **60**, 3433-42.
- You J., Zhang L., Song B., Qi X. & Chan Z. (2015) Systematic analysis and identification of stress-responsive genes of the NAC gene family in *Brachypodium distachyon*. *PLoS One* **10**, e0122027.
- Yu K., Xu Q., Da X., Guo F., Ding Y. & Deng X. (2012) Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC Genomics* **13**, 10.

- Yuste-Lisbona F.J., Capel C., Gomez-Guillamon M.L., Capel J., Lopez-Sese A.I. & Lozano R. (2011) Codominant PCR-based markers and candidate genes for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* **122**, 747-58.
- Zalapa J.E., Staub J.E., McCreight J.D., Chung S.M. & Cuevas H. (2007) Detection of QTL for yield-related traits using recombinant inbred lines derived from exotic and elite US Western Shipping melon germplasm. *Theor Appl Genet* **114**, 1185-201.
- Zanor M.I., Osorio S., Nunes-Nesi A., Carrari F., Lohse M., Usadel B., Kuhn C., Bleiss W., Giavalisco P., Willmitzer L., Sulpice R., Zhou Y.H. & Fernie A.R. (2009) RNA interference of LIN5 in tomato confirms its role in controlling Brix content, uncovers the influence of sugars on the levels of fruit hormones, and demonstrates the importance of sucrose cleavage for normal fruit development and fertility. *Plant Physiol* **150**, 1204-18.
- Zarembinski T.I. & Theologis A. (1994) Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. In: *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants* (pp. 343-61). Springer.
- Zenoni S., Ferrarini A., Giacomelli E., Xumerle L., Fasoli M., Malerba G., Bellin D., Pezzotti M. & Delledonne M. (2010) Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant Physiology* **152**, 1787-95.
- Zhang B. & Chen K. (2014) Aroma volatiles. In: *Fruit ripening : physiology, signalling and genomics* (eds. by Nath P, Bouzayen M, Mattoo A & Pech JC). CABI, Boston, MA.
- Zhong R., Demura T. & Ye Z.H. (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 3158-70.
- Zhong S., Fei Z., Chen Y.R., Zheng Y., Huang M., Vrebalov J., McQuinn R., Gapper N., Liu B., Xiang J., Shao Y. & Giovannoni J.J. (2013) Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat Biotechnol* **31**, 154-9.
- Zhou J., Zhong R. & Ye Z.H. (2014) Arabidopsis NAC domain proteins, VND1 to VND5, are transcriptional regulators of secondary wall biosynthesis in vessels. *PLoS One* **9**, e105726.
- Zhu M., Chen G., Zhou S., Tu Y., Wang Y., Dong T. & Hu Z. (2014) A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor, SINAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. *Plant Cell Physiol* **55**, 119-35.
- Ziliotto F., Begheldo M., Rasori A., Bonghi C. & Tonutti P. (2008) Transcriptome profiling of ripening nectarine (*Prunus persica* L. Batsch) fruit treated with 1-MCP. *J Exp Bot* **59**, 2781-91.

8. ANEXO

Tabla A.4.1.1: Genotipado y fenotipado de la población PT-2013. Genotipado utilizando TaqMan (marcadores señalados con *) y KASP según se describe en el ap. 3.6.2. A: homocigoto para SC; B: homocigoto para PS; H: heterocigoto; -: genotipado fallido. DAP: días tras la polinización. El fenotipado del cambio de color distingue entre un viraje completo de verde oscuro a amarillo (SI), de verde oscuro a verde pálido (SI-), un viraje completo pero solamente en algunas zonas del fruto (zonal) y ausencia de viraje (NO). El olor del fruto utiliza una escala similar en la que SI- indica poca producción de aromas. La variable “fenotipo” resume los caracteres anteriores y clasifica el fruto en CL: climatérico, NCL: no climatérico, ? : ambiguo.

Parental	Progenie	SNP-64658*	SNP-193229	SNP-305343	SNP-423732	SNP-551712	SNP-719040	SNP-833872	SNP-911281	SNP-997101	SNP-1121435	SNP-1249717	SNP-1326612	SNP-1412559	SNP-1497449	SNP-1631731	SNP-1773082	SNP-1839795	SNP-1986139	SNP-2100393	SNP-2192884	SNP-2319007	SNP-2424110	SNP-2520741	SNP-2609965	SNP-2691690	SNP-2826073*	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Cambio de color	Olor	Fenotipo	
R02	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H					
R02.1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	49	-	SI	SI	CL
R02.2	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	57	NO	NO	NCL	
R02.3	A	A	A	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	NO	?	NCL		
R02.4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	53	-	SI	SI	CL	
R02.5	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	62	NO	NO	NCL	
R02.6	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	NO	SI	CL		
R02.7	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	59	SI (-)	SI	CL	
R02.8	A	A	A	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	NO	SI	CL		
R02.9	-	A	A	-	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	B	-	B	B	B	H	-	B	-	B	-	-	-	55	NO	NO	NCL		
R02.10	A	A	A	A	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	-	55	NO	NO	NCL	
R02.11	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	SI (-)	?	?		
R02.12	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	57	zonal	SI	CL		
R02.13	A	A	A	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	57	SI (-)	SI	CL		
R02.14	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	NO	NO	NCL		
R02.15	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	59	NO	NO	NCL	
R02.16	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	57	NO	SI	CL		
R02.17	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	SI (-)	?	?		
R02.18	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	NO	SI	CL		
R02.19	A	A	A	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	SI (-)	SI	CL		
R02.20	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	zonal	SI	CL		
R03	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H						
R03.1	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	55	SI (-)	SI	CL		
R03.2	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	62	zonal	SI	CL	
R03.3	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	51	-	NO	SI	CL	
R03.4	-	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	59	NO	SI	CL	
R03.5	-	A	A	-	-	H	-	H	-	H	-	A	-	-	H	H	H	-	-	H	A	H	-	-	-	-	-	59	SI (-)	SI	CL		
R03.6	A	A	A	A	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	75	NO	NO	NCL	
R03.7	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	NO	SI (-)	CL	
R03.8	-	A	A	-	-	-	-	H	-	H	-	-	-	-	H	H	H	-	-	H	-	H	-	H	-	H	-	59	-	SI	SI	CL	
R03.9	-	A	A	-	B	B	B	B	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	62	NO	NO	NCL	
R03.10	-	A	A	-	-	B	-	B	B	B	-	B	B	-	B	B	-	B	B	-	B	-	B	-	B	-	-	-	62	NO	NO	NCL	
R03.11	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	59	NO	SI	CL	
R03.12	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	59	NO	SI	CL	
R03.13	A	A	A	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	52	NO	NO	NCL		
R03.14	A	A	A	A	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	55	NO	NO	NCL		
R03.15	A	A	A	A	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	62	NO	NO	NCL		
R03.16	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	65	NO	SI	CL	
R03.17	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	57	NO	SI	CL		
R03.18	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	SI	SI	CL		
R03.19	-	A	A	-	H	-	H	-	H	-	H	-	-	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	59	NO	NO	NCL		

Tabla A.4.1.1: Genotipado y fenotipado de la población PT-2013 (continuación).

Parental	Progenie	SNP-64658*	SNP-193229	SNP-305343	SNP-423732	SNP-551712	SNP-719040	SNP-833872	SNP-911281	SNP-997101	SNP-1121435	SNP-1249717	SNP-1326612	SNP-1412559	SNP-1497449	SNP-1631731	SNP-1773082	SNP-1839795	SNP-1986139	SNP-2100393	SNP-2192884	SNP-2319007	SNP-2424110	SNP-2520741	SNP-2609965	SNP-2691690	SNP-2826073*	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Cambio de color	Olor	Fenotipo		
R12		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	61	NO	NO	NCL	
R12.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61	NO	NO	NCL	
R12.2		B	B	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	58	NO	NO	NCL		
R12.3		B	B	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	46	-	SI	SI	CL	
R12.4		B	B	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	64	NO	NO	NCL		
R12.5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	H	-	-	-	-	H	-	64	SI	SI	CL		
R12.6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	H	H	-	-	-	-	-	58	SI	SI	CL		
R12.7		B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	56	NO	NO	NCL		
R12.8		B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	47	zonal	NO	NCL		
R12.9		B	B	-	-	-	-	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	56	NO	NO	NCL		
R12.10		-	B	-	-	-	-	-	-	-	B	-	B	-	-	B	B	B	B	-	B	B	B	-	B	-	B	-	56	NO	NO	NCL		
R12.11		-	B	-	-	-	-	B	-	B	-	B	-	B	-	B	A	-	A	A	A	-	-	A	A	A	-	-	54	SI	SI	CL		
R12.13		-	B	-	-	-	-	B	-	B	B	B	-	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	61	NO	NO	NCL		
R12.14		-	B	-	-	-	-	B	-	B	-	B	-	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	-	B	-	-	-	58	NO	NO	NCL		
R12.15		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	51	NO	NO	NCL		
R12.16		-	B	-	-	-	-	B	B	-	B	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	72	NO	NO	NCL		
R12.17		-	B	-	-	-	-	-	-	-	B	-	B	-	B	-	B	B	B	B	-	B	-	B	-	B	-	-	56	NO	NO	NCL		
R12.18		B	B	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	62	SI	SI	CL		
R12.19		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	61	NO	NO	NCL		
R12.20		-	B	-	-	-	-	B	-	B	-	B	-	B	B	-	B	B	B	-	B	-	B	-	B	-	-	-	79	NO	NO	NCL		
R15		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	53	-	SI(-)	SI	CL	
R15.1		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	77	NO	NO	NCL		
R15.2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	-	65	NO	NO	NCL	
R15.3		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	64	SI(-)	SI	CL		
R15.4		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	-	57	-	SI(-)	SI	CL
R15.5		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	-	56	NO	?	?		
R15.6		A	A	A	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	-	72	NO	NO	NCL		
R15.7		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	64	NO	NO	NCL		
R15.8		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	46	-	SI(-)	SI	CL	
R15.9		-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	A	A	-	A	A	A	A	-	A	-	A	-	A	-	-	49	-	SI	SI	CL	
R15.10		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	75	NO	NO	NCL		
R15.11		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	57	NO	SI	CL		
R15.12		A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	61	NO	NO	NCL		
R15.13		A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	55	NO	NO	NCL		
R15.14		A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	56	NO	NO	NCL		
R15.15		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	53	-	SI(-)	SI(-)	CL	
R15.17		-	A	-	-	-	-	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	70	SI(-)	?	?		
R15.18		-	A	-	-	-	-	A	-	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	77	NO	NO	NCL		
R15.19		-	A	-	-	-	-	A	-	A	A	A	A	A	A	-	B	B	B	B	B	B	-	B	-	-	-	-	60	-	SI(-)	SI	CL	
R15.20		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	60	-	SI(-)	SI	CL	
R16		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	41	-	SI	SI	CL	
R16.1		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	47	SI	SI	CL		
R16.2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	56	SI	SI	CL		
R16.3		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	48	-	SI(-)	?	?	
R16.4		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	55	-	SI(-)	SI(-)	CL	
R16.5		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	46	-	SI	SI	CL	
R16.6		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	77	NO	?	?		
R16.7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	54	-	SI	SI	CL	
R16.8		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	52	-	SI	SI	CL	
R16.9		H	H	-	-	-	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	52	-	SI(-)	SI(-)	CL	
R16.10		H	B	-	-	-	-	-	-	-	B	B	B	-	B	B	-	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	-	54	-	SI	SI(-)	CL	
R16.11		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	52	-	SI	SI	CL	
R16.12		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	55	SI	SI	CL		
R16.13		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	46	-	SI	SI	CL	
R16.14		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	56	-	SI	SI	CL	
R16.15		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	49	-	SI	SI	CL	
R16.16		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	42	-	SI	SI	CL	
R16.17		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	61	NO	SI	CL		
R16.18		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	47	-	SI(-)	SI	CL	
R16.19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61	SI(-)	SI	CL		
R16.20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla A.4.1.1: Genotipado y fenotipado de la población PT-2013 (continuación).

Parental	Progenie	SNP-64658*	SNP-193229	SNP-305343	SNP-423732	SNP-551712	SNP-719040	SNP-833872	SNP-911281	SNP-997101	SNP-1121435	SNP-1249717	SNP-1326612	SNP-1412559	SNP-1497449	SNP-1631731	SNP-1773082	SNP-1839795	SNP-1986139	SNP-2100393	SNP-2192884	SNP-2319007	SNP-2424110	SNP-2520741	SNP-2609965	SNP-2691690	SNP-2826073*	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Cambio de color	Olor	Fenotipo			
R23		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	-	70	NO	NO	NCL		
R23.1		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	B	-	B	B	-	-	64	SI (-)	NO	NCL		
R23.2		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	-	-	75	SI (-)	NO	NCL		
R23.3		-	A	-	-	-	-	-	A	-	A	-	A	-	A	A	-	A	A	A	A	-	-	H	H	H	-	-	-	62	SI (-)	NO	NCL		
R23.4		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	62	SI (-)	SI	CL		
R23.5		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	62	SI (-)	SI	CL		
R23.6		-	A	-	A	-	-	-	A	-	A	A	A	-	A	A	-	A	A	A	A	-	-	B	B	B	B	-	-	72	NO	NO	NCL		
R23.7		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	H	-	H	-	-	-	75	SI (-)	NO	NCL		
R23.8		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	H	-	-	-	-	-	70	SI	SI	CL		
R23.10		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	-	-	70	NO	?	?		
R23.11		A	A	-	-	-	-	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	-	-	-	56	-	NO	SI	CL	
R23.12		-	A	-	-	-	-	-	A	-	A	-	A	-	A	-	-	A	A	A	A	-	-	H	H	H	-	-	-	51	-	SI	SI	CL	
R23.13		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	46	-	SI (-)	SI	CL	
R23.14		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	77	NO	NO	NCL	
R23.15		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	H	-	H	-	-	-	72	NO	NO	NCL		
R23.16		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	-	-	70	SI	SI	CL		
R23.17		A	A	-	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	-	-	68	NO	NO	NCL		
R23.18		A	A	-	-	-	-	-	A	-	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	H	H	H	-	-	-	69	SI (-)	NO	NCL		
R23.19		A	A	-	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	-	-	72	SI	SI	CL		
R23.20		-	A	-	-	-	-	-	A	-	A	-	A	-	A	-	-	A	A	A	A	-	-	H	H	H	-	-	-	-	62	NO	NO	NCL	
R24		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	62	NO	NO	NCL	
R24.1		A	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	62	NO	NO	NCL	
R24.2		A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	A	-	-	62	NO	NO	NCL	
R25		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	-	51	-	SI	SI	CL
R25.1		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	45	-	SI	SI	CL
R25.2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	55	-	SI (-)	SI	CL
R25.3		B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	57	-	SI	SI	CL
R25.4		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	51	-	SI (-)	SI	CL
R25.5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	46	-	SI	SI	CL
R25.6		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	46	-	SI	SI	CL
R25.7		H	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	45	-	SI	SI	CL
R25.8		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	53	-	SI (-)	SI	CL
R25.10		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	40	-	SI	SI	CL
R25.14		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	45	-	SI (-)	SI	CL
R25.15		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	79	SI (-)	?	?
R25.16		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	55	-	SI	SI	CL
R25.17		H	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	51	-	SI	SI	CL
R25.18		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	49	-	SI	SI	CL
R25.19		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-
R27		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	61	SI (-)	SI	CL	
R27.2		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	75	NO	NO	NCL	
R27.3		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	62	SI (-)	SI	CL	
R27.4		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	61	NO	NO	NCL	
R27.5		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	54	SI (-)	SI	CL	
R27.6		H	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	-	H	H	H	-	-	55	NO	NO	NCL		
R27.8		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	62	NO	NO	NCL	
R27.9		H	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	62	NO	NO	NCL	
R27.10		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	77	NO	NO	NCL	
R27.11		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	60	NO	NO	NCL	
R27.12		A	A	H	A	-	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	59	NO	SI	CL	
R27.13		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	55	NO	NO	NCL	
R27.14		H	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	42	-	SI	SI	CL
R27.15		B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	56	-	SI (-)	SI	CL
R27.16		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	46	-	SI	SI	CL
R27.17		H	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	H	H	H	H	H	-	-	72	NO	SI	CL	
R27.18		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	-	44	-	SI	SI	CL
R27.19		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	-	-	-	-	-	-	
R27.20		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	

Tabla A.4.1.2: Genotipado y fenotipado de las líneas GF31, GF35, GF40, SC y PS, utilizadas como controles de la población PT-2013. Todos los marcadores son SSRs y han sido genotipados según se describe en el ap. 3.6.1. A: homocigoto para SC; B: homocigoto para PS; H: heterocigoto. DAP: días tras la polinización. El fenotipado del cambio de color distingue entre un viraje completo de verde oscuro a amarillo (SI), de verde oscuro a verde pálido (SI-) y ausencia de viraje (NO). El olor del fruto utiliza una escala similar en la que SI- indica poca producción de aromas. La variable “fenotipo” resume los caracteres anteriores y clasifica el fruto en CL: climatérico, NCL: no climatérico, ?: ambiguo.

Parental	Progenie	GLIII		GLVI		Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Cambio de color	Olor	Fenotipo
		A_16-C12	PS_18-D10	PSL_41-H06	CL_23-F08					
PS										
	PS.1	B	B	B	B	-	55	NO	NO	NCL
	PS.2	B	B	B	B	-	55	NO	NO	NCL
	PS.3	B	B	B	B	-	47	NO	NO	NCL
	PS.4	B	B	B	B	-	65	NO	NO	NCL
	PS.5	B	B	B	B	-	55	NO	NO	NCL
SC										
	SC.1	A	A	A	A	57	-	NO	?	?
	SC.2	A	A	A	A	-	46	NO	NO	NCL
	SC.3	A	A	A	A	-	48	NO	NO	NCL
	SC.4	A	A	A	A	-	59	NO	NO	NCL
	SC.5	A	A	A	A	-	59	SI	?	?
GF31*										
	GF31.2	A	A	A	A	31	-	SI (-)	SI	CL
	GF31.4	A	A	A	A	38	-	SI	SI	CL
	GF31.5	A	A	A	A	38	-	SI (-)	SI	CL
GF35*										
	GF35.1	A	A	B	B	45	-	SI (-)	SI	CL
	GF35.2	A	A	B	B	43	-	SI (-)	SI	CL
	GF35.4	A	A	B	B	38	-	SI (-)	SI	CL
	GF35.5	A	A	B	B	51	-	SI (-)	SI	CL
GF40*										
	GF40.1	B	B	A	A	61	-	SI	SI	CL
	GF40.2	B	B	A	A	47	-	SI	SI	CL
	GF40.3	B	B	A	A	47	-	SI	SI	CL
	GF40.4	B	B	A	A	45	-	SI	SI	CL
	GF40.5	B	B	A	A	-	65	NO	SI	CL

Tabla A.4.1.3: Genotipado y fenotipado de la población PT-2014. Genotipado utilizando TaqMan (marcadores señalados con *) y KASP. A: homocigoto para SC; B: homocigoto para PS; H: heterocigoto; -: genotipado fallido. DAP: días tras la polinización. El fenotipado del cambio de color distingue entre un viraje completo de verde oscuro a amarillo (SI), de verde oscuro a verde pálido (SI-), un viraje completo pero solamente en algunas zonas del fruto (zonal) y ausencia de viraje (NO). El olor del fruto utiliza una escala similar en la que SI- indica poca producción de aromas. La variable “fenotipo” resume los caracteres anteriores y clasifica el fruto en CL: climatérico, NCL: no climatérico; ?: ambiguo.

Parental	Progenie	SNP-64658*	SNP-193229	SNP-305343	SNP-423732	SNP-551712	SNP-719040	SNP-833872	SNP-911281	SNP-997101	SNP-1121435	SNP-1249717	SNP-1326612	SNP-1412559	SNP-1497449	SNP-1631731	SNP-1773082	SNP-1839795	SNP-1986139	SNP-2100393	SNP-2192884	SNP-2319007	SNP-2424110	SNP-2520741	SNP-2609965	SNP-2691690	FR14-P22	SNP-2826073*	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Cambio de color	Olor	Fenotipo			
R24.1		A	A	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	-	67	NO	NO	NCL		
	R24.1.01	A	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	-	-	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	B	-	52	-	SI	SI	CL			
	R24.1.02	A	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	-	-	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	A	-	59	-	NO	NO	NCL			
	R24.1.03	A	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	-	-	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	B	-	61	-	NO	NO	NCL			
	R24.1.04	A	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	-	-	A	-	A	A	A	-	-	A	-	-	A	H	-	57	-	SI (-)	SI	CL			
	R24.1.05	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	62	-	NO	NO	NCL		
	R24.1.06	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	61	-	SI	SI	CL		
	R24.1.07	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	66	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.1.08	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	50	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.1.09	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	61	-	SI	SI	CL		
	R24.1.10	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	61	-	NO	NO	NCL		
	R24.1.11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	51	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.1.12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	62	-	NO	NO	NCL		
	R24.1.13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	63	-	NO	NO	NCL		
	R24.1.14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	68	-	NO	NO	NCL		
	R24.1.15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-							
R24.2		A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	-	68	-	SI (-)	-	-
	R24.2.02	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	66	-	SI (-)	?	?	
	R24.2.03	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	H	-	60	-	SI	SI	CL		
	R24.2.04	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	49	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.2.05	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	66	-	NO	NO	NCL		
	R24.2.06	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	67	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.2.07	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	56	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.2.08	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	60	-	SI (-)	?	?		
	R24.2.09	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	46	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.2.10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	49	-	SI (-)	SI	CL		
	R24.2.11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	-	68	-	NO	NO	NCL		
	R24.2.12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	47	-	SI (-)	?	CL		
	R24.2.13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	63	-	NO	NO	NCL		
	R24.2.14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	49	-	SI	SI	CL		
	R24.2.15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A								
R26		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	-	63	-	NO	NO	NCL	
	R26.01	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	64	-	NO	NO	NCL		
	R26.02	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-	60	-	NO	NO	NCL	
	R26.03	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	60	-	NO	NO	NCL		
	R26.04	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	60	-	NO	NO	NCL		
	R26.05	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	60	-	NO	?	?		
	R26.06	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	60	-	NO	NO	NCL		
	R26.07	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	60	-	NO	NO	NCL		
	R26.08	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	62	-	NO	?	?		
	R26.09	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	63	-	NO	NO	NCL		
	R26.10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	76	-	SI	?	?		
	R26.11	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	56	-	NO	NO	NCL		
	R26.12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-	63	-	NO	NO	NCL		
	R26.13	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	68	-	NO	NO	NCL		
	R26.14	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	-	70	-	NO	NO	NCL		
	R26.15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	-							

Tabla A.4.1.4: Genotipado y fenotipado de las líneas GF31, GF35, GF40 y PS, utilizadas como controles de la población PT-2014. Todos los marcadores son SSRs y han sido genotipados según se describe en el ap. 3.6.1. A: homocigoto para SC; B: homocigoto para PS; H: heterocigoto. DAP: días tras la polinización. El fenotipado del cambio de color distingue entre un viraje completo de verde oscuro a amarillo (SI), de verde oscuro a verde pálido (SI-) y ausencia de viraje (NO). El olor del fruto utiliza una escala similar. La variable “fenotipo” resume los caracteres anteriores y clasifica el fruto en CL: climatérico, NCL: no climatérico.

Parental	Progenie	GL III		GL VI		Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Cambio de color	Olor	Fenotipo
		A_16-C12	PS_18-D10	PSI_41-H06	CL_23-F08					
PS										
	PS.1	B	B	B	B	-	68	NO	NO	NCL
	PS.2	B	B	B	B	-	68	NO	NO	NCL
	PS.3	B	B	B	B	-	63	NO	NO	NCL
	PS.4	B	B	B	B	-	63	NO	NO	NCL
	PS.5	B	B	B	B	-	60	NO	NO	NCL
GF31										
	GF31.1	A	A	A	A	37	-	SI	SI	CL
	GF31.2	A	A	A	A	38	-	SI (-)	SI	CL
	GF31.3	A	A	A	A	35	-	SI	SI	CL
	GF31.4	A	A	A	A	36	-	SI (-)	SI	CL
	GF31.5	A	A	A	A	36	-	SI	SI	CL
GF35										
	GF35.1	A	A	B	B	61	-	SI	SI	CL
	GF35.2	A	A	B	B	42	-	SI	SI	CL
	GF35.3	A	A	B	B	41	-	SI	SI	CL
	GF35.5	A	A	B	B	48	-	NO	SI	CL
GF40										
	GF40.1	B	B	A	A	-	68	SI	SI	CL
	GF40.2	B	B	A	A	63	-	SI (-)	SI	CL
	GF40.3	B	B	A	A	65	-	SI (-)	SI	CL
	GF40.4	B	B	A	A	63	-	NO	SI	CL
	GF40.5	B	B	A	A	62	-	NO	SI	CL

Tabla A.4.1.5: Anotación de transposones entre los genes *MELO3C016538* y *MELO3C016540*. Versión 1.1 de la anotación transposones realizada con REPET (Flutre *et al.* 2011). Las posiciones de inicio y final hacen referencia al inicio del pseudocromosoma correspondiente al GL VI de la v3.5 del genoma de referencia (Garcia-Mas *et al.* 2012), de la que también ha sido obtenida la orientación de los elementos. Los elementos *MELO3C016538*, *MELO3C016539* y *MELO3C016540* son genes. N.D.: no disponible. a: superfamilias según Sanseverino *et al.* (2015).

Elemento	Superfamilia ^a	Posición inicio (bp)	Posición final (bp)	Orientación
<i>MELO3C016538</i>	N.D.	22.065.649	22.065.896	-
DNA_transposon	MULE	22.068.057	22.068.127	-
LTR_retrotransposon	gypsy	22.069.252	22.069.355	+
DNA_transposon	MULE	22.070.446	22.071.974	+
DNA_transposon	MULE	22.072.092	22.072.749	-
DNA_transposon	CACTA	22.072.774	22.073.374	+
DNA_transposon	CACTA	22.075.738	22.077.999	-
DNA_transposon	CACTA	22.078.168	22.078.298	+
LTR_retrotransposon	gypsy	22.093.213	22.093.321	-
LTR_retrotransposon	gypsy	22.093.489	22.093.638	+
LTR_retrotransposon	gypsy	22.093.892	22.094.227	-
<i>MELO3C016539</i>	N.D.	22.108.951	22.109.347	+
DNA_transposon	CACTA	22.112.641	22.113.753	+
DNA_transposon	CACTA	22.119.238	22.119.347	+
DNA_transposon	CACTA	22.119.358	22.120.849	-
DNA_transposon	MULE	22.123.760	22.123.862	+
DNA_transposon	PIF	22.124.040	22.124.169	-
DNA_transposon	MULE	22.130.863	22.130.965	-
<i>MELO3C016540</i>	N.D.	22.138.397	22.140.165	+

Tabla A.4.2.1: Localización y propiedades fisicoquímicas de las proteínas NAC en melón: tamaño, punto isoeléctrico y peso molecular. Cálculos realizados con Sequence Manipulation Suite. Los pseudocromosomas son los correspondientes a versión 3.5.1 del genoma de referencia. El pseudocromosoma 0 incluye todos aquellos “scaffolds” todavía no anclados a ninguna región del genoma.

Gen	Proteínas	Pseudocromosoma	Longitud (aa)	Punto isoeléctrico (pH)	Peso molecular (KDa)
MELO3C000922	MELO3C000922P1	0	127	9,09	14,64
MELO3C001959	MELO3C001959P1	12	248	4,62	28,35
MELO3C001996	MELO3C001996P1	12	332	8,88	37,43
MELO3C002573	MELO3C002573P1	12	367	8,21	40,60
MELO3C002628	MELO3C002628P1	12	312	8,02	34,93
MELO3C003390	MELO3C003390P1/P2	4	282/343	6,25/5,69	32,39/39,46
MELO3C004604	MELO3C004604P1	5	466	7,15	51,86
MELO3C004694	MELO3C004694P1	12	238	6,26	27,72
MELO3C005563	MELO3C005563P1	9	329	6,88	37,91
MELO3C005791	MELO3C005791P1	9	393	6,59	45,19
MELO3C006814	MELO3C006814P1	6	338	6,24	39,50
MELO3C007255	MELO3C007255P1	8	220	9,24	25,10
MELO3C007888	MELO3C007888P1	8	378	5,01	43,65
MELO3C008056	MELO3C008056P1	8	457	4,73	51,17
MELO3C008534	MELO3C008534P1	5	146	9,97	17,38
MELO3C008790	MELO3C008790P1	8	330	6,94	37,24
MELO3C009236	MELO3C009236P1	4	335	4,73	38,88
MELO3C009855	MELO3C009855P1	4	283	7,14	32,45
MELO3C009980	MELO3C009980P1	4	287	5,91	33,32
MELO3C010501	MELO3C010501P1	7	117	9,60	13,43
MELO3C010555	MELO3C010555P1	7	301	7,68	33,08
MELO3C010632	MELO3C010632P1	3	294	6,74	33,50
MELO3C010923	MELO3C010923P1/P2	3	394/310	5,32/4,39	43,91/34,66

Tabla A.4.2.1: Localización y propiedades fisicoquímicas de las proteínas NAC en melón: tamaño, punto isoeléctrico y peso molecular (continuación).

Gen	Proteínas	Pseudocromosoma	Longitud (aa)	Punto isoeléctrico (pH)	Peso molecular (KDa)
MELO3C011164	MELO3C011164P1	3	389	9,29	43,72
MELO3C012091	MELO3C012091P1	10	392	8,06	44,50
MELO3C012114	MELO3C012114P1	10	292	8,41	33,32
MELO3C012215	MELO3C012215P1	10	419	4,83	47,21
MELO3C012390	MELO3C012390P1/P2	10	452/561	4,05/4,40	49,67/62,27
MELO3C012391	MELO3C012391P1/P3	10	449/279	6,65/7,85	49,80/30,94
MELO3C012573	MELO3C012573P1	1	325	7,40	37,35
MELO3C012873	MELO3C012873P1	4	164	9,73	19,22
MELO3C013173	MELO3C013173P1	1	560	4,75	63,27
MELO3C013287	MELO3C013287P1	1	282	6,38	32,53
MELO3C013641	MELO3C013641P1/P2	11	271/272	6,29/6,68	31,24/31,15
MELO3C013971	MELO3C013971P1	6	295	6,56	34,76
MELO3C014141	MELO3C014141P1	6	466	6,31	54,64
MELO3C014505	MELO3C014505P1	5	204	9,57	24,15
MELO3C014509	MELO3C014509P1	5	172	8,31	19,71
MELO3C014922	MELO3C014922P1/P2	6	224/159	10,13/10,26	25,37/18,05
MELO3C015355	MELO3C015355P1	2	391	7,04	45,42
MELO3C015357	MELO3C015357P1	2	482	6,76	54,14
MELO3C015427	MELO3C015427P1	2	484	7,26	54,22
MELO3C016444	MELO3C016444P1	6	433	6,80	48,78
MELO3C016536	MELO3C016536P1	6	296	7,53	33,19
MELO3C016540	MELO3C016540P1	6	353	8,58	39,38
MELO3C016767	MELO3C016767P1	7	302	6,92	33,32
MELO3C017052	MELO3C017052P1	7	302	7,46	34,39
MELO3C017185	MELO3C017185P1	2	372	8,46	41,65
MELO3C017308	MELO3C017308P1	2	344	7,42	39,39
MELO3C017754	MELO3C017754P1	7	239	9,72	27,35
MELO3C018237	MELO3C018237P1	4	318	9,27	35,72
MELO3C018242	MELO3C018242P1/P2	4	256/319	9,49/8,66	28,37/35,55
MELO3C018675	MELO3C018675P1	1	201	4,69	23,14
MELO3C019332	MELO3C019332P1	11	297	9,73	33,21
MELO3C019401	MELO3C019401P1	6	179	10,40	20,24
MELO3C019620	MELO3C019620P1	11	162	10,27	19,02
MELO3C019663	MELO3C019663P1	11	314	7,25	35,99
MELO3C019665	MELO3C019665P1	11	324	8,89	37,38
MELO3C019666	MELO3C019666P1	11	323	6,67	37,24
MELO3C019845	MELO3C019845P1/P2	3	555/553	4,38/4,38	62,32/62,18
MELO3C019954	MELO3C019954P1	3	561	4,63	63,14
MELO3C021131	MELO3C019954P2	1	452	4,38	51,29
MELO3C021587	MELO3C021131P1	9	254	6,31	29,40
MELO3C022002	MELO3C021587P1	9	327	5,83	36,34
MELO3C022117	MELO3C022002P1	9	323	8,08	36,23
MELO3C022254	MELO3C022117P1	11	359	8,15	40,58
MELO3C022342	MELO3C022254P1	11	405	6,37	45,19
MELO3C022962	MELO3C022342P1	7	257	9,51	29,31
MELO3C023195	MELO3C022962P1	11	319	8,45	36,69
MELO3C023230	MELO3C023195P1	11	298	5,67	34,19
MELO3C024115	MELO3C023230P1	1	221	4,42	25,61
MELO3C024560	MELO3C024115P1	8	151	9,64	17,84
MELO3C024561	MELO3C024560P1	8	268	6,37	30,88
MELO3C024865	MELO3C024561P1	7	247	9,69	28,25
MELO3C025099	MELO3C024865P1/P2	9	597/655	5,07/4,70	65,85/73,82
MELO3C025584	MELO3C025584P2/P3	12	366/187	8,27/9,81	42,01/21,61
MELO3C025611	MELO3C025611P1	7	359	7,75	39,49
MELO3C026180	MELO3C026180P1	2	242	6,57	27,52
MELO3C026251	MELO3C026251P1	2	295	5,84	34,42
MELO3C026521	MELO3C026521P1/P2	3	338/339	6,87/6,87	38,03/38,16
MELO3C027409	MELO3C027409P1	0	314	6,01	36,70

Tabla A.4.3.1: Fenotipado de las familias M2 mutantes en la temporada 2014. W: homocigoto para el alelo no mutado, M: homocigoto para el alelo mutado, H: heterocigoto. DAP: días tras la polinización.

Familia	Individuo	Genotipo	Cambio de color	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Abscisión (0-4)	Infección
246 (E59K)	246.02	W	SI	42	-	4	
	246.10	W	zonal	-	51	1	SI
	246.15	W	zonal	48	-	4	
	246.20	W	zonal	48	-	4	
	246.21	W	zonal	47	-	4	
	246.05	M	SI (-)	50	-	4	
	246.14	M	SI (-)	56	-	4	
	246.17	M	SI (-)	52	-	4	
	246.03	H	zonal	49	-	4	
246.04	H	zonal	51	-	4		
432 (P129L)	432.06	W	SI	42	-	4	
	432.07	M	SI	45	-	4	
	432.08	M	SI	47	-	4	
	432.10	M	SI	44	-	4	
	432.01x05	H	SI	48	-	4	
	432.02	H	SI	42	-	4	
2923 (164F)	2923.03	W	SI	50	-	4	SI
	2923.04	W	SI	50	-	4	SI
	2923.10	W	SI	46	-	4	
	2923.13	W	SI	-	75	3	SI
	2923.17	W	SI	42	-	4	
	2923.02	M	zonal	48	-	4	
	2923.06	M	SI	42	-	4	
	2923.14	M	SI	40	-	4	
	2923.16	M	SI	45	-	4	
2923.19	M	SI	48	-	4	SI	
4933 (A248V)	4933.02	W	zonal	-	59	0	SI
	4933.17	W	SI	40	-	4	
	4933.01	M	zonal	-	60	1	SI
	4933.03a	M	zonal	-	61	1	SI
	4933.03b	M	zonal	-	60	1	SI
	4933.05	M	SI	-	51	3	SI
	4933.09	M	NO	-	73	2	
	4933.10	M	SI	-	53	1	SI
	4933.15	H	zonal	63	-	4	SI
3717 (S256F)	3717.01	W	zonal	-	56	1	SI
	3717.04	W	SI	39	-	4	
	3717.13	W	SI (-)	40	-	4	
	3717.17	W	zonal	-	60	1	SI
	3717.08a	M	zonal	-	57	1	SI
	3717.09a	M	SI	45	-	4	
	3717.09b	M	SI	54	-	4	
	3717.15	M	zonal	61	-	4	SI
3717.16	M	zonal	-	63	2	SI	
2503 (D263N)	2503.02	W	SI	-	49	3	
	2503.03	W	SI	42	-	4	
	2503.12	W	SI	-	50	1	SI
	2503.15x16	W	SI	43	-	4	
	2503.16	W	SI (-)	40	-	4	
	2503.09	M	SI	49	-	4	
	2503.01	H	zonal	-	49	2	
	2503.05	H	zonal	48	-	4	
4321 (L300F)	4321.08	W	SI	47	-	4	
	4321.09	W	SI	42	-	4	
	4321.10	W	SI	-	50	2	SI
	4321.11	W	zonal	-	53	3	SI
	4321.02	H	SI	42	-	4	
	4321.04	H	SI	47	-	4	
	4321.07	H	SI	47	-	4	
	4321.14	H	SI (-)	49	-	4	

Tabla A.4.3.1: Fenotipado de las familias M2 mutantes en la temporada 2014 (continuación).

Familia	Individuo	Genotipo	Cambio de color	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Abscisión (0-4)	Infección
502 (P342L)	502.01	W	SI	47	-	4	
	502.03	W	SI	42	-	4	
	502.07	W	SI (-)	41	-	4	
	502.02	M	zonal	56	-	4	
	502.04a	M	SI	-	63	1	SI
	502.04b	M	zonal	-	54	3	
	502.05	H	zonal	51	-	4	
503 (P342L)	503.01	W	zonal	-	50	0	SI
	503.02	W	zonal	57	-	4	
	503.03	H	SI	-	61	1	SI
Char. Mono	Char.2	W	NO	-	68	2	SI
	Char.X	W	SI	-	49	1	SI
	Char.Y	W	zonal	-	58	3	SI

Tabla A.4.3.2: Fenotipado de las familias M2 mutantes en la temporada 2015. W: homocigoto para el alelo no mutado, M: homocigoto para el alelo mutado. DAP: días tras la polinización.

Familia	Individuo	Genotipo	Cambio de color (DAP)	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Abscisión (0-4)	Infección
246 (E59K)	246.2.1	W	36	41	-	4	
	246.2.2	W	39	-	63	3	
	246.2.5	W	39	-	51	3	
	246.2.7	W	40	47	-	4	
	246.2.8	W	42	63	-	4	
	246.2.9	W	39	-	67	3	
	246.2.10	W	38	40	-	4	
	246.2.12	W	37	41	-	4	
	246.2.13	W	39	-	47	3	
	246.2.15	W	41	-	63	3	
	246.14.1	M	49	59	-	4	
	246.14.2	M	49	51	-	4	
	246.14.3	M	46	57	-	4	
	246.14.4	M	45	50	-	4	
	246.14.5	M	45	-	63	3	
	246.14.6	M	46	-	70	3	
	246.14.7	M	47	-	68	3	
	246.14.8	M	46	49	-	4	
	246.14.9	M	43	46	-	4	
	246.14.10	M	46	51	-	4	
432 (P129L)	432.6.1	W	39	64	-	4	
	432.6.2	W	36	39	-	4	
	432.6.3	W	39	-	67	3	
	432.6.6x7	W	37	45	-	4	
	432.6.7	W	37	40	-	4	
	432.6.8	W	37	40	-	4	
	432.6.9	W	37	54	-	4	
	432.7.1	M	44	66	-	4	
	432.7.2	M	44	-	65	3	SI
	432.7.3x1	M	43	54	-	4	
	432.7.4x5	M	44	51	-	4	
	432.7.5	M	41	56	-	4	
	432.7.7x9	M	40	58	-	4	
	432.7.11	M	42	49	-	4	
	432.7.14	M	45	49	-	4	
432.7.15	M	44	56	-	4		

Tabla A.4.3.2: Fenotipado de las familias M2 mutantes en la temporada 2015 (continuación).

Familia	Individuo	Genotipo	Cambio de color (DAP)	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Abscisión (0-4)	Infección
4933 (A248V)	4933.17.1	W	39	47	-	4	
	4933.17.2	W	39	57	-	4	
	4933.17.3	W	41	-	67	3	SI
	4933.17.4	W	39	-	65	3	SI
	4933.17.5	W	40	-	70	3	SI
	4933.17.6	W	40	-	67	3	SI
	4933.17.7	W	37	40	-	4	
	4933.17.8	W	39	44	-	4	
	4933.17.9	W	37	40	-	4	
	4933.17.10	W	36	39	-	4	
	4933.1.1	M	37	42	-	4	
	4933.1.2	M	36	-	57	3	SI
	4933.1.5	M	39	-	65	3	SI
	4933.1.6	M	40	-	63	3	SI
	4933.1.7	M	43	47	-	4	
	4933.1.8	M	43	-	71	3	SI
	4933.1.9	M	41	-	67	2	SI
	4933.1.12	M	39	-	67	3	SI
	3717 (S256F)	3717.13.1	W	37	-	49	3
3717.13.2		W	37	-	49	2	SI
3717.13.3		W	37	40	-	4	
3717.13.5		W	37	-	49	1	SI
3717.13.7		W	34	-	63	3	SI
3717.13.8		W	37	-	49	3	SI
3717.13.9		W	37	49	-	4	SI
3717.13.10		W	32	40	-	4	
3717.13.12		W	37	-	47	3	SI
3717.15.1		M	37	-	51	2	SI
3717.15.2		M	34	-	51	3	SI
3717.15.4		M	37	-	51	2	SI
3717.15.5		M	36	40	-	4	
3717.15.6		M	37	-	66	2	SI
3717.15.7		M	37	-	66	3	SI
3717.15.8		M	36	-	51	2	SI
3717.15.9		M	32	-	42	3	
3717.15.10	M	37	48	-	4	SI	
2503 (D263N)	2503.12.1	W	39	-	67	3	SI
	2503.12.2	W	35	-	76	3	
	2503.12.4	W	39	-	56	2	SI
	2503.12.5	W	37	-	58	2	SI
	2503.12.6	W	39	-	69	3	
	2503.12.7	W	39	-	70	3	
	2503.12.8	W	41	-	65	2	
	2503.12.9	W	41	-	49	3	SI
	2503.12.10	W	41	-	67	3	SI
	2503.12.11	W	39	-	68	3	SI
	2503.7.2	M	42	-	59	2	
	2503.7.3	M	40	-	66	2	
	2503.7.4	M	39	-	58	3	SI
	2503.7.6	M	39	-	42	2	SI
	2503.7.8	M	38	-	54	3	SI
	2503.7.9	M	42	66	-	4	
	2503.7.10	M	42	45	-	4	
2503.7.11	M	42	-	67	3	SI	
2503.7.12	M	39	-	58	3	SI	
2503.7.14	M	39	-	58	3	SI	

Tabla A.4.3.2: Fenotipado de las familias M2 mutantes en la temporada 2015 (continuación).

Familia	Individuo	Genotipo	Cambio de color (DAP)	Dehiscencia (DAP)	Cosecha (DAP)	Abscisión (0-4)	Infección
502 (P342L)	502.3.1	W	39	43	-	4	
	502.3.2	W	39	43	-	4	
	502.3.3	W	39	-	60	2	SI
	502.3.4	W	42	46	-	4	
	502.3.5	W	41	48	-	4	
	502.3.8	W	37	40	-	4	
	502.3.9	W	41	-	62	3	SI
	502.2.1	M	39	43	-	4	
	502.2.2	M	42	45	-	4	
	502.2.3	M	42	46	-	4	
	502.2.4	M	44	-	47	3	SI
	502.2.5	M	44	-	61	3	SI
	502.2.6	M	44	54	-	4	
	502.2.7	M	43	47	-	4	
	502.2.8	M	40	49	-	4	
	502.2.9	M	37	-	58	3	
	502.2.10	M	37	40	-	4	
	502.4.1	M	42	48	-	4	
	502.4.2	M	42	-	54	2	SI
	502.4.3	M	39	-	61	3	SI
502.4.4	M	43	-	47	2	SI	
502.4.5	M	39	-	56	2	SI	
502.4.8	M	42	46	-	4		
502.4.9	M	39	-	51	2	SI	
502.4.10	M	42	-	54	2	SI	
Char. Mono	Mono.1.1	W	39	-	65	3	
	Mono.1.2	W	39	-	67	3	
	Mono.1.3	W	39	42	-	4	
	Mono.1.4	W	37	38	-	4	
	Mono.1.5	W	37	-	45	3	
	Mono.1.6	W	37	62	-	4	
	Mono.1.7	W	37	52	-	4	
	Mono.1.8	W	39	-	56	3	
	Mono.1.9	W	34	38	-	4	
	Mono.1.10	W	34	42	-	4	
	Mono.2.2	W	42	49	-	4	
	Mono.2.3	W	41	-	63	3	SI
	Mono.2.4	W	39	43	-	4	
	Mono.2.6	W	41	45	-	4	
	Mono.2.7	W	39	40	-	4	
	Mono.2.8	W	39	49	-	4	
	Mono.2.9	W	39	43	-	4	
	Mono.2.10	W	42	52	-	4	

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. A: Relación de genes DE entre PS|UNRIPE y PS|RIPE (contraste 1). **B:** Relación de genes DE entre SC3-5-1|UNRIPE y SC3-5-1|RIPE (contraste 2). **C:** Relación de genes DE entre SC3-5-1|RIPE y PS|RIPE (contraste 3); **D:** Relación de genes DE entre SC3-5-1|UNRIPE y PS|UNRIPE (contraste 4) y **E:** Relación de genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración.

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (A). Relación de genes DE entre PS|UNRIPE y PS|RIPE (contraste 1).

Gen	log2(FoldChange)	pvalor	p-valor ajustado	Anotación
MELO3C002457	4,95	5,2E-09	5,2E-12	Similar to Peroxidase 42 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q95B81 PER42_ARATH)
MELO3C0016232	4,10	3,3E-11	2,3E-08	Similar to Root phototropism protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q682S0 RPT2_ARATH)
MELO3C0017480	4,39	8,2E-10	4,4E-07	Similar to Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38857 XTH22_ARATH)
MELO3C0015995	2,63	1,1E-09	4,6E-07	Similar to Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2 (Vigna radiata var. radiata) (uniprot_sprotsp P32292 ARG2_VIGRR)
MELO3C006476	5,57	4,0E-08	1,4E-05	Similar to Auxin-responsive protein 1A14 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38832 IAA14_ARATH)
MELO3C0007507	3,40	5,3E-08	1,7E-05	Similar to Auxin-evolving enhancer protein 1, chloroplast (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp Q40459 PSBO_TOBAC)
MELO3C007786	5,02	7,9E-08	1,9E-05	None
MELO3C023606	2,01	1,3E-07	2,8E-05	Similar to S-selenosynthetionin synthase 1 (Elaeagnus umbellata) (uniprot_sprotsp Q2AT56 METK1_ELAUM)
MELO3C010774	3,62	1,9E-07	3,7E-05	Similar to Zinc finger CCHC domain-containing protein 49 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q2M0G2 C3H49_ARATH)
MELO3C0025164	2,25	2,1E-07	3,7E-05	Similar to Probable aquaporin PIP1-5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LAA6 PIP15_ARATH)
MELO3C026342	5,31	2,4E-07	3,8E-05	Similar to Calmodulin (Capsicum annuum) (uniprot_sprotsp P93087 CALM_CAPAN)
MELO3C0071100	3,07	2,6E-07	3,9E-05	Similar to Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q29SUG AL2B4_ARATH)
MELO3C011008	3,22	5,0E-07	7,1E-05	Similar to Snakin-2 (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotsp Q93X17 SNAK2_SOLTU)
MELO3C023802	2,23	9,2E-07	1,1E-04	Similar to LOB domain-containing protein 41 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q2M886 LBD44_ARATH)
MELO3C011392	3,35	1,1E-06	1,2E-04	Similar to Subtilisin-like protease (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O65351 SUBL_ARATH)
MELO3C009215	1,77	3,3E-06	3,4E-04	Similar to Putative uncharacterized protein (Glycine max) (uniref90:UniRef90_C6SZP4)
MELO3C003817	2,17	4,3E-06	4,2E-04	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B91H4C6)
MELO3C026532	1,87	5,3E-06	4,7E-04	Similar to Catalase, isozyme 3 (Cucurbita pepo) (uniprot_sprotsp P48352 CATA3_CUCPE)
MELO3C012701	2,05	6,0E-06	5,1E-04	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniref90:UniRef90_P94012)
MELO3C018579	2,13	6,3E-06	5,1E-04	Similar to Phloem filament protein (Cucumis melo subsp. melo) (uniref90:UniRef90_E5GGR5)
MELO3C011317	3,23	9,3E-06	7,0E-04	Similar to Zinc finger protein CONSTANTS-LIKE 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q2940T9 COL4_ARATH)
MELO3C021201	2,09	9,6E-06	7,0E-04	Similar to Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplasmic (Spinacia oleracea) (uniprot_sprotsp P32260 CYSKP_SPOI)
MELO3C002874	1,95	1,5E-05	9,3E-04	Similar to Proton PHLOEM PROTEIN 2-LIKE A1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O81865 P2A01_ARATH)
MELO3C024578	2,33	1,6E-05	9,3E-04	Similar to S-selenosynthetionin synthase 2 (Elaeagnus umbellata) (uniprot_sprotsp Q2AT55 METK2_ELAUM)
MELO3C010668	3,83	1,6E-05	9,7E-04	Similar to Polygalacturonase At1g48100 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q949Z1 PGLR4_ARATH)
MELO3C006821	3,13	2,7E-05	1,4E-03	Similar to 21 kDa protein (Daucus carota PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P17407 21KD_DAUCA)
MELO3C019981	2,16	2,8E-05	1,5E-03	Similar to Poly(A)-binding protein C-terminal interacting protein 6 (Cucumis sativus) (uniref90:UniRef90_Q6ELF9)
MELO3C006558	1,79	3,4E-05	1,7E-03	Similar to Stem-specific protein 1S1T1 (Nicotiana glauca) (uniprot_sprotsp P24805 1S1T1_TOBAC)
MELO3C009886	2,65	4,0E-05	1,9E-03	Similar to 2-aminoethanol dioxygenase (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q6PDY2 AEDO_MOUSE)
MELO3C021306	1,76	4,1E-05	1,9E-03	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42736 RAP23_ARATH)
MELO3C011276	2,45	4,2E-05	1,9E-03	Similar to 40S ribosomal protein S11-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42733 RS113_ARATH)
MELO3C002572	1,95	4,8E-05	2,1E-03	Similar to Aquaporin PIP2-7 (Zea mays) (uniprot_sprotsp Q9ATM4 PIP27_MAIZE)
MELO3C010272	2,51	5,1E-05	2,2E-03	Similar to Undenaturated RNA-binding protein C23E6.01c (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotsp O60176 YG41_SCHPO)
MELO3C021906	1,45	6,9E-05	2,7E-03	Similar to Undenaturated RNA-binding protein C23E6.01c (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotsp O60176 YG41_SCHPO)
MELO3C008879	1,65	7,2E-05	2,7E-03	Similar to Triosephosphate isomerase, cytosolic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P44849 TPIS_ARATH)
MELO3C012358	1,85	7,3E-05	2,7E-03	Similar to Putative copper chaperone (Citrus hybrid cultivar) (uniref90:UniRef90_A1ECK4)
MELO3C015833	2,38	9,2E-05	3,3E-03	Similar to Cydin-P3-1 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q75H10 CCP31_ORYS)
MELO3C003230	3,46	1,0E-04	3,6E-03	Similar to Auxin-induced protein 5NG4 (Pinus taeda PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp Q91F86 DCR_ARATH)
MELO3C010526	3,17	1,4E-04	4,8E-03	Similar to Aquaporin TIPP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q91G12 TIPP2_ARATH)
MELO3C016963	1,18	1,4E-04	4,8E-03	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 5A (Manihot esculenta PE=2 SV=2) (uniprot_sprotsp Q9AX14 IF5A_MANES)
MELO3C023842	2,10	1,4E-04	4,8E-03	Similar to Auxin-induced protein 5NG4 (Pinus taeda PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp Q91G12 TIPP2_ARATH)
MELO3C003487	2,54	1,6E-04	5,1E-03	Similar to Receptor-like protein kinase HAIK12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q91JM4 IKU2_ARATH)
MELO3C022613	1,81	1,6E-04	5,1E-03	Similar to Delta(24)-sterol reductase (Pisum sativum) (uniprot_sprotsp P93472 DIML_PEA)
MELO3C025336	2,15	2,0E-04	6,1E-03	None
MELO3C007200	2,92	2,5E-04	6,9E-03	Similar to Ras-related protein RABA1c (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9PK68 RAA1C_ARATH)
MELO3C012702	2,75	2,5E-04	6,9E-03	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniref90:UniRef90_P94012)
MELO3C018765	1,69	2,8E-04	6,9E-03	Similar to Putative uncharacterized protein (Ricinus communis) (uniref90:UniRef90_B9RW76)
MELO3C017305	2,97	2,8E-04	7,5E-03	Similar to LOB domain-containing protein 41 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q2M886 LBD44_ARATH)
MELO3C004434	2,43	3,0E-04	8,0E-03	Similar to Putative uncharacterized protein (Medicago truncatula) (uniref90:UniRef90_B71G55)
MELO3C021406	2,39	3,1E-04	8,2E-03	Similar to Basic-75 globulin (Glycine max) (uniprot_sprotsp P13917 75B1_SOYBN)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (A, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C0202961	1,91	3,2E-04	8,2E-03	Similar to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P93836 HPPD_ARATH)
MELO3C0009145	1,92	3,3E-04	8,4E-03	Similar to Pyruvate decarboxylase isozyme 2 (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotssp P51846 PDC2_TOBAC)
MELO3C0012333	3,05	3,5E-04	8,8E-03	Similar to PREDC1/2: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_U10100015C9152)
MELO3C0014883	1,33	3,8E-04	9,2E-03	Similar to B2 protein (Daucus carota PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P37707 B2_DAUCA)
MELO3C0022218	1,91	4,0E-04	9,3E-03	Similar to MYBR domain class transcription factor (Malus x domestica) (uniref90:UniRef90_D9ZJ86)
MELO3C0012277	2,02	5,9E-04	1,3E-02	Similar to AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor RAV2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P82280 RAV2_ARATH)
MELO3C0005685	1,53	7,4E-04	1,5E-02	Similar to Aquaporin PIP1-2 (Zea mays) (uniprot_sprotssp Q9X159 PIP12_MAIZE)
MELO3C0007784	2,38	7,9E-04	1,6E-02	None
MELO3C0013710	2,26	9,8E-04	1,9E-02	Similar to Auxin:hydrogen symporter, putative (Ricinus communis) (uniref90:UniRef90_B9S6X0)
MELO3C0003575	1,46	1,1E-03	2,1E-02	Similar to Cytochrome-c1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q43125 CRY1_ARATH)
MELO3C0016562	3,60	1,1E-03	2,2E-02	Similar to Putative undehydrated protein (Glycine max) (uniref90:UniRef90_G6T050)
MELO3C0021766	1,86	1,1E-03	2,2E-02	Similar to Phloem filament protein (Cuarbita maxima) (uniref90:UniRef90_P94012)
MELO3C0011173	2,16	1,2E-03	2,3E-02	Similar to Cation transport regulator-like protein 2 (Battus norvegicus) (uniprot_sprotssp Q641Z5 CHAC2_RAT)
MELO3C0023389	1,86	1,2E-03	2,3E-02	Similar to Probable histone H2A variant 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9C944 H2AV3_ARATH)
MELO3C0023346	2,53	1,5E-03	2,7E-02	Similar to Cysteine proteinase RD19a (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P46296 RD19A_ARATH)
MELO3C0014441	2,23	1,6E-03	2,7E-02	Similar to Probable histone H2A variant 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O80339 ERF82_ARATH)
MELO3C0003562	1,63	1,7E-03	2,9E-02	Similar to 14-3-3-like protein (Pisum sativum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P46266 1433_PEA)
MELO3C0003106	2,21	1,7E-03	2,9E-02	Similar to Squalene synthase (Nicotiana benthamiana PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P53800 PDFT_NICBE)
MELO3C0003649	3,00	1,8E-03	3,0E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O80339 ERF82_ARATH)
MELO3C022452	3,04	2,1E-03	3,3E-02	Similar to Putative fructokinase-4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9MI19 SCRK4_ARATH)
MELO3C0025232	1,06	2,1E-03	3,3E-02	Similar to Arabidopsis thaliana (uniprot_sprotssp Q94147 UBC28_ARATH)
MELO3C0009339	1,93	2,1E-03	3,3E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B91FEN1)
MELO3C0013941	1,96	2,3E-03	3,5E-02	Similar to Glucosyltransferase, putative (Ricinus communis) (uniref90:UniRef90_B9S5F3)
MELO3C0007116	2,44	2,4E-03	3,7E-02	Similar to Endoplasmic oxidoreductin-1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9C757 ERO1_ARATH)
MELO3C0202014	1,73	2,5E-03	3,7E-02	Similar to Transcription elongation factor A protein 3 (Bos taurus) (uniprot_sprotssp Q2K109 TCEA3_BOVIN)
MELO3C0011873	1,95	2,6E-03	3,8E-02	Similar to 60S ribosomal protein L17-2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P51413 RL172_ARATH)
MELO3C021455	1,12	2,8E-03	4,1E-02	Similar to Putative undehydrated protein (Glycine max) (uniref90:UniRef90_G6TDH1)
MELO3C0012725	1,70	2,9E-03	4,2E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B9GNH0)
MELO3C0010874	1,82	3,2E-03	4,5E-02	None
MELO3C0206612	1,30	3,3E-03	4,6E-02	Similar to Eukaryotic translation initiation factor-4E type 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FK59 IF4E3_ARATH)
MELO3C0007272	2,87	3,4E-03	4,7E-02	Similar to Glyoxysomal processing protease, glyoxysomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8VZD4 DEG15_ARATH)
MELO3C0206550	1,30	3,5E-03	4,7E-02	Similar to Dihydrin COR47 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P31168 COR47_ARATH)
MELO3C0205798	-3,46	2,3E-12	4,9E-09	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Psecta americana) (uniprot_sprotssp P24465 C71A1_PERAIE)
MELO3C0010739	-1,98	8,2E-08	1,9E-05	Similar to Aq1-1q1-cancer-protein) desaturase, chloroplastic (Cucumis sativus PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P43298 TMKL_ARATH)
MELO3C0005267	-2,43	5,6E-07	7,5E-05	Similar to Probable receptor protein kinase TMK1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P49042 VPE_RICCCO)
MELO3C0005564	-2,13	1,3E-06	1,4E-04	Similar to Vacuolar-processing enzyme (Ricinus communis PE=1 SV=1) (uniprot_sprotssp P32061 STAD_CUCSA)
MELO3C0010833	-2,10	1,5E-06	1,5E-04	Similar to Transcription factor MYB44 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FDW1 MYB44_ARATH)
MELO3C0204190	-1,93	6,6E-06	5,2E-04	Similar to Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8S4Y1 THIC1_ARATH)
MELO3C0009930	-2,98	1,1E-05	7,8E-04	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_66.assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_D71TW77)
MELO3C0003441	-4,36	1,3E-05	8,6E-04	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q38908 XTH30_ARATH)
MELO3C0204326	-2,76	1,3E-05	8,7E-04	Similar to Aq1 carrier protein (Ricinus communis) (uniref90:UniRef90_B9RR02)
MELO3C0069535	-1,85	2,4E-05	1,3E-03	Similar to Heat shock protein 83 (Ipomoea nil) (uniprot_sprotssp P51819 HSP83_IPONI)
MELO3C0018031	-2,43	2,3E-05	1,3E-03	Similar to Putative undehydrated protein (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_A5AE90)
MELO3C0014897	-1,93	2,7E-05	1,4E-03	Similar to Putative alcohol dehydrogenase (Cucumis melo) (uniref90:UniRef90_Q2PZA4)
MELO3C0000985	-2,17	3,0E-05	1,5E-03	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C0006334	-1,86	6,3E-05	2,7E-03	Similar to 3-ketoadip-CoA thiolase 2, peroxisomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q56WV9 THIK2_ARATH)
MELO3C0002943	-4,26	6,8E-05	2,7E-03	Similar to Purpel synthase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8RW10 LUP2_ARATH)
MELO3C0006931	-1,78	7,0E-05	2,7E-03	Similar to Putative undehydrated protein (Medicago truncatula) (uniref90:UniRef90_B7EJG9)
MELO3C0012324	-1,76	6,6E-05	2,7E-03	Similar to AT5g16010/FIN13_150 (Arabidopsis) (uniref90:UniRef90_Q9JLFS3)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (A, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-valor	p-valor ajustado	Anotación
MELO3C003331	-2,55	8,7E-05	3,2E-03	Similar to Bax inhibitor 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LD45 BI1_ARATH)
MELO3C000200	-1,93	1,4E-04	4,7E-03	Similar to Heat shock protein 101 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P42730 HSI101_ARATH)
MELO3C000640	-3,25	1,9E-04	6,1E-03	Similar to Long-chain-alcohol oxidase FAO1 (Lotus japonicus) (uniprot_sprotssp B5WVZ8 FAO1_LOTJA)
MELO3C001528	-1,83	2,0E-04	6,1E-03	Similar to 6-phosphofruktokinase 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9C5J7 K6PW7_ARATH)
MELO3C002034	-1,83	2,1E-04	6,2E-03	Similar to Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (Pisum sativum) (uniprot_sprotssp Q02028 HSP75_PEA)
MELO3C002183	-1,87	2,1E-04	6,2E-03	Similar to Heavy metal-associated domain containing protein, expressed (Oryza sativa) (uniprot_sprotssp Q8LN44)
MELO3C001530	-3,42	2,2E-04	6,3E-03	Similar to Polygalacturonase (Pisum persica PE-2 SV=1) (uniprot_sprotssp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C002471	-2,51	2,2E-04	6,5E-03	Similar to Omega-hydroxyplumate O-feruloyl transferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q94CD1 HHTL_ARATH)
MELO3C0021648	-1,24	2,3E-04	6,6E-03	Similar to Heat shock cognate 70 kDa protein (Petunia hybrid) (uniprot_sprotssp P09189 HSP7C_PETHY)
MELO3C0013945	-2,28	2,8E-04	7,5E-04	Similar to Small heat shock protein, chloroplastic (Chenopodium rubrum) (uniprot_sprotssp P11890 HS23C_CHERU)
MELO3C0026252	-2,60	3,5E-04	8,7E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniprot_sprotssp B013D9)
MELO3C0016167	-1,56	3,6E-04	8,8E-03	Similar to Probable glutathione S-transferase parC (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotssp P49332 GSTXC_TOBAC)
MELO3C0025524	-2,85	3,6E-04	8,8E-03	Similar to ABC transporter 1 family member 20 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LZ98 AB201_ARATH)
MELO3C0007261	-2,08	3,9E-04	9,2E-03	Similar to Dnaj homolog subfamily B member 13 (Mus musculus) (uniprot_sprotssp Q80Y75 DNB13_MOUSE)
MELO3C0013837	-2,61	4,1E-04	9,3E-03	Similar to Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q23617 TPS5_ARATH)
MELO3C0021231	-2,55	4,0E-04	9,3E-03	Similar to CBL-antennazing serine/threonine-protein kinase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8RWC9 CIPK1_ARATH)
MELO3C0010188	-1,74	4,2E-04	9,6E-03	Similar to Dihydroflavonol-4-reductase (Vitis vinifera) (uniprot_sprotssp P51110 DFR4_VITVI)
MELO3C0008214	-2,27	4,4E-04	1,0E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous communis) (uniprot_sprotssp B9RBM9)
MELO3C0014315	-1,48	5,4E-04	1,2E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_179, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotssp Q3XEE6 C3H29_ARATH)
MELO3C0026788	-1,74	5,4E-04	1,2E-02	Similar to Zinc finger CCHC domain-containing protein 29 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9XEE6 C3H29_ARATH)
MELO3C0012052	-1,36	6,6E-04	1,4E-02	Similar to Dnaj homolog subfamily B member 4 (Mus musculus) (uniprot_sprotssp Q9D832 DNJB4_MOUSE)
MELO3C0005703	-2,25	7,4E-04	1,5E-02	None
MELO3C0010183	-1,94	7,4E-04	1,5E-02	None
MELO3C0007177	-1,41	7,8E-04	1,6E-02	Similar to Transcription factor GTE12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LS28 GTE12_ARATH)
MELO3C0016842	-2,83	8,8E-04	1,8E-02	Similar to Probable xyloglucan glycosyltransferase 12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ZQB9 CSLCC_ARATH)
MELO3C0009389	-1,89	9,2E-04	1,9E-02	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pisum sativum) (uniprot_sprotssp Q9ZQ99 COGT1_ARATH)
MELO3C0011868	-1,73	1,3E-03	2,4E-02	Similar to REF/SRRP-like protein At1g67360 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FYF7 Y1736_ARATH)
MELO3C0007723	-1,96	1,3E-03	2,4E-02	Similar to Probable mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Dioscorea discolor) (uniprot_sprotssp Q54PY7 M2OM_DICDI)
MELO3C0018819	-1,92	1,3E-03	2,4E-02	Similar to Probable beta-1,3-galactosyltransferase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp A8MKC7 B3GT2_ARATH)
MELO3C0021992	-3,29	1,3E-03	2,5E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniprot_sprotssp UPI0001984C33)
MELO3C0022356	-1,48	1,4E-03	2,5E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous communis) (uniprot_sprotssp B9R176)
MELO3C0010662	-1,66	1,4E-03	2,5E-02	Similar to Probable polygalacturonase non-catalytic subunit Jp650 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P92990 Jp650_ARATH)
MELO3C0005445	-2,00	1,6E-03	2,8E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous communis) (uniprot_sprotssp B9RA10)
MELO3C0000113	-3,10	1,7E-03	2,9E-02	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pisum sativum) (uniprot_sprotssp P24465 C71A1_PERA1)
MELO3C0015496	-2,21	1,7E-03	2,9E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous communis) (uniprot_sprotssp B9RK52)
MELO3C0024716	-2,67	1,8E-03	2,9E-02	Similar to Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 (Homo sapiens) (uniprot_sprotssp P52948 NUP98_HUMAN)
MELO3C0013218	-1,53	1,8E-03	2,9E-02	Similar to Carban oyl-phosphate synthase large chain (Nostoc sp. strain PCC 7120 / UTEX 2576) (uniprot_sprotssp Q8YQ12 CARB_NOSS1)
MELO3C0025925	-2,02	1,9E-03	3,1E-02	Similar to Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBA131 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q94B55 XB31_ARATH)
MELO3C0021107	-1,66	1,9E-03	3,1E-02	Similar to 70 kDa peptidyl-prolyl isomerase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q38931 FKBF70_ARATH)
MELO3C0022176	-2,23	1,9E-03	3,5E-02	Similar to Non-lysosomal glucosylceramidase (Mus musculus) (uniprot_sprotssp Q69ZF3 GBA2_MOUSE)
MELO3C0010349	-1,69	2,3E-03	3,5E-02	Similar to Probable carboxyltransferase 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SX25 CXE6_ARATH)
MELO3C0010479	-1,86	2,5E-03	3,7E-02	Similar to Long chain acyl-CoA synthetase 9, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9C1P8 LACS9_ARATH)
MELO3C0013250	-1,66	2,6E-03	3,8E-02	Similar to Proton-coupled amino acid transporter 1 (Homo sapiens) (uniprot_sprotssp Q7Z2148 S36A1_HUMAN)
MELO3C0023716	-1,40	2,9E-03	4,2E-02	Similar to Eukaryotic translation initiation factor-5B (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotssp Q10251 IF2P_SCHPO)
MELO3C0005616	-3,25	3,0E-03	4,2E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous communis) (uniprot_sprotssp B9RZ6)
MELO3C0018382	-2,07	3,1E-03	4,3E-02	Similar to Probable phosphoribosylformylglycinamide synthase, chloroplastic/mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9M8D3 PUR4_ARATH)
MELO3C0009355	-1,21	3,2E-03	4,5E-02	Similar to Putative farnesylated protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp B9R112)
MELO3C0020610	-2,31	3,3E-03	4,6E-02	Similar to Protein TOC75.3, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9S1E8 TIC753_ARATH)
MELO3C0013838	-2,12	3,4E-03	4,7E-02	Similar to Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q23617 TPS5_ARATH)
MELO3C0006936	-2,27	3,5E-03	4,7E-02	Similar to Glutaminyl-peptide cyclotransferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q84WV9 QPCT_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (B). Relación de genes DE entre SC3-5-1 | UNRIPE y SC3-5-1 | RIPE (contraste 2).

Gen	log2(FoldChange)	p-valor	p-valor ajustado	Anotación
MELO3C022978	4,11	4,6E-08	2,2E-11	Similar to 1-am inocydopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8HSH4 ACCH3_ARATH)
MELO3C021688	2,18	8,5E-08	4,4E-05	None
MELO3C007779	4,91	1,6E-07	5,8E-05	Similar to Metal ion binding protein, putative (Rikenus communis) (unire90 UniRef90_B9SSI.2)
MELO3C008010	3,37	6,2E-06	1,7E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90 UniRef90_B9H120)
MELO3C023842	4,00	9,8E-06	2,1E-03	Similar to Auxin-induced protein 5NG4 (Pinus taeda PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q61163 5NG4_PINTA)
MELO3C007736	3,02	2,5E-05	4,8E-03	Similar to Homobox-leucine zipper protein ATHB-6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P46668 ATHB6_ARATH)
MELO3C014482	3,16	3,3E-05	5,9E-03	Similar to Lipoxygenase 5, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LUM0 LOX5_ARATH)
MELO3C011117	4,39	4,2E-05	5,9E-03	Similar to Receptor-like protein kinase HSL1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SGP2 HSL1_ARATH)
MELO3C0204317	4,26	4,6E-05	6,1E-03	Similar to GDSL esterase/lipase 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SSA7 GLIP5_ARATH)
MELO3C018765	2,13	1,4E-04	1,4E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rikenus communis) (unire90 UniRef90_B9RW76)
MELO3C021404	3,36	1,5E-04	1,4E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (unire90 UniRef90_D7L485)
MELO3C025758	2,94	1,7E-04	1,5E-02	Similar to Auxin response factor 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9TXJ9 ARF4_ARATH)
MELO3C017100	2,97	1,8E-04	1,5E-02	Similar to Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SU63 AL2B4_ARATH)
MELO3C005526	3,97	3,5E-04	2,4E-02	Similar to Aquaporin TIP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9HGL2 TIP23_ARATH)
MELO3C011233	3,90	4,6E-04	3,0E-02	Similar to PRE-DICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire90 UniRef90_LUP100015C9152)
MELO3C016601	2,90	4,6E-04	3,0E-02	Similar to Organic cation transporter protein (Drosophila melanogaster) (uniprot_sprotssp Q9VCA2 ORCT1_DROME)
MELO3C003491	3,24	5,2E-04	3,0E-02	Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] (Cucumis sativus) (uniprot_sprotssp P42066 PCKA_CUCSA)
MELO3C005540	3,56	7,3E-04	4,0E-02	Similar to 14 kDa proline-rich protein DC2.15 (Daucus carota PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P14009 14KCD_DAUCA)
MELO3C004610	2,88	1,0E-03	4,7E-02	Similar to Zinc finger CCCH domain-containing protein 20 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O82199 C3H20_ARATH)
MELO3C007786	2,26	1,1E-03	4,7E-02	None
MELO3C011738	2,70	1,0E-03	4,7E-02	Similar to Zinc finger CCCH domain-containing protein 53 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q0D319 C3H53_ORYSJ)
MELO3C013408	2,04	1,2E-03	5,0E-02	Similar to Transcription factor RFP2a (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q69114 RFP2a_ORYSJ)
MELO3C005681	1,99	1,2E-03	5,0E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rikenus communis) (unire90 UniRef90_B9RCCT7)
MELO3C002372	2,44	3,6E-08	2,6E-05	Similar to Metal ion binding protein, putative (Rikenus communis) (unire90 UniRef90_B9RA05)
MELO3C003107	3,54	3,6E-08	2,6E-05	Similar to Soluble inorganic pyrophosphatase (Zea mays) (uniprot_sprotssp Q48556 IPYR_MAIZE)
MELO3C000613	2,90	1,0E-07	4,4E-05	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pennisetum americanum) (uniprot_sprotssp P24465 C71A1_PERAEE)
MELO3C014470	1,93	4,2E-07	1,3E-04	Similar to Beta-galactosidase (Malus domestica PE=1 SV=1) (uniprot_sprotssp P48981 BGAL_MALDO)
MELO3C015437	2,30	7,3E-06	1,7E-03	Similar to 1-am inocydopropane-1-carboxylate oxidase 1 (Cucumis melo) (uniprot_sprotssp Q04644 ACCO1_CUCME)
MELO3C010781	1,81	3,9E-05	5,9E-03	Similar to Squalene monooxygenase (Panax ginseng PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp O48651 ERG1_PANGI)
MELO3C013774	1,90	3,8E-05	5,9E-03	Similar to Methionine gamma-lyase (Pseudomonas putida) (uniprot_sprotssp P13254 MEG1_PSEPU)
MELO3C013347	1,58	5,5E-05	6,8E-03	Similar to Aquaporin PIP2-7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P93004 PIP27_ARATH)
MELO3C022162	2,39	6,2E-05	7,3E-03	Similar to Mannan endo-1,4-beta-mannosidase 5 (Solanum lycopersicum) (uniprot_sprotssp Q6YM50 MAN5_SOLLIC)
MELO3C016536	-1,71	1,1E-04	1,2E-02	Similar to NAC domain-containing protein 72 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q93YY3 NAC72_ARATH)
MELO3C002175	2,36	1,4E-04	1,4E-02	Similar to Mimalin (Richardella dulcifica PE=1 SV=3) (uniprot_sprotssp P13087 MIRA_RICDUL)
MELO3C021176	-1,31	1,5E-04	1,4E-02	Similar to Fatty acid desaturase 3 (Bos taurus) (uniprot_sprotssp A41FP3 FADS3_BOVIN)
MELO3C000985	-1,42	1,9E-04	1,5E-02	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C003379	2,59	3,6E-04	2,4E-02	Similar to Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q42581 KPRSI_ARATH)
MELO3C018475	-1,66	3,2E-04	2,4E-02	Similar to Bidirectional sugar transporter SWEE13b (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q5N4Z9 SWT3B_ORYSJ)
MELO3C018492	2,18	3,4E-04	2,4E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_180assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (unire90 UniRef90_D7UC14)
MELO3C023435	-2,25	4,8E-04	3,0E-02	Similar to Cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 (Oenothera basilicum) (uniprot_sprotssp Q2KNI5 CADH1_OCIBA)
MELO3C022694	-2,13	4,9E-04	3,0E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LUM4 RAP22_ARATH)
MELO3C015310	-1,32	5,0E-04	3,4E-02	Similar to Protein KIAA0664 homolog (Drosophila willistonii) (uniprot_sprotssp B4MYG3 K0664_DROW1)
MELO3C017940	-2,24	6,0E-04	3,4E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P42736 RAP23_ARATH)
MELO3C023435	-2,13	4,9E-04	3,0E-02	Similar to Beta-amylase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LIR6 BAMI_ARATH)
MELO3C023067	-2,20	8,4E-04	4,4E-02	Similar to Agmatine coamyltransferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FN9P AGCT_ARATH)
MELO3C010162	-2,33	9,4E-04	4,7E-02	Similar to L-allo-threonine aldolase (Aeromonas jandaei) (uniprot_sprotssp O07051 LITAA_AERJA)
MELO3C018031	-1,68	9,4E-04	4,7E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Vitis vinifera) (unire90 UniRef90_A5AE90)
MELO3C006254	-1,20	9,8E-04	4,7E-02	Similar to Protein WAX2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8H1Z0 WAX2_ARATH)
MELO3C018490	-2,21	1,0E-03	4,7E-02	Similar to Limonoid UDP-glucosyltransferase (Citrus ushishii PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q9MB73 LGT_CITUN)
MELO3C023893	-2,08	1,2E-03	5,0E-02	Similar to Serine/threonine-protein phosphatase PPI isozyme e4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P48484 PPI4_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (C). Relación de genes DE entre SC3-5-1 | RIPE y PS | RIPE (contraste 3).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C026512	4,02	1,3E-29	8,4E-26	Similar to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 (Hevea brasiliensis) (uniprot_sprotssp P290571 HMDH1_HEVBR)
MELO3C0104437	10,53	1,8E-28	5,5E-25	Similar to 1-aminopropyl-L-orthoxylate oxidase 1 (Citrus mado) (uniprot_sprotssp Q04644 ACCO1_CUCME)
MELO3C0105470	8,12	2,6E-26	5,3E-23	Similar to Beta-galactosidase (Malus domestica PE=1 SV=1) (uniprot_sprotssp P48981 BGAL_MALDO)
MELO3C0103347	4,69	4,5E-26	7,0E-23	Similar to Aquaporin PIP2-7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P93004 PIP27_ARATH)
MELO3C009145	5,35	1,2E-24	1,5E-21	Similar to Pyruvate decarboxylase isozyme 2 (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotssp P51846 PDC2_TOBAC)
MELO3C0020372	6,03	5,8E-22	6,0E-19	Similar to Metal ion binding protein, putative (Rhinus communis) (unire904UniRef90_B9RA05)
MELO3C0060965	9,00	5,0E-21	4,4E-18	Similar to Hexamine-A (Hevea brasiliensis PE=1 SV=2) (uniprot_sprotssp P23472 CHLY_HEVBR)
MELO3C0005787	8,72	1,8E-19	1,4E-16	Similar to Valicoidin hydrolase, putative (Rhinus communis) (unire904UniRef90_B9RYU6)
MELO3C0107181	4,28	2,8E-19	2,0E-16	Similar to Squalene monooxygenase (Panax ginseng PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp O48651 ERG1_PANGI)
MELO3C0204632	3,26	3,4E-18	2,2E-15	Similar to Adenosylhomocysteinase (Petroselinum crispum) (uniprot_sprotssp Q01781 SAHL_PETCR)
MELO3C0004075	4,38	2,5E-17	1,4E-14	Similar to Xylose isomerase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q91FK7 XYLA_ARATH)
MELO3C0005834	4,16	3,6E-17	1,9E-14	Similar to Saccharose-like protein 8 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FYK7 SCL8_ARATH)
MELO3C0003134	4,84	2,6E-16	1,3E-13	Similar to Expansin-A4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O48818 EXPA4_ARATH)
MELO3C026602	3,38	3,8E-16	1,7E-13	Similar to Dual specificity protein phosphatase 12 (Homo sapiens) (uniprot_sprotssp Q9UN16 DUS12_HUMAN)
MELO3C015310	3,81	2,1E-15	8,7E-13	Similar to REF/SRPP-like protein A15g05500 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9MA63 Y3550_ARATH)
MELO3C013774	4,61	3,2E-15	1,3E-12	Similar to Methionine gamma-lyase (Pseudomonas putida) (uniprot_sprotssp P12554 MEGH_PSEPU)
MELO3C021176	3,20	4,2E-15	1,6E-12	Similar to Fatty acid desaturase 3 (Bos taurus) (uniprot_sprotssp A41FP3 FADS3_BOVIN)
MELO3C024190	2,71	5,7E-15	2,0E-12	Similar to Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q884Y1 THIC1_ARATH)
MELO3C011392	5,15	1,2E-14	3,9E-12	Similar to Rubiulin-like proteinase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O65351 SUB1_ARATH)
MELO3C006254	7,65	1,8E-14	5,5E-12	Similar to Protein WAX2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8H1Z0 WAX2_ARATH)
MELO3C016787	7,73	2,5E-14	7,2E-12	Similar to Probable isoprenyl pyrophosphatase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8GXG1 ASPG2_ARATH)
MELO3C016536	3,95	6,2E-14	1,7E-11	Similar to NAC domain-containing protein 72 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q93YY3 NAC72_ARATH)
MELO3C011389	2,85	3,2E-13	8,1E-11	Similar to Probable carboxylesterase 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SXZ5 CXE6_ARATH)
MELO3C006931	2,84	4,5E-13	1,0E-10	Similar to Putative uncharacterized protein (Medicago truncatula) (unire904UniRef90_B7HJG9)
MELO3C017023	3,84	5,1E-13	1,1E-10	Similar to Catalase isozyme 1 (Cucurbita pepo) (uniprot_sprotssp P48350 CATA1_CUCPE)
MELO3C026594	4,41	9,5E-13	2,1E-10	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase RGLG1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SS90 RGLG1_ARATH)
MELO3C007692	3,95	1,7E-12	3,5E-10	Similar to Uncharacterized protein A15g05600 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LSK9 Y5566_ARATH)
MELO3C025110	4,42	2,2E-12	4,3E-10	Similar to Putative aqyl-CoA synthetase Yngl (Baobab subtilis) (uniprot_sprotssp O31826 YNGL_BACSU)
MELO3C005510	4,85	3,5E-12	6,9E-10	Similar to Probable ribose-5-phosphate isomerase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ZU38 RPIA_ARATH)
MELO3C005685	3,09	3,7E-12	7,1E-10	Similar to Aquaporin PIP1-2 (Zea mays) (uniprot_sprotssp Q9X1F9 PIP12_MAIZE)
MELO3C006334	2,54	4,4E-12	8,1E-10	Similar to 3-ketotriol-CoA thiolase 2, peroxisomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q56WD9 THIK2_ARATH)
MELO3C026456	3,15	1,3E-11	2,2E-09	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q84MB3 ACCH1_ARATH)
MELO3C016068	2,78	2,9E-11	4,7E-09	Similar to UDP-glucose-6-dehydrogenase (Glycine max PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q96558 UGDH_SOYBN)
MELO3C005869	6,86	1,6E-10	2,2E-08	Similar to Bidirectional sugar transporter SWET3b (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q5NAZ9 SWT3B_ORYSJ)
MELO3C014965	3,37	2,0E-10	2,8E-08	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire904UniRef90_B91FN1)
MELO3C009339	3,70	3,7E-10	4,8E-08	Similar to Uncharacterized UDP-glucosyltransferase At1g05675 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P0C7P7 Y1567_ARATH)
MELO3C014833	5,12	1,3E-09	1,5E-07	Similar to Omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q94CD1 HHT1_ARATH)
MELO3C024771	3,96	1,4E-09	1,6E-07	Similar to LOB domain-containing protein 41 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9M886 LBD41_ARATH)
MELO3C023802	2,71	1,5E-09	1,6E-07	Similar to Carboxyl-CoA O-methyltransferase (Populus trichocarpa PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P93711 CAMT_POPPK)
MELO3C011872	6,80	2,0E-09	2,2E-07	Similar to Retioulin oxidase-like protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SVG4 RETOL_ARATH)
MELO3C002839	6,27	2,7E-09	2,8E-07	Similar to Peptide transporter PTR1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9M901 PTR1_ARATH)
MELO3C009190	3,84	3,7E-09	3,7E-07	Similar to Miraculin (Richardella dulcifica PE=1 SV=3) (uniprot_sprotssp P13087 MIRA_RICDU)
MELO3C002175	6,33	6,5E-09	6,3E-07	Similar to Putative peroxisomal-oxoacyl-CoA synthetase (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotssp O74976 FAT2_SCHPO)
MELO3C005663	3,33	6,6E-09	6,3E-07	Similar to L-glutamine coumaroyltransferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FN91 AGCL_ARATH)
MELO3C020674	6,41	6,4E-09	6,3E-07	Similar to Mannan endo-1,4-beta-mannosidase 5 (Solanum lycopersicum) (uniprot_sprotssp Q6XM50 MAN5_SOLLIC)
MELO3C022162	5,16	8,1E-09	7,6E-07	Similar to Probable nucleodioxin 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O80763 NRX1_ARATH)
MELO3C022138	2,33	8,7E-09	8,1E-07	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P42736 RAP23_ARATH)
MELO3C021306	2,42	9,1E-09	8,4E-07	Similar to BAHD acyltransferase DCR (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9HF86 DCR_ARATH)
MELO3C003230	5,03	1,0E-08	9,4E-07	Similar to Homocysteine zipper protein HAT14 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P46665 HAT14_ARATH)
MELO3C023514	4,23	1,1E-08	9,6E-07	

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C00103	4,54	2,0E-08	1,8E-06	Similar to Soluble inorganic pyrophosphatase (<i>Zea mays</i>) (uniprot_sprotscsp Q48556 IPYR_MAIZE)
MELO3C0006493	3,58	2,6E-08	2,1E-06	Similar to Bifunctional 3-phosphoenolpyruvate 5-phosphosulfate synthase (Uredinis eupae PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q27128 PAPSS_URECA)
MELO3C010480	3,77	3,8E-08	3,1E-06	Similar to Small glutamine-rich tetrapeptide repeat-containing protein beta (<i>Rattus norvegicus</i>) (uniprot_sprotscsp Q80W98 SGTB_RAT)
MELO3C013963	4,29	4,5E-08	3,7E-06	Similar to PRELECTED: hypothetical protein (<i>Vitis vinifera</i>) (unire90:Unire90_LUP100015CE5E7)
MELO3C004454	4,93	5,6E-08	4,4E-06	Similar to Blue opper protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q07488 BCB1_ARATH)
MELO3C016273	1,89	8,6E-08	6,4E-06	Similar to B2 protein (<i>Daucus carota</i> PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P37707 B2_DAUCA)
MELO3C018098	3,00	8,5E-08	6,4E-06	Similar to Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9C616 ETFA_ARATH)
MELO3C010162	6,03	1,2E-07	7,1E-06	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_180, assembly12x (Fragment) (<i>Vitis vinifera</i>) (unire90:Unire90_D7UC14)
MELO3C010632	3,95	1,4E-07	9,9E-06	Similar to L-allo-threonine aldolase (Aeromonas jandak) (uniprot_sprotscsp Q07051 L1AA_AERJA)
MELO3C018490	5,93	1,6E-07	1,1E-05	Similar to NAC domain-containing protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q39013 NAC2_ARATH)
MELO3C013218	1,92	1,7E-07	1,2E-05	Similar to Limonoid UDP-glucosyltransferase (<i>Citrus unshiu</i> PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q9MB73 LGT_CITUN)
MELO3C018347	5,78	1,7E-07	1,2E-05	Similar to Carbamoyl-phosphate synthase large chain (<i>Nostoc</i> sp., strain PCC 7120 / UTEX.2576) (uniprot_sprotscsp Q8YQ12 CARB_NOSSI)
MELO3C020749	2,84	1,9E-07	1,3E-05	None
MELO3C023338	1,59	2,3E-07	1,5E-05	Similar to Cysteine proteinase RD19a (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp P46329 RD19A_ARATH)
MELO3C0003379	5,79	2,4E-07	1,5E-05	Similar to Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q42581 KPR1L_ARATH)
MELO3C018967	5,53	4,0E-07	2,4E-05	None
MELO3C017632	2,51	4,1E-07	2,4E-05	Similar to Protein TRANSSPARENT12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9LYT3 T12_ARATH)
MELO3C016167	1,70	5,2E-07	3,0E-05	Similar to Peptide methionine sulfoxide reductase (Lactuca sativa PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q9SEK2 MSRA_LACSA)
MELO3C022772	2,39	5,5E-07	3,2E-05	Similar to Probable glutathione-S-transferase ptaC (<i>Nicotiana tabacum</i>) (uniprot_sprotscsp P49332 GSTXC_TOBAC)
MELO3C018934	1,64	7,2E-07	4,1E-05	Similar to Nitrate reductase [NADH] (<i>Cucurbita maxima</i> PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P17569 NIA_CUCMA)
MELO3C024326	1,78	9,4E-07	5,2E-05	Similar to Aa1 carrier protein (<i>Rattus communis</i>) (unire90:Unire90_B9RR02)
MELO3C0005245	1,98	1,0E-06	5,6E-05	Similar to Probable xyloglycane endotransglucosylase/hydrolase protein 28 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q38909 XTH28_ARATH)
MELO3C017940	3,90	1,3E-06	7,0E-05	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2.3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp P42736 RAP23_ARATH)
MELO3C026908	4,10	1,4E-06	7,3E-05	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90:Unire90_B9N859)
MELO3C021281	4,68	1,6E-06	8,3E-05	Similar to Beta-D-xylosidase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9FGY1 BXL1_ARATH)
MELO3C0003752	1,70	1,6E-06	8,4E-05	Similar to GAST-like protein (Populus euphratica) (unire90:Unire90_B6Y6Z9)
MELO3C0005666	1,97	2,1E-06	1,1E-04	Similar to Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp O48646 GPX6_ARATH)
MELO3C007560	5,80	2,1E-06	1,1E-04	Similar to Heat shock factor protein HSP24 (Solanum peruvianum) (uniprot_sprotscsp P22335 HSP24_SOLPE)
MELO3C020555	5,28	2,4E-06	1,2E-04	Similar to Mitogen-activated protein kinase kinase ANPI (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp O22040 ANPI_ARATH)
MELO3C0009389	1,85	2,5E-06	1,2E-04	Similar to Cytochrome-O-glucosyltransferase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9ZQ99 COGTL_ARATH)
MELO3C007272	4,41	2,6E-06	1,3E-04	Similar to Glyoxysomal processing protease, glyoxysomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q8VZD4 DEG15_ARATH)
MELO3C016562	5,01	3,2E-06	1,5E-04	Similar to Putative uncharacterized protein (Glycine max) (unire90:Unire90_C6T050)
MELO3C0005696	1,87	3,6E-06	1,7E-04	Similar to EIN3-binding F-box protein 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9SKK0 EBF1_ARATH)
MELO3C010461	3,39	4,1E-06	1,9E-04	Similar to Aminotransferase YhdL (<i>Escherichia coli</i> (strain K12)) (uniprot_sprotscsp P77806 YBDL_ECOLI)
MELO3C010286	1,39	4,6E-06	2,1E-04	Similar to Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump (Vigna radiata var. radiata PE=1 SV=3) (uniprot_sprotscsp P21616 AVP_VIGRR)
MELO3C021318	2,44	5,0E-06	2,2E-04	Similar to Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-a (<i>Cucumis sativus</i> PE=1 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q39659 MHPA_CUCSA)
MELO3C022452	4,34	5,5E-06	2,4E-04	Similar to Probable fructokinase-4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9MH89 SCRK4_ARATH)
MELO3C010982	2,04	5,6E-06	2,4E-04	Similar to Cysteine protease RD19a (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp P46329 RD19A_ARATH)
MELO3C005577	1,69	6,0E-06	2,5E-04	Similar to Primary amine oxidase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q8H1H9 AMO_ARATH)
MELO3C007994	1,87	6,2E-06	2,6E-04	Similar to 6-phosphofruktokinase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9PHK0 K6PF2_ARATH)
MELO3C004732	4,54	6,9E-06	2,8E-04	Similar to Catalytic putative (<i>Rattus communis</i>) (unire90:Unire90_B9SC54)
MELO3C017965	5,13	7,5E-06	3,1E-04	Similar to Guanylate kinase (<i>Mus musculus</i>) (uniprot_sprotscsp Q64520 KGUA_MOUSE)
MELO3C023150	1,96	9,3E-06	3,8E-04	Similar to Probable methyltransferase PMT15 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9ZPH9 PMTF_ARATH)
MELO3C016144	3,12	9,7E-06	3,9E-04	Similar to Non-lysosomal glucosylceramidase (<i>Mus musculus</i>) (uniprot_sprotscsp Q69Z13 GBA2_MOUSE)
MELO3C022176	2,00	9,8E-06	3,9E-04	Similar to AT3g16010/FIN13_150 (Arabidopsis thaliana) (unire90:Unire90_Q9LFS3)
MELO3C012324	1,72	1,1E-05	4,2E-04	Similar to Calmodulin (<i>Capsicum annuum</i>) (uniprot_sprotscsp P93087 CALM_CAPAN)
MELO3C026342	4,53	1,1E-05	4,3E-04	Similar to Limonoid UDP-glucosyltransferase (<i>Citrus unshiu</i> PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q9MB73 LGT_CITUN)
MELO3C018489	4,04	1,1E-05	4,3E-04	

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C000013	2,40	1,2E-05	4,5E-04	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Parsia americana) (uniprot_sprotsp P24465 C71A1_PERA1E)
MELO3C000472	3,81	1,2E-05	4,5E-04	Similar to Probable calcium-binding protein C.ML48 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9ZQHH CML48_ARATH)
MELO3C0010273	4,84	1,2E-05	4,7E-04	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN-40024_scaffold_118.assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_D714Z4)
MELO3C025768	2,63	1,7E-05	6,1E-04	Similar to F-box/kelch-repeat protein At5g06570 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FKJ0 FK132_ARATH)
MELO3C007592	4,09	1,7E-05	6,2E-04	Similar to Isoflavone 2'-hydroxylase (Glycyrrhiza echinata) (uniprot_sprotsp P93147 C81E1_GLYEC)
MELO3C021853	4,98	1,8E-05	6,4E-04	Similar to Putative gamma-glutamylcystine synthetase At3g2910 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M8T3 Y2910_ARATH)
MELO3C007702	4,93	2,0E-05	7,1E-04	Similar to Probable mannitol dehydrogenase (Fragaria ananassa) (uniprot_sprotsp Q9ZRF1 MTDH_FRAAN)
MELO3C017135	2,65	2,0E-05	7,1E-04	Similar to Scnnc/ threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q39030 KPK2_ARATH)
MELO3C020745	2,74	2,4E-05	8,5E-04	Similar to Putative undecatenated protein (Cucumis melo subsp. melo) (uniref90 UniRef90_F5CG02)
MELO3C015532	1,98	2,6E-05	9,1E-04	Similar to Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain, putative (Ricinus communis) (uniref90 UniRef90_B9RR85)
MELO3C011028	2,33	2,8E-05	9,5E-04	Similar to 14-3-3 protein 7 (Solanum lycopersicum) (uniprot_sprotsp P93212 I4337_SOLLO)
MELO3C007572	1,54	2,8E-05	9,6E-04	Similar to Polyubiquitin (Fragment) (Nicotiana glauca) (uniprot_sprotsp PWC884 UB14P_NICSY)
MELO3C008063	2,77	2,9E-05	9,8E-04	Similar to 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial (Dioscorea alata) (uniprot_sprotsp Q54M22 ODBA_DICDI)
MELO3C007590	3,56	3,1E-05	1,1E-03	Similar to Poly(A)-binding protein C-terminal interacting protein 6 (Cucumis sativus) (uniref90 UniRef90_Q6ELF9)
MELO3C019981	2,12	3,2E-05	1,1E-03	Similar to Alternative oxidase, mitochondrial (Mangifera indica) (uniprot_sprotsp Q40294 AOX1_MANIN)
MELO3C027020	3,78	3,3E-05	1,1E-03	Similar to Probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q84VX0 RFSL_ARATH)
MELO3C025599	3,26	3,5E-05	1,2E-03	Similar to Putative undecatenated protein (Ricinus communis) (uniref90 UniRef90_B9SV7)
MELO3C018892	3,16	3,6E-05	1,2E-03	Similar to Putative undecatenated protein (Ricinus communis) (uniref90 UniRef90_B9SV7)
MELO3C025304	4,07	4,0E-05	1,3E-03	Similar to Probable cytochrome P450 52A1 (Dioscorea alata) (uniprot_sprotsp O34624 YOC5_BACSU)
MELO3C017953	3,29	4,1E-05	1,3E-03	Similar to LOB domain-containing protein 41 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M886 LBD41_ARATH)
MELO3C007140	4,76	4,5E-05	1,4E-03	Similar to Probable cytochrome P450 52A1 (Dioscorea alata) (uniprot_sprotsp O34624 YOC5_BACSU)
MELO3C003577	2,61	4,9E-05	1,6E-03	Similar to Putative undecatenated protein (Glycyrrhiza echinata) (uniref90 UniRef90_UPI00019852C0)
MELO3C023424	1,75	5,0E-05	1,6E-03	Similar to Cucum beta pectinase (Cucumis sativus) (uniref90 UniRef90_C6TBI0)
MELO3C015538	4,74	5,1E-05	1,6E-03	Similar to Putative undecatenated protein (Fragment) (Cucumis sativus) (uniref90 UniRef90_Q8VWXX4)
MELO3C021029	3,10	5,1E-05	1,6E-03	Similar to Putative undecatenated protein (Glycyrrhiza echinata) (uniref90 UniRef90_C6TBI0)
MELO3C018948	2,00	5,5E-05	1,7E-03	Similar to Alpha-1,4 glucan phosphorylase L-1 isozyme, chloroplastic/amyloplastic (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotsp P04045 PHSL_SOLTU)
MELO3C017382	4,02	5,6E-05	1,7E-03	Similar to Lysosomal beta glucosidase (Dioscorea alata) (uniprot_sprotsp Q23892 GLUA_DICDI)
MELO3C019091	4,18	5,9E-05	1,8E-03	Similar to Alpha-glucosidase yHq (Escherichia coli (strain K12)) (uniprot_sprotsp P32138 YHq_ECOLI)
MELO3C0212183	4,91	6,6E-05	1,9E-03	Similar to Peroxidase 11 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q96519 PER11_ARATH)
MELO3C009663	2,18	7,1E-05	2,0E-03	Similar to 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (Brassica napus) (uniprot_sprotsp Q9XFW4 LPAT2_BRANA)
MELO3C012217	2,28	7,1E-05	2,0E-03	Similar to AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor RAV2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P82280 RAV2_ARATH)
MELO3C005383	1,96	7,3E-05	2,1E-03	Similar to Putative glycerol-3-phosphate transporter 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C5L3 GLPT1_ARATH)
MELO3C019108	4,88	7,6E-05	2,1E-03	Similar to 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (Bacillus subtilis) (uniprot_sprotsp P51831 FABG_BACSU)
MELO3C006208	3,69	8,0E-05	2,2E-03	Similar to Pectinesterase 2 (Citrus sinensis) (uniprot_sprotsp O04887 PME2_CITSI)
MELO3C008139	3,71	8,1E-05	2,2E-03	Similar to Probable metal-nitrosamine transporter YSL7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SHY2 YSL7_ARATH)
MELO3C000985	1,53	9,2E-05	2,5E-03	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C017306	1,97	9,2E-05	2,5E-03	Similar to Putative undecatenated protein (Glycyrrhiza echinata) (uniref90 UniRef90_C6SYT4)
MELO3C017480	2,84	1,0E-04	2,7E-03	Similar to Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase protein 22 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38857 XTH22_ARATH)
MELO3C019735	2,45	1,0E-04	2,7E-03	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (Prunus mume) (uniprot_sprotsp Q9MB94 ACCO_PRUMU)
MELO3C005355	3,91	1,0E-04	2,8E-03	Similar to Clavaminate synthase-like protein At3g21360 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LIG0 Y3136_ARATH)
MELO3C020811	3,32	1,1E-04	2,8E-03	Similar to PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_UPI0001982DD4)
MELO3C015151	2,35	1,2E-04	3,0E-03	Similar to Scnnc-glyoxylate aminotransferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q56YA5 SGAT_ARATH)
MELO3C004455	4,27	1,2E-04	3,0E-03	Similar to Blue copper protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q07488 BCBI_ARATH)
MELO3C022961	2,00	1,2E-04	3,0E-03	Similar to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P93836 HPPD_ARATH)
MELO3C012256	3,27	1,2E-04	3,1E-03	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_UPI00019828EC)
MELO3C022701	2,21	1,2E-04	3,1E-03	Similar to Pectinesterase 3 (Phaseolus vulgaris) (uniprot_sprotsp Q43111 PME3_PHASEU)
MELO3C018469	3,61	1,2E-04	3,1E-03	Similar to UDP-glucosyltransferase UGT73B1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8VZE9 UG73_ARATH)
MELO3C019267	3,90	1,3E-04	3,2E-03	Similar to Catalytic, putative (Ricinus communis) (uniref90 UniRef90_B9S[U8])
MELO3C005688	2,24	1,3E-04	3,3E-03	Similar to Aminopeptidase N (Escherichia coli (strain K12)) (uniprot_sprotsp P04825 AMPN_ECOLI)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C021562	2,24	1,3E-04	3,3E-03	Similar to Glutaredoxin-C6 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp P55142) GRXC6_ORYSA
MELO3C012604	1,70	1,4E-04	3,4E-03	Similar to Phosphoglycerate kinase, cytosolic (Nicotiana tabacum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q42962) PGKY_TOBAC
MELO3C0003165	4,34	1,4E-04	3,5E-03	Similar to Uradl phosphoribosyltransferase (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotssp P93394) UPL_TOBAC
MELO3C019587	2,32	1,4E-04	3,5E-03	Similar to 26S protease regulatory subunit 6B homolog (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SEJ4) PRS6B_ARATH
MELO3C0005916	4,48	1,5E-04	3,5E-03	None
MELO3C007408	3,92	1,5E-04	3,6E-03	Similar to Aspartic protease (Cucurbita pepo PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp O04057) ASPRC_CUCPE
MELO3C011317	2,77	1,5E-04	3,6E-03	Similar to Zinc finger protein CONSTANTS-LIKE 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q940T9) COL4_ARATH
MELO3C011433	2,00	1,5E-04	3,6E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B91HXM4)
MELO3C012410	3,78	1,5E-04	3,6E-03	Similar to Thiorredoxin-like 3-2, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8VZT6) TRL32_ARATH
MELO3C011129	1,57	1,5E-04	3,6E-03	Similar to NADP-dependent malic enzyme (Phaseolus vulgaris) (uniprot_sprotssp P12628) MAOX_PHAUV
MELO3C0005084	1,96	1,5E-04	3,6E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B91HG84)
MELO3C007423	1,67	1,6E-04	3,7E-03	Similar to Chromoplast-specific carotenoid-associated protein, chromoplast (Cucumis sativus) (uniprot_sprotssp Q96398) CHRC_CUCSA
MELO3C004488	3,45	1,6E-04	3,8E-03	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_206, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_D7SSP1)
MELO3C006451	2,80	1,6E-04	3,8E-03	Similar to Ethylene receptor 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q0W1PQ2) ETR2_ARATH
MELO3C008515	4,40	1,6E-04	3,8E-03	None
MELO3C026800	2,22	1,7E-04	3,9E-03	Similar to Proteasome subunit alpha type-3 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q9LSU0) PSA3_ORYSA
MELO3C012010	2,87	1,8E-04	4,0E-03	Similar to Probable alpha-alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 9 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q91RA7) TTP89_ARATH
MELO3C026664	2,48	1,8E-04	4,0E-03	Similar to PPP2E peptidase domain-containing protein 2 (Xenopus laevis) (uniprot_sprotssp Q6GLM5) PPDE2_XENLA
MELO3C018364	3,03	1,8E-04	4,0E-03	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_67, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_D7T4M3)
MELO3C017590	3,69	1,8E-04	4,0E-03	Similar to Aa1-oxenylase A oxidase, peroxisomal (Cucurbita maxima) (uniprot_sprotssp O64894) AGOX2_CUCMA
MELO3C021202	4,49	1,8E-04	4,0E-03	Similar to Putative undamsterized protein (Glycine max) (uniref90 UniRef90_G6TN79)
MELO3C011063	2,27	2,0E-04	4,5E-03	Similar to GLA BR2 expression modulator (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8S8F8) GEM_ARATH
MELO3C010960	2,19	2,0E-04	4,5E-03	Similar to Proteasome subunit alpha type-1-A (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P34066) PSA1A_ARATH
MELO3C001832	3,45	2,4E-04	5,1E-03	Similar to Undenatured protein ycf45 (Populus purpurea) (uniprot_sprotssp P51281) YCF45_PORPU
MELO3C018139	3,91	2,6E-04	5,5E-03	Similar to Probable leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g15730 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q91LFV3) Y5157_ARATH
MELO3C005637	1,76	2,6E-04	5,5E-03	Similar to Rhomboid family member 1 (Danio rerio) (uniprot_sprotssp Q6GMF8) RHDF1_DANRE
MELO3C023433	2,42	2,7E-04	5,6E-03	Similar to Protein KIAA0664 homolog (Drosophila willistonii) (uniprot_sprotssp B4MYG3) K0664_DROW1
MELO3C011234	1,80	2,8E-04	5,8E-03	Similar to Eps8like hydrolase 2 (Homo sapiens) (uniprot_sprotssp P34913) HYES_HUMAN
MELO3C017946	1,91	3,1E-04	6,2E-03	Similar to Peroxisome biogenesis protein 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FMA3) PEX5_ARATH
MELO3C009854	4,22	3,1E-04	6,3E-03	Similar to Dihydroorotase, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp C04904) PYRC_ARATH
MELO3C021091	4,19	3,2E-04	6,4E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B91HY7)
MELO3C019895	1,85	3,3E-04	6,6E-03	Similar to Ferredoxin-3, chloroplastic (Zea mays) (uniprot_sprotssp P27788) FER3_MAIZE
MELO3C019820	4,30	3,4E-04	6,6E-03	Similar to Glyceral-3-phosphate dehydrogenase SDP6, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SS48) SDP6_ARATH
MELO3C013434	1,95	3,5E-04	6,8E-03	Similar to Coatomer subunit alpha-1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q94A40) COPA1_ARATH
MELO3C010427	4,13	3,6E-04	6,9E-03	Similar to 2-aminoethanethiol dehydrogenase (Mus musculus) (uniprot_sprotssp Q6PDY2) AEDQ_MOUSE
MELO3C013893	3,69	3,6E-04	7,0E-03	Similar to Aspartate-semialdehyde dehydrogenase (Prochlorococcus marinus) (uniprot_sprotssp P49420) DHAS_PROMA
MELO3C011402	3,09	3,8E-04	7,4E-03	Similar to Scnnc1/threonine-protein kinase SAPK3 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp P6G5D6) SAPK3_ORYSA
MELO3C018552	2,53	4,0E-04	7,6E-03	Similar to D-aminooxal-rRNA deacylase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ZPQ3) GEK1_ARATH
MELO3C009759	1,55	4,0E-04	7,6E-03	Similar to Receptor-like protein kinase HAIKU2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q91J44) HKU2_ARATH
MELO3C007724	1,64	4,3E-04	8,0E-03	Similar to Ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplastic (Spinacia oleracea PE=1 SV=3) (uniprot_sprotssp Q43155) GLTJ5_SPIOI
MELO3C024514	1,20	4,3E-04	8,0E-03	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_UPI0001982C2)
MELO3C002315	4,59	4,5E-04	8,3E-03	Similar to Enolase (Rattus norvegicus PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P42896) ENO_RICCO
MELO3C007398	2,07	4,6E-04	8,4E-03	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Persia americana) (uniprot_sprotssp P24465) C71A1_PERAE
MELO3C024514	4,44	4,7E-04	8,5E-03	Similar to 5'-adenylylsulfate reductase 3, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P92980) APR3_ARATH
MELO3C002555	3,35	4,7E-04	8,5E-03	Similar to External NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, mitochondrial (Saccharomyces cerevisiae) (uniprot_sprotssp P40215) NDH1_YEAST
MELO3C018966	3,24	4,9E-04	8,9E-03	Similar to 6-phosphofruktokinase 5, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8VYN6) K6PF5_ARATH
MELO3C018412	1,47	5,1E-04	9,1E-03	Similar to Allene oxide synthase, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9G242) C174A_ARATH
MELO3C007723	1,47	5,2E-04	9,3E-03	Similar to Probable mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Dactyloctenium discoidium) (uniprot_sprotssp Q54PY7) M2OM_DICDI
MELO3C006497	2,51	5,3E-04	9,4E-03	Similar to Stem-specific protein TSJ11 (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotssp P24805) TSJ11_TOBAC

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C011404	3,06	5,3E-04	9,4E-03	Similar to Putative undenatured protein (Riönus communis) (unire90t:UniRef90_B9RI.G9)
MELO3C011694	4,38	5,4E-04	9,5E-03	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P48979) PGLR_PRUPE
MELO3C003803	3,38	5,8E-04	1,0E-02	Similar to Jasmonate O-methyltransferase (Brassica rapa subsp. pekinensis) (uniprot_sprotscsp Q9S8K6) MT_BRARP
MELO3C009729	2,09	5,8E-04	1,0E-02	Similar to Putative undenatured protein (Riönus communis) (unire90t:UniRef90_B9RI.65)
MELO3C010975	1,38	6,3E-04	1,1E-02	Similar to Thioesteron H-type 1 (Nicotiana tabacum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P29449) TXXH1_TOBAC
MELO3C024378	1,86	6,3E-04	1,1E-02	Similar to Putative phospholipid-transporting ATPase 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9LNQ4) ALA4_ARATH
MELO3C011512	1,86	6,5E-04	1,1E-02	Similar to Clathrin interactor EPSN2.2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q67Y19) EPN2_ARATH
MELO3C012182	4,21	6,5E-04	1,1E-02	Similar to Undenatured N-acetyltransferase yd52 (Porphyria yezovensis) (uniprot_sprotscsp Q1XDU5) YCF52_PORYE
MELO3C005616	2,28	6,6E-04	1,1E-02	Similar to Putative undenatured protein (Riönus communis) (unire90t:UniRef90_B9RI.D06)
MELO3C006875	3,19	6,6E-04	1,1E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90t:UniRef90_B9I.D06)
MELO3C009292	3,63	6,6E-04	1,1E-02	Similar to ABC transporter G family member 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9ZUTU) AB2C_ARATH
MELO3C007945	3,36	6,7E-04	1,1E-02	Similar to Phospholipase D delta (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9C5Y0) PLDD1_ARATH
MELO3C013163	1,18	6,9E-04	1,1E-02	Similar to Protein translation factor SUI1 homolog 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp P41568) SUI11_ARATH
MELO3C012278	1,51	7,1E-04	1,2E-02	Similar to PREDICATED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire90t:UniRef90_U1010001982938)
MELO3C018713	1,87	7,3E-04	1,2E-02	Similar to ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH2, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp O80860) FTSH2_ARATH
MELO3C019845	1,44	7,3E-04	1,2E-02	Similar to NAC domain-containing protein 78 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q84K00) NAC78_ARATH
MELO3C006331	2,48	7,6E-04	1,2E-02	Similar to Dihydroxy-acid dehydratase (Rhodospirillum rubrum) (uniprot_sprotscsp Q7UJ69) HLYD2_RHOBAA
MELO3C008286	2,17	7,6E-04	1,2E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90t:UniRef90_B9I.HSK1)
MELO3C018413	1,45	7,7E-04	1,2E-02	Similar to Allene oxide synthase, chloroplastic (Linum usitatissimum) (uniprot_sprotscsp P48847) CP74_LINUS
MELO3C015428	1,21	7,8E-04	1,2E-02	Similar to 6-phosphofruktokinase 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9C517) K6PH7_ARATH
MELO3C009132	2,67	8,2E-04	1,3E-02	Similar to PRA1 family protein B4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp O80915) PRIB4_ARATH
MELO3C013941	2,10	8,3E-04	1,3E-02	Similar to Glucosyltransferase, putative (Riönus communis) (unire90t:UniRef90_B9S.HF3)
MELO3C020357	2,02	8,4E-04	1,3E-02	Similar to Sucrose-phosphate synthase 2 (Caterostigma plantagineum) (uniprot_sprotscsp O04933) SPS2_CRAP1
MELO3C021709	2,14	8,5E-04	1,3E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90t:UniRef90_B9I.XX6)
MELO3C018015	1,54	8,5E-04	1,3E-02	None
MELO3C024284	1,21	8,8E-04	1,4E-02	Similar to V-type proton ATPase catalytic subunit A (Citrus unshiu PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q9SM09) VATA_CITUN
MELO3C016866	2,35	9,0E-04	1,4E-02	Similar to Transmembrane protein 222 (Homo sapiens) (uniprot_sprotscsp Q9I.H0R3) TM222_HUMAN
MELO3C018366	4,12	9,2E-04	1,4E-02	Similar to RING-H2 finger protein ATL166 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9SRM0) ATL166_ARATH
MELO3C020296	3,98	9,7E-04	1,5E-02	Similar to 2-isopropylmalate synthase 2, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9C550) LEU12_ARATH
MELO3C009183	2,34	1,0E-03	1,5E-02	Similar to Probable 2S6 proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp O24412) PSD7_ARATH
MELO3C006303	1,18	1,0E-03	1,5E-02	Similar to P91L1.21 protein (Magnoliophyta) (unire90t:UniRef90_Q9X142)
MELO3C020688	1,57	1,0E-03	1,6E-02	Similar to 14-3-3-like protein B (fragment) (Glycine max) (uniprot_sprotscsp Q96451) 1433B_SOYBN
MELO3C011798	1,27	1,1E-03	1,6E-02	Similar to Cysteine proteinase inhibitor 12 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscsp P46266) 1453_PEA
MELO3C003562	1,68	1,1E-03	1,6E-02	Similar to 14-3-3-like protein (Pisum sativum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P46266) 1453_PEA
MELO3C019550	2,78	1,1E-03	1,7E-02	Similar to Methylothionease kinase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9C6D2) MTK_ARATH
MELO3C011008	2,12	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Snakin-2 (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotscsp Q93X17) SNAK2_SOLJU
MELO3C024994	1,18	1,2E-03	1,7E-02	Similar to 40S ribosomal protein SA (Cicer arietinum) (uniprot_sprotscsp Q65751) RSSA_CICAR
MELO3C007968	1,92	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Isooctate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 1, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q8LFC0) IDH1_ARATH
MELO3C006353	3,75	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Probable glutathione S-transferase (Nicotiana tabacum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q05662) GSTX1_TOBAC
MELO3C020688	3,42	1,2E-03	1,7E-02	Similar to 125 kDa kinase-related protein (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotscsp O23826) K125_TOBAC
MELO3C002167	2,18	1,3E-03	1,9E-02	Similar to Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha-1, mitochondrial (Solanum lycopersicum) (uniprot_sprotscsp Q8G7Q9) SUCA1_SOLLIC
MELO3C017104	2,40	1,3E-03	1,9E-02	Similar to Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 10 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp O80738) TPS10_ARATH
MELO3C010431	1,96	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Senec hydroxymethyltransferase 2 (Dactyloctenium discoidium) (uniprot_sprotscsp Q54EW1) GLYC2_DICDI
MELO3C023195	4,04	1,4E-03	1,9E-02	Similar to NAC domain-containing protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q39013) NAC2_ARATH
MELO3C010470	2,89	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_1, assembly12x (fragment) (Vitis vinifera) (unire90t:UniRef90_E0C886)
MELO3C023067	2,19	1,5E-03	2,0E-02	Similar to Beta-amylase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9JLR6) BAM1_ARATH
MELO3C012334	2,39	1,5E-03	2,1E-02	Similar to Apoptosis-inducing factor homolog A (Dactyloctenium discoidium) (uniprot_sprotscsp Q54NS9) AIFA_DICDI
MELO3C021242	1,40	1,5E-03	2,1E-02	Similar to YTH domain family protein 2 (Macaea fuscicollans) (uniprot_sprotscsp Q4R859) YTH2_MACFA
MELO3C007785	2,13	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90t:UniRef90_B9I.HFQ5)
MELO3C008717	2,76	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase II (Camptotheca acuminata) (uniprot_sprotscsp O48965) IDI2_CAMAC

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C0015186	1,21	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Sulfite reductase [ferredoxin] (Synedochyis sp, strain ATCC 27184 / PCC 6803 / N-1) (uniprot_sprotsp P72854 SIR_SYNY3)
MELO3C0024504	3,40	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90 Unire90_B9NTM3)
MELO3C0018724	1,27	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase 2 (Ikavea trimeria) (uniprot_sprotsp Q9HY65 CAPPC_FLA1R)
MELO3C0002203	1,93	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Probable aldehyde dehydrogenase (Jannum ustiatum) (uniprot_sprotsp Q40255 ALDH_LJNUS)
MELO3C0006545	1,73	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Long chain acyl-CoA synthetase 7, peroxisomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LKS5 LACS7_ARATH)
MELO3C0018456	1,88	1,7E-03	2,3E-02	Similar to Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q91LDD8 MCCB_ARATH)
MELO3C0001238	4,10	1,7E-03	2,3E-02	Similar to Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2 (Fragment) (Manihot esculenta) (uniprot_sprotsp Q40285 UFOG2_MANES)
MELO3C0017478	3,03	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38910 XTH23_ARATH)
MELO3C0020583	3,06	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Neutral ceramidase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q30489 NCASE_ARATH)
MELO3C0009168	1,38	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Probable pyridoxal biosynthesis protein PDX1 (Hevea brasiliensis) (uniprot_sprotsp Q35963 PDX1_HEVBR)
MELO3C0014254	1,47	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Putative undenatured protein PDX1 (Hevea brasiliensis) (unire90 Unire90_B9SGP9)
MELO3C003441	1,50	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38908 XTH30_ARATH)
MELO3C0017268	2,25	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Enolase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C9G4 ENO1_ARATH)
MELO3C0015779	1,68	1,9E-03	2,4E-02	Similar to Putative undenatured protein PDX1 (Hevea brasiliensis) (uniprot_sprotsp Q9CR16 PPD1_MOUSE)
MELO3C0015846	4,02	1,9E-03	2,4E-02	Similar to Inositol polyphosphate multikinase beta (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9F1T2 IPMKB_ARATH)
MELO3C0007667	2,82	1,9E-03	2,4E-02	Similar to Undenatured isomerase BH0283 (Baellus halodurans) (uniprot_sprotsp Q9KGS2 Y283_BAGHD)
MELO3C0018662	1,62	2,0E-03	2,5E-02	Similar to Peptidyl-prolyl is-trans isomerase D (Mus musculus) (uniprot_sprotsp P0CH32 UBQ4_ARATH)
MELO3C0018868	1,52	2,0E-03	2,5E-02	Similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2.1A (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SIV2 RPN1A_ARATH)
MELO3C0022352	3,33	2,0E-03	2,5E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_244, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (unire90 Unire90_D77Y15)
MELO3C0012335	1,88	2,0E-03	2,5E-02	Similar to Uricase2 (Phascolus vulgatus) (uniprot_sprotsp P53763 URIC_PHAVU)
MELO3C0002027	1,83	2,0E-03	2,5E-02	Similar to ATP synthase subunit gamma, mitochondrial (Ipomoea batatas) (uniprot_sprotsp P26360 ATPG3_IPOBA)
MELO3C0007667	3,98	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90 Unire90_B9HY12)
MELO3C0003660	3,22	2,1E-03	2,5E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire90 Unire90_UPI0001982CB8)
MELO3C0020030	3,41	2,1E-03	2,6E-02	Similar to Putative undenatured protein (Röniss communis) (unire90 Unire90_B9T176)
MELO3C0018606	2,85	2,1E-03	2,6E-02	Similar to Magnesium-dependent phosphatase 1 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp Q86V88 MGDPL_HUMAN)
MELO3C0017538	2,66	2,2E-03	2,6E-02	Similar to Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 4 (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q91WU4 TMCO4_MOUSE)
MELO3C0011084	3,59	2,2E-03	2,7E-02	Similar to Putative undenatured protein (Röniss communis) (unire90 Unire90_B9R1X7)
MELO3C0019039	2,20	2,3E-03	2,7E-02	Similar to Pyruvate-5-carboxylate reductase (Glycine max PE=2.SV=1) (uniprot_sprotsp P17817 P5GR_SOYBN)
MELO3C0009538	2,59	2,4E-03	2,8E-02	Similar to Probable receptor protein kinase TMK1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P43298 TMK1_ARATH)
MELO3C0012630	3,10	2,4E-03	2,8E-02	None
MELO3C0004630	3,88	2,4E-03	2,9E-02	Similar to Heat shock factor protein HSF30 (Solanum pennianum) (uniprot_sprotsp P41152 HSF30_SOLPE)
MELO3C0006302	1,03	2,5E-03	3,0E-02	Similar to 1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8W108 ARD3_ARATH)
MELO3C0025798	1,23	2,5E-03	3,0E-02	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pseuda caroliniana) (uniprot_sprotsp P24465 C71A1_PEARAE)
MELO3C0013215	2,37	2,6E-03	3,0E-02	Similar to Chaperone protein DNA), putative (Röniss communis) (unire90 Unire90_B9SXA3)
MELO3C0011440	1,66	2,7E-03	3,1E-02	Similar to Probable NADP-dependent oxidoreductase P1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q39172 P1_ARATH)
MELO3C0014090	3,81	2,7E-03	3,2E-02	Similar to Caftaric acid 3-O-methyltransferase (Medicago sativa PE=1.SV=1) (uniprot_sprotsp P28002 COM1_MEIDSA)
MELO3C0027057	2,93	2,8E-03	3,2E-02	Similar to 9-oxo-xanthone dioxygenase NCED1, chloroplastic (Phascolus vulgatus) (uniprot_sprotsp Q9M6E8 NCED1_PHAVU)
MELO3C0005691	1,94	2,9E-03	3,3E-02	Similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42749 UBC5_ARATH)
MELO3C0010257	2,84	2,9E-03	3,3E-02	Similar to Sugar transport protein 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q04249 STTP_ARATH)
MELO3C0011368	1,47	2,9E-03	3,3E-02	Similar to Pollen-specific protein C13 (Zea mays) (uniprot_sprotsp P33059 PSC13_MAIZE)
MELO3C0002442	1,02	3,0E-03	3,3E-02	Similar to Aspartic proteinase (Cuaurbita pepo PE=2.SV=1) (uniprot_sprotsp O40457 ASPR_CUCPE)
MELO3C0004275	1,38	3,0E-03	3,3E-02	Similar to Nuclear GTPase (Cucumis melo subsp, melo) (unire90 Unire90_A6YTC8)
MELO3C0007003	2,26	3,0E-03	3,3E-02	Similar to Vacuolar-sorting receptor 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8L7E3 VSR7_ARATH)
MELO3C0021090	3,71	2,9E-03	3,3E-02	Similar to Serine/threonine-protein kinase OX11 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q91LRF1 OX11_ARATH)
MELO3C0016290	3,62	3,0E-03	3,4E-02	Similar to Long chain acyl-CoA synthetase 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9T0A0 LACS4_ARATH)
MELO3C0009956	1,19	3,0E-03	3,4E-02	Similar to Formate dehydrogenase, mitochondrial (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotsp Q07511 FDH_SOLTU)
MELO3C0008100	1,66	3,0E-03	3,4E-02	Similar to Probable carboxylesterase 18 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9L1T0 CXE18_ARATH)
MELO3C0021170	2,48	3,0E-03	3,4E-02	Similar to BTB/POZ domain-containing protein POB1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FPW6 POB1_ARATH)
MELO3C0022821	2,66	3,0E-03	3,4E-02	Similar to Microsomal glutathione S-transferase 3 (Bos taurus) (uniprot_sprotsp Q3T100 MGS13_BOVIN)
MELO3C0006187	2,02	3,1E-03	3,4E-02	Similar to Proteasome subunit beta type-1 (Petunia hybrida) (uniprot_sprotsp O82511 PSB1_PETHY)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C016224	1,56	3,1E-03	3,4E-02	Similar to Probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O89675 CCD4_ARATH)
MELO3C010542	3,69	3,1E-03	3,5E-02	Similar to Graves disease carrier protein homolog (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q8C0K5 GDC_MOUSE)
MELO3C020320	2,94	3,1E-03	3,5E-02	Similar to Elongation factor T5, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q5XF75 EFT5_ARATH)
MELO3C010779	3,63	3,1E-03	3,5E-02	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase CMA101 (Cucurbita maxima) (uniprot_sprotsp Q00257 HA12_CUCMA)
MELO3C010779	3,63	3,1E-03	3,5E-02	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9STR4 IA17_ARATH)
MELO3C012007	1,12	3,1E-03	3,5E-02	Similar to spermidine synthase (Coffea arabica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp O82147 SPDE_COFA)
MELO3C010886	1,85	3,3E-03	3,6E-02	Similar to Undenacetylated protein At1g47420, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SX77 UMP6_ARATH)
MELO3C013682	3,16	3,4E-03	3,7E-02	Similar to Histone H2A.1, (Solanum lycopersicum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P25469 H2A1_SOLLIC)
MELO3C010974	3,76	3,4E-03	3,7E-02	Similar to Thiorodoxin H-type (Flagopyrum esculentum PE=3 SV=1) (uniprot_sprotsp Q96419 TRXH_FAGES)
MELO3C020316	3,70	3,4E-03	3,7E-02	Similar to Membrane associated ring finger 18, putative (Fragment) (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotsp B9T315)
MELO3C000525	1,85	3,5E-03	3,8E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN-4024_scaffold_98_assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp E0CVA8)
MELO3C020509	2,30	3,5E-03	3,8E-02	Similar to PREDICTION: hypothetical protein isoform 1 (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp UP100019835D3)
MELO3C003906	1,16	3,5E-03	3,8E-02	Similar to Ethylene receptor 1 (Cucumis melo var. cantalupensis) (uniprot_sprotsp O82466 ETRI_CUCMN)
MELO3C004584	1,92	3,5E-03	3,8E-02	Similar to UPI0676 protein C1494.01 (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotsp Q7LJ04 YQK1_SCHPO)
MELO3C004468	3,40	3,6E-03	3,8E-02	Similar to Putative diolide channel-like protein CLC-g (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P60300 CLCG_ARATH)
MELO3C017677	1,22	3,6E-03	3,8E-02	Similar to Chitinase-like protein 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9MA41 CTLL_ARATH)
MELO3C026875	1,74	3,7E-03	3,9E-02	Similar to Probable serine/threonine-protein kinase WNK4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LVL5 WNK4_ARATH)
MELO3C001995	2,55	3,7E-03	3,9E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotsp Q9L631 SNG4_PINTA)
MELO3C016933	1,63	3,8E-03	4,0E-02	Similar to Probable carboxylesterase 11 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9L621 CXE11_ARATH)
MELO3C014897	1,18	3,8E-03	4,0E-02	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase ALP2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8RXD3 ALP2_ARATH)
MELO3C018607	1,77	3,9E-03	4,0E-02	Similar to Putative alcohol dehydrogenases (Cucumis melo) (uniprot_sprotsp Q9L621 CXE11_ARATH)
MELO3C021300	1,41	3,9E-03	4,0E-02	Similar to Probable protein phosphatase 2C.73 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q964D8 BUI1_DICDI)
MELO3C017669	3,62	4,0E-03	4,1E-02	Similar to Transcription factor bHLH128 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8H102 BHLH28_ARATH)
MELO3C013910	1,62	4,2E-03	4,4E-02	Similar to GTP-binding protein YPTM2 (Zea mays) (uniprot_sprotsp Q05737 YPTM2_MAIZE)
MELO3C007270	3,22	4,3E-03	4,4E-02	Similar to Putative E3 ubiquitin-protein ligase RING1a (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9PKW0 RING1A_ARATH)
MELO3C025523	1,46	4,2E-03	4,4E-02	None
MELO3C018561	2,26	4,3E-03	4,4E-02	None
MELO3C006500	1,83	4,4E-03	4,5E-02	Similar to Dymedin (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q8CHY3 DYMD_MOUSE)
MELO3C013775	1,85	4,4E-03	4,5E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotsp Q964D8 BUI1_DICDI)
MELO3C020790	2,02	4,4E-03	4,5E-02	Similar to Translation initiation factor (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotsp Q964D8 BUI1_DICDI)
MELO3C017847	2,81	4,6E-03	4,6E-02	Similar to COB-W domain-containing protein 2 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp Q8H102 BHLH28_ARATH)
MELO3C019789	2,07	4,6E-03	4,6E-02	Similar to Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-1, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P52901 ODDPA1_ARATH)
MELO3C016809	1,77	4,6E-03	4,6E-02	Similar to Zinc finger protein 1 (Triticum aestivum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp Q42430 ZFP1_WHEAT)
MELO3C025755	1,52	4,7E-03	4,7E-02	Similar to Proteasome subunit beta type-4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q7D1R9 PSB4_ARATH)
MELO3C004274	2,11	4,7E-03	4,7E-02	Similar to Peroxisomal membrane protein PMP34 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp P17783 MDHML_CITLA)
MELO3C016095	1,44	4,7E-03	4,7E-02	Similar to Malate dehydrogenase, mitochondrial (Citrus latifolia) (uniprot_sprotsp P17783 MDHML_CITLA)
MELO3C019507	1,56	4,7E-03	4,7E-02	Similar to Protein CYP104 (Cynara cardunculus) (uniprot_sprotsp P40781 CYP104_CYNCA)
MELO3C009453	1,15	4,8E-03	4,7E-02	Similar to Malate dehydrogenase, mitochondrial (Solanum lycopersicum) (uniprot_sprotsp Q43497 MDAR_SOLLIC)
MELO3C019711	1,27	4,8E-03	4,7E-02	Similar to Citrate synthase, glyoxysomal (Cucurbita maxima PE=1 SV=1) (uniprot_sprotsp P49299 CYSZ_CUCMA)
MELO3C017047	3,30	4,9E-03	4,8E-02	Similar to RING-H2 finger protein ATL80 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9L669 ATL80_ARATH)
MELO3C016608	2,88	5,0E-03	4,9E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Glycine max) (uniprot_sprotsp Q7XJ98 KATFAM_ARATH)
MELO3C012836	2,10	5,1E-03	5,0E-02	Similar to Xyloglucan galactosyltransferase KATAMARI1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9L669 ATL80_ARATH)
MELO3C019035	3,45	5,1E-03	5,0E-02	Similar to Alpha-amylase (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotsp Q9L669 ATL80_ARATH)
MELO3C024849	2,43	5,1E-03	5,0E-02	Similar to Undenacetylated protein C1G65.07c (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotsp O60121 YH77_SCHPO)
MELO3C007736	-5,39	1,4E-14	4,2E-12	Similar to Homocysteine zipper protein ATHB-6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P46668 ATHB6_ARATH)
MELO3C022778	-6,88	1,4E-13	3,7E-11	Similar to Metal ion binding protein, putative (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotsp B9S1S2)
MELO3C002578	-4,46	4,2E-13	1,0E-10	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8H1S4 ACCH3_ARATH)
MELO3C021688	-2,76	6,4E-12	1,1E-09	Similar to Elongation factor 1-alpha (Maanhot esculenta) (uniprot_sprotsp Q49169 E1FA_MANES)
		1,3E-11	2,2E-09	None

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C014315	-3,26	4,3E-11	6,6E-09	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_179,assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_D7T312)
MELO3C016366	-3,13	6,4E-11	9,6E-09	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_UPI0001982D0f)
MELO3C011764	-3,16	7,7E-11	1,1E-08	Similar to Presease 2 (Moraxella huamata) (uniprot_sprotssp Q59536 PTRB_MORLA)
MELO3C018458	-4,05	1,5E-10	2,1E-08	Similar to ABSCLISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q2M7Q3 A1516_ARATH)
MELO3C001763	-3,53	8,0E-10	1,0E-07	None
MELO3C023924	-3,13	1,1E-09	1,4E-07	None
MELO3C010183	-6,40	1,2E-09	1,4E-07	None
MELO3C005252	-2,22	2,0E-09	2,2E-07	Similar to Ankyrin repeat-containing protein At2g01680 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q2ZU96 Y2168_ARATH)
MELO3C008010	-4,38	3,5E-09	3,5E-07	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B91H20)
MELO3C005111	-2,63	1,7E-08	1,5E-06	Similar to Predicted protein (Fragment) (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B9GNEF3)
MELO3C021404	-4,75	5,3E-08	4,3E-06	Similar to Putative uncharacterized protein (Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (uniref90:UniRef90_D7L4S5)
MELO3C007177	-2,37	5,5E-08	4,3E-06	Similar to Transcription factor GTE12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LS28 GTE12_ARATH)
MELO3C012083	-3,25	5,9E-08	4,6E-06	Similar to Putative uncharacterized protein (Ricinus communis) (uniref90:UniRef90_B9SHIN5)
MELO3C001727	-3,21	8,8E-08	6,4E-06	Similar to Putative uncharacterized protein SB13688/02010 (Fragment) (Sorghum bicolor) (uniref90:UniRef90_C6JSL6)
MELO3C025758	-4,14	8,9E-08	6,4E-06	Similar to Auxin response factor 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q2ZTX9 ARIFD_ARATH)
MELO3C0094610	-4,53	2,0E-07	1,3E-05	Similar to Zinc finger CCH1 domain-containing protein 20 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O82199 C3H20_ARATH)
MELO3C007122	-2,46	2,2E-07	1,5E-05	Similar to F-box protein A15g46170 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FNK5 FR285_ARATH)
MELO3C024344	-2,37	2,5E-07	1,6E-05	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_2,assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_D7T3Z7)
MELO3C028877	-4,25	2,7E-07	1,7E-05	Similar to Putative uncharacterized protein (Ricinus communis) (uniref90:UniRef90_B9SC60)
MELO3C026494	-4,70	2,8E-07	1,7E-05	Similar to Cytochrome P450 82A3 (Glycine max) (uniprot_sprotssp O49858 C82A3_SOYBN)
MELO3C018099	-1,94	3,2E-07	2,0E-05	Similar to Polyubiquitin (Fragment) (Nicotiana sylvestris) (uniprot_sprotssp P0CG84 UB14P_NICSY)
MELO3C003491	-4,53	9,3E-07	5,2E-05	Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] (Cucumis sativus) (uniprot_sprotssp Q2M518 TCTP_CUCME)
MELO3C016601	-3,98	1,2E-06	6,4E-05	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B9HYA3)
MELO3C012052	-1,92	2,1E-06	1,1E-04	Similar to Organic anion transporter protein (Drosophila melanogaster) (uniprot_sprotssp Q9VCA2 ORCT_DROME)
MELO3C002222	-3,32	2,2E-06	1,1E-04	Similar to Dnaj homolog subfamily B member 4 (Mus musculus) (uniprot_sprotssp Q2D832 DNJB4_MOUSE)
MELO3C002874	-2,85	2,5E-06	1,2E-04	Similar to Probable mitochondrial dipeptone BCS1-B (Dicyostelium discoideum) (uniprot_sprotssp Q544DY9 BCS1B_DICDD)
MELO3C005795	-3,29	2,6E-06	1,3E-04	Similar to Protein PHILOEM PROTEIN 2-LIKE A1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O81865 P2A01_ARATH)
MELO3C009791	-3,45	2,6E-06	1,3E-04	Similar to Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic (Antirrhinum majus) (uniprot_sprotssp O82627 SSG1_ANTMA)
MELO3C018819	-3,20	3,1E-06	1,5E-04	Similar to Cation/calcium exchanger 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LJ12 CCX3_ARATH)
MELO3C007104	-1,91	3,8E-06	1,8E-04	Similar to Probable beta-1,3-galactosyltransferase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp A8MRC7 B3GT2_ARATH)
MELO3C007609	-3,92	4,4E-06	2,0E-04	Similar to Auxin response factor 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q2ZTX8 ARIF6_ARATH)
MELO3C008485	-4,43	4,4E-06	2,0E-04	Similar to Subtilisin-like protease (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O65351 SUBL1_ARATH)
MELO3C009187	-4,84	4,4E-06	2,0E-04	None
MELO3C002830	-2,22	4,5E-06	2,0E-04	Similar to BAHD acyltransferase DCR (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FF86 DCR_ARATH)
MELO3C021333	-4,24	5,7E-06	2,5E-04	Similar to Tubulin beta-1 chain (Zea mays) (uniprot_sprotssp P18025 TBB1_MAIZE)
MELO3C012987	-1,76	5,8E-06	2,5E-04	Similar to Vesicle-associated membrane protein 724 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O23429 VA724_ARATH)
MELO3C003412	-2,91	5,9E-06	2,5E-04	Similar to Putative uncharacterized protein (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_A5AUD3)
MELO3C014519	-2,36	6,2E-06	2,6E-04	Similar to Transcription factor MYC2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q39204 RAP1_ARATH)
MELO3C014482	-3,46	6,3E-06	2,6E-04	Similar to BEL1-like homeodomain protein 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9JS56 BLH1_ARATH)
MELO3C021231	-3,49	7,4E-06	3,0E-04	Similar to Lipoygenase 5, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LUW0 LOX5_ARATH)
MELO3C003931	-2,52	8,5E-06	3,5E-04	Similar to CBL-an encoding serine/threonine-protein kinase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8RWC9 CIPK1_ARATH)
MELO3C026184	-2,43	1,1E-05	4,7E-04	Similar to Bidirectional sugar transporter SWEET10 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LUE3 SWEET10_ARATH)
MELO3C014594	-2,53	1,2E-05	4,7E-04	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B9H8A2)
MELO3C003931	-1,49	1,3E-05	4,7E-04	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B9N844)
MELO3C023537	-1,69	1,5E-05	5,9E-04	Similar to Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 8 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp A3BDI8 SAP8_ORYS)
MELO3C004023	-5,03	1,6E-05	5,8E-04	Similar to NADPH-cytochrome c P450 reductase (Catharanthus roseus) (uniprot_sprotssp Q95001 NCRP_CATRO)
MELO3C025463	-4,67	1,7E-05	6,3E-04	Similar to Auxin-induced protein 5NG4 (Pinus taeda PI=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q61163 SNG4_PINTA)
MELO3C009097	-4,67	1,7E-05	6,3E-04	Similar to Probable WRKY transcription factor 70 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LY00 WRK70_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C014883	-2,03	1,7E-05	6,3E-04	Similar to B2 protein (Daucus carota PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P37707 B2_DAUCA)
MELO3C000854	-2,66	1,8E-05	6,5E-04	Similar to High affinity cationic amino acid transporter 1 (Mus musculus) (uniprot_sprotscsp Q09143 CTRL_MOUSE)
MELO3C023417	-1,95	2,6E-05	9,1E-04	Similar to Putative undenatured protein (Rönus communis) (unire900Unire900_B9RV58)
MELO3C015541	-3,07	3,0E-05	1,0E-03	Similar to Putative undenatured protein (Glycine max) (unire900Unire900_C6TCK1)
MELO3C024317	-4,28	4,9E-05	1,6E-03	Similar to GDSL-esterase/lipase 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q8SSA7 GLIP5_ARATH)
MELO3C015407	-1,52	5,1E-05	1,6E-03	Similar to NADP-dependent malic enzyme (Vitis vinifera PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P51615 MAOX_VITVI)
MELO3C019807	-4,40	5,2E-05	1,6E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire900Unire900_B9HUG4)
MELO3C021521	-2,23	5,3E-05	1,6E-03	Similar to Auxin-induced protein 5NG4 (Dunaliella salina PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q6J163 5NG4_PNTA)
MELO3C018459	-1,40	5,7E-05	1,7E-03	Similar to 40S ribosomal protein S16 (Gossypium hirsutum) (uniprot_sprotscsp P46293 RS16_GOSHI)
MELO3C009108	-4,74	5,9E-05	1,8E-03	Similar to Non-specific lipid-transfer protein 2 (Sorghum bicolor) (uniprot_sprotscsp Q43194 NLT2_SORBI)
MELO3C020866	-1,89	6,0E-05	1,8E-03	Similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2 10 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp P35133 UBC10_ARATH)
MELO3C007121	-4,77	6,0E-05	1,8E-03	Similar to Transcription factor TCP2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q93V43 TCP2_ARATH)
MELO3C018368	-3,95	6,2E-05	1,8E-03	Similar to Omega-hydroxyphalmitic O-feruloyl transferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q94CD1 HHT1_ARATH)
MELO3C026493	-4,43	6,4E-05	1,9E-03	Similar to Cytochrome P450 82A3 (Glycine max) (uniprot_sprotscsp Q49838 C82A3_SOYBN)
MELO3C012911	-1,49	6,5E-05	1,9E-03	Similar to S-adenosylmethionine synthase 2 (Elaeagnus umbellata) (uniprot_sprotscsp Q9AT55 METK2_ELAUM)
MELO3C015940	-4,51	6,6E-05	1,9E-03	Similar to CTP synthase (Dietostelium discoideum) (uniprot_sprotscsp Q54V77 PYRG_DICDI)
MELO3C011906	-3,17	6,7E-05	1,9E-03	Similar to Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g6720 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp C01G12 Y1677_ARATH)
MELO3C005681	-2,46	6,8E-05	2,0E-03	Similar to Putative undenatured protein (Rönus communis) (unire900Unire900_B9RC7)
MELO3C013353	-4,75	7,2E-05	2,1E-03	None
MELO3C002508	-2,80	7,5E-05	2,1E-03	Similar to Thioesterase-like protein CXXS1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q8LD15 CXXS1_ARATH)
MELO3C012054	-2,00	7,6E-05	2,1E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire900Unire900_B9HLX2)
MELO3C010686	-4,83	7,9E-05	2,2E-03	Similar to Alanine aminotransferase 2 (Hordeum vulgare PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P52894 ALA2_HORVU)
MELO3C007834	-1,96	8,4E-05	2,3E-03	Similar to Tubby-like F-box protein 5 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscsp Q6Z2G9 TLP5_ORYSJ)
MELO3C015631	-4,49	8,6E-05	2,3E-03	Similar to Probable inactive receptor kinase At1g10020 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q0W859 Y5020_ARATH)
MELO3C012869	-1,83	8,8E-05	2,4E-03	Similar to Undenatured protein At1g03900 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q681Q7 Y1390_ARATH)
MELO3C004410	-1,53	9,8E-05	2,6E-03	Similar to S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscsp Q9JG10 DCAM_ORYSJ)
MELO3C001012	-1,69	1,0E-04	2,7E-03	Similar to Elongation factor 1-alpha (Manihot esculenta) (uniprot_sprotscsp Q49169 EF1A_MANES)
MELO3C014114	-2,05	1,1E-04	2,8E-03	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_57, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (unire900Unire900_D7TD89)
MELO3C006271	-3,77	1,1E-04	2,9E-03	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire900Unire900_UPI00015C9355C)
MELO3C012173	-2,47	1,1E-04	2,9E-03	Similar to DNA-directed RNA polymerase 2, chloroplast/mitchondrial (Nicotiana sylvestris) (uniprot_sprotscsp Q8W1D5 S38A6_XENITR)
MELO3C008709	-2,75	1,2E-04	3,0E-03	Similar to Probable sodium-coupled neutral amino acid transporter 6 (Xenopus tropicalis) (uniprot_sprotscsp Q28HE5 S38A6_XENITR)
MELO3C011371	-1,39	1,2E-04	3,1E-03	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 5 (Phaseolus vulgaris) (uniprot_sprotscsp P48724 IF5_PHAUVU)
MELO3C019363	-1,59	1,3E-04	3,2E-03	None
MELO3C017898	-4,60	1,3E-04	3,2E-03	Similar to Ubiquitin-protein ligase, putative (Rönus communis) (unire900Unire900_B9RV30)
MELO3C015185	-4,11	1,4E-04	3,5E-03	Similar to Putative undenatured protein (Vitis vinifera) (unire900Unire900_A5C0V2)
MELO3C010731	-1,31	1,6E-04	3,8E-03	Similar to Cyclin-dependent kinase G-2 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscsp Q7XUJ4 CDKG2_ORYSJ)
MELO3C011620	-4,35	1,8E-04	4,1E-03	Similar to Nigma 1b (Sambucus nigra PE=1 SV=2) (uniprot_sprotscsp P33183 NIGB_SAMNI)
MELO3C002641	-4,09	2,1E-04	4,6E-03	Similar to Putative undenatured protein (Rönus communis) (unire900Unire900_B9S988)
MELO3C011022	-2,23	2,1E-04	4,7E-03	Similar to Extended synaptotagmin-2 (Mus musculus) (uniprot_sprotscsp Q3TZZ7 ESYT2_MOUSE)
MELO3C007086	-4,44	2,1E-04	4,7E-03	Similar to ABC transporter C family member 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q42093 AB2C_ARATH)
MELO3C026741	-3,35	2,2E-04	4,9E-03	Similar to CBL-antennary serine/threonine-protein kinase 25 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q8W1D5 CIPKP_ARATH)
MELO3C013000	-1,35	2,3E-04	5,0E-03	Similar to NADP-dependent malic enzyme, chloroplast (Flavescens pringlei) (uniprot_sprotscsp P36444 MAOC_FLAPR)
MELO3C000930	-4,37	2,3E-04	5,0E-03	Similar to Filament-like plant protein 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9SLN1 FPP7_ARATH)
MELO3C011117	-2,00	2,3E-04	5,0E-03	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_66, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (unire900Unire900_D7TWT7)
MELO3C019601	-2,16	2,4E-04	5,1E-03	Similar to Receptor-like protein kinase HSL1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9SGP2 HSL1_ARATH)
MELO3C022530	-4,01	2,4E-04	5,2E-03	Similar to CBS domain-containing protein CBSX3, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscsp Q9LEV3 CBSX3_ARATH)
MELO3C022012	-4,39	2,4E-04	5,2E-03	Similar to Putative undenatured protein (Vitis vinifera) (unire900Unire900_A5C0A8)
MELO3C004221	-2,84	2,5E-04	5,4E-03	Similar to Scnec/threonine-protein phosphatase PPI (Phaseolus vulgaris PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp P48490 PPI_PHAUVU)
MELO3C007269	-1,36	2,5E-04	5,4E-03	Similar to Auxin-repressed 12,5 kDa protein (Fragaria ananassa PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscsp Q05349 12KD_FRAAN)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C017994	-3,91	2,5E-04	5,4E-03	Similar to Coleoptile phototropism protein 1 (<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q5K5S0 NPI13_ORYS)
MELO3C007105	-1,82	2,6E-04	5,5E-03	Similar to Auxin response factor 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9ZTX8 ARIF6_ARATH)
MELO3C001944	-1,84	2,6E-04	5,5E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_B9N362)
MELO3C023076	-2,86	2,7E-04	5,6E-03	Similar to GATA transcription factor 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q81LAU9 GATA1_ARATH)
MELO3C015436	-1,58	2,8E-04	5,7E-03	Similar to Zinc finger CCH domain-containing protein 49 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q2M0G2 C3H49_ARATH)
MELO3C0008011	-4,35	2,8E-04	5,7E-03	Similar to Putative metal ion-binding protein (Fragment) (Arahis hypogaea) (uniref90:UniRef90_B4UWD1)
MELO3C0005949	-4,26	3,0E-04	6,1E-03	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_48, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_D7U821)
MELO3C0009941	-1,73	3,2E-04	6,4E-03	Similar to Potassium transporter 8 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M79 POT8_ARATH)
MELO3C011375	-3,61	3,2E-04	6,5E-03	Similar to Putative proteinase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O65351 SUBL_ARATH)
MELO3C017031	-1,58	3,3E-04	6,6E-03	Similar to HMG1/2-like protein (Glycine max PE=2SV=1) (uniprot_sprotsp P26585 HMG1_SOYBN)
MELO3C0009089	-3,73	3,4E-04	6,6E-03	Similar to Probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g49770 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9L796 Y5977_ARATH)
MELO3C0005761	-4,33	3,4E-04	6,7E-03	Similar to Auxin response factor 9 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9XED8 ARF9_ARATH)
MELO3C0005778	-4,54	3,6E-04	6,9E-03	Similar to Oligopeptide transporter 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O82485 OPT7_ARATH)
MELO3C011375	-3,97	3,7E-04	7,1E-03	Similar to Predicted protein (rosids) (uniref90:UniRef90_B9GUH4)
MELO3C0009613	-3,25	3,9E-04	7,5E-03	Similar to Putative uncharacterized protein (Ríoensis communis) (uniref90:UniRef90_B9T8G7)
MELO3C022613	-2,47	4,0E-04	7,6E-03	Similar to Delta(24)-sterol reductase (Nisum sativum) (uniprot_sprotsp P93472 DIM_PEA)
MELO3C024239	-4,53	4,1E-04	7,8E-03	Similar to Mitochondrial carnitine/acetylarnitine carrier protein CACL (Bos taurus) (uniprot_sprotsp Q08DK7 MCATL_BOVIN)
MELO3C011928	-3,99	4,2E-04	7,9E-03	Similar to Cytochrome P450 71B19 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LTM4 C71B_ARATH)
MELO3C019324	-1,65	4,3E-04	8,0E-03	Similar to 40S ribosomal protein S16 (Gossypium hirsutum) (uniprot_sprotsp P46293 RS16_GOSHI)
MELO3C016487	-1,24	4,3E-04	8,0E-03	Similar to Elongation factor 1-gamma (Prunus avium PE=2SV=1) (uniprot_sprotsp Q9FUM1 E1F1G_PRUAV)
MELO3C012701	-2,13	4,4E-04	8,2E-03	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniref90:UniRef90_P94012)
MELO3C018765	-2,00	4,4E-04	8,2E-03	Similar to Putative uncharacterized protein (Ríoensis communis) (uniref90:UniRef90_B9RW76)
MELO3C022062	-4,30	4,6E-04	8,4E-03	Similar to BZIP transcription factor (Cucumis melo subsp. melo) (uniref90:UniRef90_E5GCT0)
MELO3C025982	-2,47	4,7E-04	8,6E-03	Similar to Histidine kinase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C5U2 AHK2_ARATH)
MELO3C015496	-2,44	4,9E-04	8,9E-03	Similar to Putative uncharacterized protein (Ríoensis communis) (uniref90:UniRef90_B9RK52)
MELO3C012597	-1,28	4,9E-04	8,9E-03	Similar to DCN1-like protein 2 (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q8BEZ7 DCN12_MOUSE)
MELO3C023977	-1,60	5,0E-04	9,0E-03	Similar to Zinc finger CCH domain-containing protein 30 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P93755 C3H30_ARATH)
MELO3C007458	-2,53	5,2E-04	9,2E-03	None
MELO3C018523	-1,57	5,2E-04	9,2E-03	Similar to ADP-ribosylation factor-like protein 8A (Gallus gallus) (uniprot_sprotsp Q5ZKQ8 ARL8A_CHICK)
MELO3C0002220	-3,57	5,2E-04	9,3E-03	Similar to Probable mitochondrial diaphorase BCS1-B (Dityostelium discoideum) (uniprot_sprotsp Q54DY9 BCS1B_DICD)
MELO3C013923	-4,00	5,3E-04	9,4E-03	Similar to Homeobox-leucine zipper protein HAT4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q05466 HAT4_ARATH)
MELO3C006827	-4,06	5,9E-04	1,0E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Populus trichocarpa) (uniref90:UniRef90_A9P888)
MELO3C026898	-1,25	5,9E-04	1,0E-02	Similar to Cathepsin B (Macaca fascicularis) (uniprot_sprotsp QHR5M2 CATB_MACFA)
MELO3C007441	-2,02	6,0E-04	1,0E-02	Similar to U-box domain-containing protein 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q22193 PUB4_ARATH)
MELO3C016660	-1,80	6,1E-04	1,0E-02	Similar to Adagion protein 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C9W9 ADO3_ARATH)
MELO3C018025	-1,32	6,1E-04	1,0E-02	Similar to Tubulin alpha chain (Prunus dulcis) (uniprot_sprotsp P33629 TBA_PRUDU)
MELO3C010749	-2,15	6,2E-04	1,1E-02	Similar to Glutaredoxin-C6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8L9S3 GRXC6_ARATH)
MELO3C025810	-2,85	6,3E-04	1,1E-02	Similar to Developm entally-regulated GTP-binding protein 2 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp P55039 DRG2_HUMAN)
MELO3C007246	-2,01	6,4E-04	1,1E-02	Similar to 28 kDa heat-and acid-stable phosphoprotein, putative (Ríoensis communis) (uniref90:UniRef90_B9S940)
MELO3C008486	-3,07	6,6E-04	1,1E-02	None
MELO3C011754	-2,53	6,7E-04	1,1E-02	Similar to Transcription factor TUCP7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FMX2 TUCP7_ARATH)
MELO3C018694	-3,93	6,7E-04	1,1E-02	Similar to TPR repeat-containing thioredoxin TTL1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9MAH1 TTL1_ARATH)
MELO3C0003313	-1,19	6,8E-04	1,1E-02	Similar to Membrane steroid-binding protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9MZZ4 MSBP2_ARATH)
MELO3C010866	-2,07	6,9E-04	1,1E-02	None
MELO3C024951	-1,64	6,9E-04	1,1E-02	Similar to Cellulose synthase-like protein E6 (<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q051X6 CSL_E6_ORYS)
MELO3C012033	-2,75	7,0E-04	1,1E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_26, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90:UniRef90_D7TINK1)
MELO3C026470	-2,23	7,0E-04	1,1E-02	Similar to Putative potassium transporter 12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O80739 POT12_ARATH)
MELO3C0005250	-3,89	7,5E-04	1,2E-02	Similar to Histidine kinase 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C5U0 AHK4_ARATH)
MELO3C027420	-3,90	8,1E-04	1,3E-02	Similar to Probable serine/threonine-protein kinase NAK (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P43293 NAK_ARATH)
MELO3C011414	-3,60	8,1E-04	1,3E-02	Similar to Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q9QZ13 PPIE_MOUSE)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C025374	-1,96	8,2E-04	1,3E-02	Similar to Calcium-dependent protein kinase (Daucus carota PE=2 SV=2) (uniprot_sprotssp P28582 CDPK_DAUCA)
MELO3C0254028	-1,20	8,7E-04	1,4E-02	Similar to Eukaryotic initiation factor 4A-3 (Nicotiana glauca PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P41380 IF4A3_NICPL)
MELO3C002310	-3,74	8,7E-04	1,4E-02	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Panicum americanum) (uniprot_sprotssp P24465 C71A1_PEARAE)
MELO3C009922	-3,96	8,9E-04	1,4E-02	Similar to Chloroplast group IIa intron splicing factor (CRS1, chloroplast (Zea mays)) (uniprot_sprotssp Q9FYV6 CRS1_MAIZE)
MELO3C008244	-2,86	9,1E-04	1,4E-02	Similar to Undenacetylated protein A2g39795, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8W487 YB95_ARATH)
MELO3C007540	-2,43	9,8E-04	1,5E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_197, assembly12x (fragment) (Vitis vinifera) (unirep06 UniRef90_E0CVV9)
MELO3C017358	-2,49	9,8E-04	1,5E-02	Similar to Probable ADP-ribosylation factor C1Pass-activating protein AGD11 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8L7A4 AGD11_ARATH)
MELO3C016101	-1,32	1,0E-03	1,5E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Vitis vinifera) (unirep09 UniRef90_A5ADJ5)
MELO3C009315	-1,55	1,0E-03	1,5E-02	Similar to 40S ribosomal protein S23 (Fragaria ananassa) (uniprot_sprotssp P46297 RS23_FRAAAN)
MELO3C006904	-2,63	1,0E-03	1,6E-02	Similar to Removoin (Solanum tuberosum PE=1 SV=1) (uniprot_sprotssp P93788 REMO_SOLTU)
MELO3C020637	-3,98	1,0E-03	1,6E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Röniss communis) (unirep06 UniRef90_B9T3N6)
MELO3C026780	-1,49	1,1E-03	1,6E-02	Similar to 40S ribosomal protein S15 (Elaeis oleifera) (uniprot_sprotssp Q945U1 RS15_ELAOL)
MELO3C005680	-2,14	1,1E-03	1,6E-02	Similar to GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (A quercus aculeata) (uniprot_sprotssp Q66601 GUAAA_AQUAE)
MELO3C003197	-3,82	1,1E-03	1,6E-02	Similar to Copper transporter 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8GWP3 COPT6_ARATH)
MELO3C017807	-2,23	1,1E-03	1,6E-02	Similar to Undenacetylated protein At1g15400 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9X1Z9 Y1540_ARATH)
MELO3C006247	-3,87	1,1E-03	1,6E-02	Similar to ABC transporter C family member 9 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9MHC7 AB9C_ARATH)
MELO3C007151	-1,45	1,1E-03	1,7E-02	Similar to Transcription factor bHLH144 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ASX9 BH144_ARATH)
MELO3C023842	-3,03	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Auxin-induced protein 5NG4 (Pinus taeda PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q6J163 5NG4_PNTA)
MELO3C024699	-3,61	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Auxin-responsive protein 1AA27 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ZSY8 1AA27_ARATH)
MELO3C019791	-3,27	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Patatin group A-3 (Solanum tuberosum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q2MY58 PATA3_SOLTU)
MELO3C003482	-1,61	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Vitis vinifera) (unirep09 UniRef90_A5AE90)
MELO3C008487	-2,57	1,2E-03	1,8E-02	None
MELO3C005625	-3,26	1,3E-03	1,8E-02	Similar to Calcium-dependent protein kinase 25 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9Sj61 CDPKP_ARATH)
MELO3C014242	-2,60	1,3E-03	1,9E-02	Similar to VE15-like protein (Homo sapiens) (uniprot_sprotssp Q96CN4 EV15L_HUMAN)
MELO3C018579	-1,99	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Phloem filament protein (Cucumis melo subsp. melo) (unirep09 UniRef90_F5GCR5)
MELO3C006569	-3,10	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Röniss communis) (unirep06 UniRef90_B9RTT4)
MELO3C015995	-1,42	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2 (Vigna radiata var. radiata) (uniprot_sprotssp P32292 ARG2_VIGRR)
MELO3C012961	-3,95	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Putative undenacetylated protein (Röniss communis) (unirep06 UniRef90_B9RQQ6)
MELO3C025887	-3,25	1,4E-03	1,9E-02	None
MELO3C026279	-1,59	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Cell division cycle protein 48 homolog (Glycine max) (uniprot_sprotssp P54774 CDC48_SOYBN)
MELO3C010272	-3,48	1,4E-03	2,0E-02	Similar to Probable flavin-containing monooxygenase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LMA1 FMO1_ARATH)
MELO3C011413	-4,41	1,4E-03	2,0E-02	Similar to Cytochrome P450 78A3 (Glycine max) (uniprot_sprotssp Q48927 C78A3_SOYBN)
MELO3C001815	-2,34	1,5E-03	2,0E-02	None
MELO3C024689	-2,64	1,5E-03	2,0E-02	Similar to Probable plastidic glucose transporter 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FYG3 PLST2_ARATH)
MELO3C006372	-2,07	1,5E-03	2,0E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_49, assembly12x (fragment) (Vitis vinifera) (unirep06 UniRef90_D7SZP3)
MELO3C010742	-3,16	1,5E-03	2,0E-02	Similar to F-box protein At1g67340 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FYF9 FB76_ARATH)
MELO3C017503	-1,60	1,5E-03	2,1E-02	None
MELO3C007739	-1,93	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Senec/ threonine-protein kinase SAPK1 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q75LR7 SAPK1_ORYSJ)
MELO3C005774	-3,85	1,6E-03	2,1E-02	Similar to DoF zinc finger protein DOF4,6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8LAP8 DOF4_6_ARATH)
MELO3C016365	-4,04	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_25, assembly12x (fragment) (Vitis vinifera) (unirep06 UniRef90_D7TV38)
MELO3C020888	-3,88	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Senec/ threonine-protein kinase SRK21 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q39193 SRK21_ARATH)
MELO3C024337	-2,51	1,6E-03	2,2E-02	Similar to Transmembrane protein 87B (Mus musculus) (uniprot_sprotssp Q8BKU8 TM87B_MOUSE)
MELO3C013077	-3,75	1,7E-03	2,2E-02	Similar to PREDC1C2D: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unirep06 UniRef90_LUP100015CD778)
MELO3C015131	-3,98	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Pentatricopeptide repeat-containing protein A5g01110 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LFC5 PP360_ARATH)
MELO3C003469	-3,82	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase A2g25790 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O82318 Y2579_ARATH)
MELO3C025855	-3,45	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Dihydrodichyl diphosphate synthase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q556Y11 DDPS2_ARATH)
MELO3C025085	-3,83	1,7E-03	2,2E-02	Similar to 15,7 kDa heat shock protein, peroxisomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FHQ3 HS157_ARATH)
MELO3C013077	-1,48	1,7E-03	2,2E-02	Similar to Eukaryotic initiation factor 4A-8 (Nicotiana tabacum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P41381 IF4A8_TOBAC)
MELO3C005465	-2,11	1,7E-03	2,3E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor-ERF105 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8VY90 ERF105_ARATH)
MELO3C023033	-1,17	1,8E-03	2,3E-02	Similar to RNA-binding protein Musashi homolog 2 (Mus musculus) (uniprot_sprotssp Q920Q6 MSI2H_MOUSE)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C007235	-3,76	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Protein IQ-DOMAIN 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SFE2 IQD1_ARATH)
MELO3C005379	-1,84	1,8E-03	2,3E-02	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase XBAT33 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q4FE45 XB33_ARATH)
MELO3C002496	-2,92	1,8E-03	2,3E-02	Similar to Phytyltransferase C (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q10CQ8 PHYC_ORYSA)
MELO3C008033	-3,16	1,9E-03	2,3E-02	Similar to RING-H2 finger protein ATL78 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q6NQG7 ATL78_ARATH)
MELO3C013703	-1,86	1,9E-03	2,3E-02	Similar to Diacylglycerol O-acetyltransferase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9ASU1 DGAT2_ARATH)
MELO3C022691	-1,41	2,0E-03	2,4E-02	Similar to 40S ribosomal protein SA (Cicer arietinum) (uniprot_sprotsp Q65751 RSSA_CICAR)
MELO3C006690	-2,95	2,0E-03	2,5E-02	Similar to Probable polygalacturonase (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp A7PZL3 PGLR_VITVI)
MELO3C009736	-3,57	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Probable nitric transporter AtUlg68570 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SXZ0 PTR18_ARATH)
MELO3C016255	-2,31	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Ankyrin repeat-containing protein, putative (Ricinus communis) (uniprot_sprotsp Q910X8 B910X8)
MELO3C019883	-2,03	2,1E-03	2,5E-02	Similar to MKI67 FHA domain-intending nucleolar phosphoprotein-like (Xenopus tropicalis) (uniprot_sprotsp Q6GL69 MK67L_XENTR)
MELO3C004433	-1,73	2,1E-03	2,6E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_118, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp uniref90 D774Z4)
MELO3C003486	-3,79	2,2E-03	2,6E-02	Similar to Receptor-like protein kinase HSL1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SGP2 HSL1_ARATH)
MELO3C010966	-3,14	2,2E-03	2,6E-02	Similar to Mitogen-activated protein kinase homolog NTF3 (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp Q40517 NTF3_TOBAC)
MELO3C014733	-1,72	2,2E-03	2,6E-02	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase RING1 (Cossyptum hirsutum) (uniprot_sprotsp P0CH30 RING1_GOSHI)
MELO3C007251	-3,75	2,2E-03	2,6E-02	Similar to Auxin response factor 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O23661 ARFC_ARATH)
MELO3C016336	-3,26	2,4E-03	2,8E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_25, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp uniref90 D77V70)
MELO3C026536	-1,80	2,4E-03	2,8E-02	Similar to 1,4-alpha-glucan-branched enzymic (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotsp P30924 GLGB_SOLTU)
MELO3C013353	-2,62	2,4E-03	2,9E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 uniref90_A9P13)
MELO3C007265	-2,65	2,5E-03	3,0E-02	Similar to Protein DEHYDRATION-INDUCED 19 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q688X9 DI19_ORYS)
MELO3C008944	-1,98	2,5E-03	3,0E-02	Similar to Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4 (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotsp Q5PQN1 HERC4_RAT)
MELO3C002209	-1,85	2,6E-03	3,0E-02	Similar to Homocysteine zipper protein HAT5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q02283 HAT5_ARATH)
MELO3C026402	-3,62	2,6E-03	3,1E-02	None
MELO3C005865	-2,57	2,7E-03	3,1E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_50, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp uniref90 E0CUC7)
MELO3C014866	-2,75	2,7E-03	3,1E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_171, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp uniref90 D7UBE2)
MELO3C023351	-2,96	2,7E-03	3,1E-02	Similar to Cellulose synthase A catalytic subunit 3 [UDP-forming] (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q941L0 CESA3_ARATH)
MELO3C025026	-3,19	2,7E-03	3,1E-02	None
MELO3C026613	-1,03	2,7E-03	3,2E-02	Similar to Tubulin alpha-3 chain (Helicine indica) (uniprot_sprotsp O22349 TBA3_ELEIN)
MELO3C013710	-3,33	2,8E-03	3,3E-02	Similar to Auxinhydrolase symporter, putative (Ricinus communis) (uniprot_sprotsp uniref90 B9S6X0)
MELO3C015082	-3,71	2,8E-03	3,3E-02	Similar to Amino acid transporter, putative (Ricinus communis) (uniprot_sprotsp uniref90 B9SM54)
MELO3C027406	-1,40	2,9E-03	3,3E-02	Similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 23 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FP84 UBP23_ARATH)
MELO3C004139	-2,54	3,1E-03	3,3E-02	Similar to Phosphate transporter PHO1 homolog 9 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9JWJ0 PHO19_ARATH)
MELO3C022005	-2,54	3,1E-03	3,3E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor ERF118 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9CA27 ERF118_ARATH)
MELO3C011572	-3,78	3,2E-03	3,5E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp uniref90 LUP100019832BE)
MELO3C006509	-2,02	3,2E-03	3,6E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_90, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp uniref90 D71R37)
MELO3C013128	-2,13	3,3E-03	3,6E-02	Similar to Heavy metal-associated domain containing protein, expressed (Oryza sativa) (uniprot_sprotsp uniref90 Q8LN44)
MELO3C021183	-1,36	3,3E-03	3,6E-02	Similar to Protein kinase APK1A, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q06548 APK1A_ARATH)
MELO3C025912	-2,00	3,3E-03	3,6E-02	Similar to Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g16250 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp COLGK4 Y2165_ARATH)
MELO3C021047	-3,00	3,3E-03	3,6E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 uniref90_B9GQJ4)
MELO3C007351	-1,31	3,4E-03	3,7E-02	Similar to PREPREDICTED: putative (Ricinus communis) (uniref90 uniref90_B9RXXV5)
MELO3C015797	-1,17	3,4E-03	3,7E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90 uniref90_LUP10001983917)
MELO3C013667	-3,61	3,4E-03	3,7E-02	Similar to Ankyrin repeat-containing protein At5g2020 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q6AWW5 Y5262_ARATH)
MELO3C020060	-3,12	3,5E-03	3,8E-02	Similar to H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2-like protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LEY9 NHP2_ARATH)
MELO3C023232	-1,65	3,6E-03	3,8E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_46, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp uniref90 D7UC25)
MELO3C023878	-1,80	3,6E-03	3,8E-02	Similar to Pumilio homolog 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9ZV07 PUM1_ARATH)
MELO3C013539	-2,78	3,6E-03	3,9E-02	Similar to Y-aside-associated protein 42 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8VY22 VAP42_ARATH)
MELO3C023255	-2,92	3,7E-03	3,9E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 uniref90_B91HE17)
MELO3C010817	-1,15	3,8E-03	4,0E-02	Similar to Subtilisin-like protease (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O65353 SUB1_ARATH)
MELO3C023525	-1,60	3,8E-03	4,0E-02	Similar to 60S ribosomal protein L6 (Mesem bryanthemum crystallinum) (uniprot_sprotsp P34091 RL6_MESCR)
MELO3C006510	-3,26	3,9E-03	4,0E-02	Similar to Protein lin-54 homolog (Drosophila melanogaster) (uniprot_sprotsp A1Z9E2 LIN54_DROME)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial. (C, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	P-value	P-value ajustado	Anotación
MELO3C0004589	-1,16	3,9E-03	4,0E-02	Similar to Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q2SP35 TIM17_ARATH)
MELO3C0007749	-2,08	4,0E-03	4,2E-02	Similar to Cytochrome P450 1A1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SK82 COGT2_ARATH)
MELO3C0012171	-0,93	4,1E-03	4,2E-02	Similar to Probable phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta At1g26270 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9CG71 P4K2B_ARATH)
MELO3C0010297	-2,15	4,2E-03	4,4E-02	Similar to Bifunctional purple acid phosphatase 26 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q949Y3 PPA26_ARATH)
MELO3C002804	-1,66	4,3E-03	4,4E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Ricinus communis) (uniref00UniRef90_UPI0001983E21)
MELO3C0024375	-1,35	4,3E-03	4,4E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref00UniRef90_UPI0001983E21)
MELO3C0021272	-2,74	4,4E-03	4,5E-02	Similar to Aldehyde dehydrogenase 22A1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q0WSE1 AL22L_ARATH)
MELO3C0009523	-3,51	4,4E-03	4,5E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref00UniRef90_UPI0001983C12)
MELO3C0011233	-3,22	4,4E-03	4,5E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref00UniRef90_UPI00015C9152)
MELO3C0008214	-1,62	4,6E-03	4,6E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Ricinus communis) (uniref00UniRef90_B9RBM09)
MELO3C0004438	-1,29	4,6E-03	4,6E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref00UniRef90_B9N6Y0)
MELO3C0014113	-1,19	4,7E-03	4,7E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref00UniRef90_B9GFY6)
MELO3C0006246	-2,29	4,7E-03	4,7E-02	Similar to ABC transporter C family member 9 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q2M1C7 AB9C_ARATH)
MELO3C0024195	-3,40	4,8E-03	4,7E-02	Similar to Phytochrome C (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q10CQ8 PHYC_ORYS)
MELO3C0026612	-1,46	4,7E-03	4,7E-02	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q2FK59 IF4E3_ARATH)
MELO3C0025168	-1,19	4,8E-03	4,7E-02	Similar to 60S acidic ribosomal protein P0 (Glycine max PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P50346 RLAL_SOYBN)
MELO3C0011852	-1,43	5,0E-03	4,9E-02	Similar to Cysteine synthase, chloroplast/chromoplast (Solanum tuberosum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp O81155 CYSKP_SOLTU)
MELO3C0008134	-2,24	5,1E-03	5,0E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref00UniRef90_UPI00015C74E1F)
MELO3C0021766	-2,19	5,1E-03	5,0E-02	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniref00UniRef90_P94012)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D). Relación de genes DE entre SC3-5-1 | UNRIPE y PS | UNRIPE (contraste 4).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C0204190	4,31	2,2E-25	9,1E-22	Similar to Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q884Y1 THIC1_ARATH)
MELO3C0006931	3,98	8,9E-21	1,9E-17	Similar to Putative undetermined protein (Medicago truncatula) (unire90:UniRef90_B7F7 C9)
MELO3C0204432	3,52	2,6E-20	3,7E-17	Similar to Adenosylhomocysteinase (Petroselinum crispum) (uniprot_sprotsp Q01781 SAHHL_PETCR)
MELO3C025798	4,37	4,2E-19	4,4E-16	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pennisia americana) (uniprot_sprotsp P24465 C71A1_PERAE)
MELO3C014477	8,06	4,6E-17	3,8E-14	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 (Cucumis melo) (uniprot_sprotsp Q04644 ACCO1_CUCME)
MELO3C013347	5,53	3,6E-16	2,5E-13	Similar to Omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q94CD1 HHT1_ARATH)
MELO3C006965	4,19	7,5E-16	4,5E-13	Similar to Aquaporin PIP2-7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P93004 PIP27_ARATH)
MELO3C0013218	7,70	1,6E-15	8,3E-13	Similar to Hexamine-A (Hevea brasiliensis PE=1 SV=2) (uniprot_sprotsp P23472 CHLY_HEVBR)
MELO3C0066334	3,55	2,2E-15	9,2E-13	Similar to 3-oxoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q56WD9 THIK2_ARATH)
MELO3C015470	5,68	4,0E-15	1,5E-12	Similar to Beta-galactosidase (Malus domestica PE=1 SV=1) (uniprot_sprotsp P48981 BGAL_MALDO)
MELO3C011389	4,07	4,8E-15	1,7E-12	Similar to Probable carboxyltransferase 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q95X25 CXE6_ARATH)
MELO3C005787	7,36	4,8E-14	1,4E-11	Similar to Valacyclovir hydrolase, putative (Ricinus communis) (unire90:UniRef90_B9RY16)
MELO3C026602	4,31	4,6E-13	1,3E-10	Similar to Dual specificity protein phosphatase 12 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp Q9UNI6 DUS12_HUMAN)
MELO3C013218	3,25	1,7E-12	4,3E-10	Similar to Carban oyl-phosphate synthase large chain (Nostoc sp. (strain PCC 7120) / UTEX 2576) (uniprot_sprotsp Q8YQL2 CARB_NOSSI)
MELO3C026512	2,46	2,1E-12	4,8E-10	Similar to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 (Hevea brasiliensis) (uniprot_sprotsp P29057 HMDH1_HEVBR)
MELO3C022772	3,62	3,2E-12	7,0E-10	Similar to Nitrate reductase [NADH] (Cucurbita m axina PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P17569 NIA_CUCMA)
MELO3C003134	5,75	3,1E-11	5,6E-09	Similar to Expansin-A4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q48818 EXPA4_ARATH)
MELO3C009389	3,57	3,9E-11	6,8E-09	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pennisia americana) (uniprot_sprotsp P24465 C71A1_PERAE)
MELO3C011129	2,87	4,1E-11	6,8E-09	Similar to NADP-dependent malic enzyme (Phaseolus vulgaris) (uniprot_sprotsp P12628 MAOX_PHAVU)
MELO3C016167	2,73	5,8E-11	9,3E-09	Similar to Probable glutathione S-transferase ptaC (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp P49332 GSTXC_TOBAC)
MELO3C024326	3,97	8,6E-11	1,3E-08	Similar to Ayl carrier protein (Ricinus communis) (unire90:UniRef90_B9RR02)
MELO3C001692	2,04	1,2E-10	1,9E-08	Similar to Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump (Vigna radiata var. radiata PE=1 SV=3) (uniprot_sprotsp P21616 AVP_VIGRR)
MELO3C006254	6,32	4,2E-10	5,6E-08	Similar to Protein WAX2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8H1Z0 WAX2_ARATH)
MELO3C007012	4,74	2,6E-09	3,4E-07	Similar to Undetermined protein At5g05660 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LSK9 Y5566_ARATH)
MELO3C025110	4,65	3,8E-09	4,9E-07	Similar to Putative ayl-CoA synthetase YngI (Bacillus subtilis) (uniprot_sprotsp O31826 YNGL_BAGSU)
MELO3C015428	2,77	4,3E-09	5,3E-07	Similar to 6-phosphofruktokinase 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C571 K6P7_ARATH)
MELO3C002372	4,11	1,3E-08	1,4E-06	Similar to Metal ion binding protein, putative (Ricinus communis) (unire90:UniRef90_B9RA05)
MELO3C017023	2,93	1,5E-08	1,6E-06	Similar to Catalase isozyme 1 (Cucurbita pepo) (uniprot_sprotsp P48350 CAT1_CUCPE)
MELO3C026594	4,18	1,7E-08	1,8E-06	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase RGLG1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SS90 RGLG1_ARATH)
MELO3C009145	2,79	2,1E-08	2,1E-06	Similar to Pyruvate decarboxylase isozyme 2 (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp P51846 PDC2_TOBAC)
MELO3C022176	3,76	4,0E-08	3,6E-06	Similar to Non-lysosomal glucosylceramidase (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q69Z13 GBA2_MOUSE)
MELO3C004833	5,68	4,4E-08	3,8E-06	Similar to Undetermined UDP-glucosyltransferase At1g5675 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P0C777 Y1567_ARATH)
MELO3C002839	5,70	8,2E-08	6,9E-06	Similar to Retinoline oxidase-like protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SVG4 RETOL_ARATH)
MELO3C003441	5,22	1,2E-07	1,0E-05	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38908 XTH30_ARATH)
MELO3C005834	2,37	1,5E-07	1,1E-05	Similar to Sacrose-like protein 8 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FYR7 SCL8_ARATH)
MELO3C012324	2,28	1,7E-07	1,3E-05	Similar to AT15g16010/FIN13_150 (Arabidopsis) (unire90:UniRef90_Q9LFS3)
MELO3C009090	5,26	2,6E-07	1,8E-05	Similar to Peptide transporter PTR1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M890 PTR1_ARATH)
MELO3C007423	2,81	3,7E-07	2,5E-05	Similar to Chrom oplast-specific carotenoid-associated protein, chromoplast (Cucumis sativus) (uniprot_sprotsp Q96398 CHRC_CUCSA)
MELO3C010781	2,48	4,6E-07	3,1E-05	Similar to Squalene monooxygenase (Panax ginseng PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp O48651 ERG1_PANGI)
MELO3C005510	2,93	4,9E-07	3,2E-05	Similar to Probable ribose-5-phosphate isomerase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9ZU38 RPIA_ARATH)
MELO3C007724	2,74	5,1E-07	3,3E-05	Similar to REDUCTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire90:UniRef90_UPI00019862C2)
MELO3C018413	2,55	7,2E-07	4,3E-05	Similar to Allene oxide synthase, chloroplastic (Linum usitatissimum) (uniprot_sprotsp P48417 CPT4_LINUS)
MELO3C0118816	2,19	7,2E-07	4,3E-05	Similar to Acetate hydratase, cytoplasmic (Cucurbita maxima PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P49668 ACCOC_CUCMA)
MELO3C009355	1,96	9,9E-07	5,7E-05	Similar to Putative farnesylated protein (Arabidopsis) (unire90:UniRef90_Q9SJL2)
MELO3C005445	2,94	1,5E-06	8,2E-05	Similar to Putative undetermined protein (Ricinus communis) (unire90:UniRef90_B9RA10)
MELO3C016540	1,57	1,5E-06	8,2E-05	Similar to NAC domain-containing protein 18 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9ZNU2 NAC18_ARATH)
MELO3C026436	2,58	1,5E-06	8,2E-05	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q84MB3 ACC11_ARATH)
MELO3C014897	2,17	1,7E-06	8,9E-05	Similar to Putative alcohol dehydrogenase (Cucumis melo) (unire90:UniRef90_Q2PZ44)
MELO3C004075	2,32	1,7E-06	9,2E-05	Similar to Xylose isomerase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FKK7 XYLA_ARATH)
MELO3C005245	1,89	2,0E-06	1,0E-04	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 28 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q38909 XTH28_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C012479	3,84	2,3E-06	1,1E-04	None
MELO3C018967	5,20	2,3E-06	1,1E-04	Similar to Protein TRANSPARENT TESTA 12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9LYT3 TT12_ARATH)
MELO3C023514	4,95	2,2E-06	1,1E-04	Similar to Homocysteine zipper protein HAT14 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P46665 HAT14_ARATH)
MELO3C025876	2,41	2,7E-06	1,3E-04	Similar to Alpha-glucan phosphorylase, H isozyme (Solanum tuberosum) PE=1 SV=1 (uniprot_sprotscp P32811 PHSH_SOLTU)
MELO3C016536	2,75	3,4E-06	1,6E-04	Similar to NAC domain-containing protein 72 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q93VY3 NAC72_ARATH)
MELO3C007723	2,65	6,2E-06	2,7E-04	Similar to Probable mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Dierystelidium discoideum) (uniprot_sprotscp Q544P7 M2OML_DICDI)
MELO3C015130	4,10	6,3E-06	2,7E-04	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C016787	4,34	6,5E-06	2,7E-04	Similar to Probable isophthaloyl-L-asparaginase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q8GXG1 ASPG2_ARATH)
MELO3C017632	2,90	6,6E-06	2,7E-04	Similar to Peptide methionine sulfoxide reductase (Lactuca sativa PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp Q98EC2 MSRA_LACSA)
MELO3C000985	2,28	8,3E-06	3,3E-04	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C003696	1,82	8,3E-06	3,3E-04	Similar to EIN3-binding F-box protein 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9SKK0 EBF1_ARATH)
MELO3C015310	2,12	9,6E-06	3,8E-04	Similar to REF/SRPP-like protein A3g9/5500 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q2MA63 Y3550_ARATH)
MELO3C020749	3,37	9,6E-06	3,8E-04	Similar to Amidophosphoribosyltransferase, chloroplastic (Glycine max) (uniprot_sprotscp P52418 PURL_SOYBN)
MELO3C022701	2,93	1,1E-05	4,3E-04	Similar to Cysteine proteinase RD19a (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp P43296 RD19A_ARATH)
MELO3C010982	2,33	1,3E-05	5,0E-04	Similar to B2 protein (Daucus carota PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp P37707 B2_DAUCA)
MELO3C016273	1,61	1,3E-05	5,0E-04	Similar to Bifunctional sugar transporter SWEE13b (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscp Q20228 HSP7S_PEA)
MELO3C005869	4,73	1,5E-05	5,3E-04	Similar to Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (Pisum sativum) (uniprot_sprotscp Q02028 HSP7S_PEA)
MELO3C020341	2,08	1,6E-05	5,9E-04	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 4G (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q76E23 H4G1_ARATH)
MELO3C004455	3,91	2,1E-05	7,3E-04	Similar to Blue copper protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q07488 BCBL_ARATH)
MELO3C006493	2,24	2,2E-05	7,4E-04	Similar to Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase (Urechis caupo PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp Q27128 PAPSS_URECA)
MELO3C006405	3,62	2,6E-05	8,6E-04	Similar to Long-chain-alcohol oxidase FAO1 (Lotus japonicus) (uniprot_sprotscp B5WVZ8 FAO1_LOTJA)
MELO3C004550	3,39	2,8E-05	9,1E-04	Similar to Leucine-rich repeat extensin-like protein 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9LHF1 LRX4_ARATH)
MELO3C011710	2,52	2,8E-05	9,2E-04	Similar to Putative undanchacterized protein (Vitis vinifera) (unire90 UniRef90_A5.AF28)
MELO3C021116	1,76	2,9E-05	9,4E-04	Similar to Fatty acid desaturase 3 (Bos taurus) (uniprot_sprotscp A4IFP3 FADS3_BOVIN)
MELO3C002442	1,51	3,0E-05	9,4E-04	Similar to Aspartic proteinase (Cuacubita pepo PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp O04057 ASPR_CUCPE)
MELO3C004454	2,76	3,0E-05	9,4E-04	Similar to Blue copper protein (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q07488 BCBL_ARATH)
MELO3C015186	1,66	3,3E-05	1,0E-03	Similar to Sulfite reductase (ferredoxin) (Synchocystis sp. strain ATCC 27184 / PCC 6803 / N-1) (uniprot_sprotscp P72854 SIR_SYNY3)
MELO3C016301	2,56	3,7E-05	1,1E-03	Similar to Dynamine-related protein 5A (Glycine max PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp Q39828 SDL5A_SOYBN)
MELO3C005084	2,82	4,0E-05	1,2E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90 UniRef90_B9HG84)
MELO3C002943	4,34	4,3E-05	1,3E-03	Similar to Lupool synthase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q8RWT0 LUP2_ARATH)
MELO3C011972	2,02	5,2E-05	1,5E-03	Similar to Alpha-glucan water dikinase, chloroplastic (Citrus reticulata) (uniprot_sprotscp Q8LPT9 GWD1_CITRE)
MELO3C003331	2,58	5,9E-05	1,7E-03	Similar to Bax inhibitor 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9LD45 BI1_ARATH)
MELO3C013621	2,64	6,2E-05	1,8E-03	Similar to Callose synthase 12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9ZT82 CALSC_ARATH)
MELO3C013250	2,15	6,4E-05	1,8E-03	Similar to Proton-coupled amino acid transporter 1 (Homo sapiens) (uniprot_sprotscp Q7Z218 S36A1_HUMAN)
MELO3C009759	2,05	7,5E-05	2,0E-03	Similar to PRA1 family protein B4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp O89015 PRIB4_ARATH)
MELO3C014965	2,12	7,1E-05	2,0E-03	Similar to Probable glutathione S-transferase (Nicotiana tabacum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotscp Q08662 GSTX1_TOBAC)
MELO3C006355	4,14	7,5E-05	2,0E-03	Similar to Probable 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, chloroplastic (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscp O22567 DXX_ORYSJ)
MELO3C0102599	3,45	7,6E-05	2,1E-03	Similar to Catalytic putative (Ricinus communis) (unire90 UniRef90_B9S US)
MELO3C019267	3,45	8,3E-05	2,3E-03	Similar to Probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q84VX0 RFS1_ARATH)
MELO3C007590	4,26	1,1E-04	2,9E-03	Similar to Isoflavone 2'-hydroxylase (Glycyrrhiza echinata) (uniprot_sprotscp P93147 C8E1_GLYEC)
MELO3C018347	4,32	1,2E-04	3,0E-03	Similar to Probable 3-beta-hydroxysteroid-Delta(6),Delta(7)-isomerase (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotscp Q9FTZ2 EBP_ORYSJ)
MELO3C012256	4,27	1,2E-04	3,1E-03	None
MELO3C011402	4,26	1,3E-04	3,3E-03	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire90 UniRef90_UPI00019828FC)
MELO3C011868	2,00	1,3E-04	3,3E-03	Similar to D-aminooacyl-tRNA deacylase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9ZPQ3 GEK1_ARATH)
MELO3C010461	2,53	1,3E-04	3,3E-03	Similar to REF/SRPP-like protein At1g67360 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9FYI7 Y1736_ARATH)
MELO3C017965	4,38	1,5E-04	3,6E-03	Similar to Aminotransferase Ybd1 (Escherichia coli (strain K12)) (uniprot_sprotscp P77806 YBD1_ECOLI)
MELO3C012291	2,49	1,5E-04	3,6E-03	Similar to ABC transporter C family member 14 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q9LZJ5 AB14C_ARATH)
				Similar to MATE efflux family protein 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotscp Q8GXM8 MATE7_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MEL03C014689	2,68	1,5E-04	3,6E-03	Similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q84WU2 UBP13_ARATH)
MEL03C0005355	3,82	1,6E-04	3,7E-03	Similar to Clavaminate synthase-like protein At3g21360 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LJG0 Y3136_ARATH)
MEL03C0009663	2,77	1,6E-04	3,7E-03	Similar to 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (Brassica napus) (uniprot_sprotsp Q2XHW4 1PDT2_BRANA)
MEL03C0002020	1,87	1,7E-04	3,8E-03	Similar to Heat shock protein 101 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42730 HS101_ARATH)
MEL03C0005267	1,83	1,7E-04	3,9E-03	Similar to Probable receptor protein kinase TMK1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P43228 TMK1_ARATH)
MEL03C0024959	4,38	1,7E-04	3,9E-03	Similar to Oligopeptide transporter 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9JG72 OPT1_ARATH)
MEL03C0007140	4,39	1,8E-04	4,0E-03	Similar to Probable cytochrome P450 52A1 (Dactyloctenium aegyptium) (uniprot_sprotsp P49042 YPE_RICCO)
MEL03C0005674	1,65	1,9E-04	4,0E-03	Similar to Y-acarboxylating enzyme (Ricinus communis PE=1 SV=1) (uniprot_sprotsp Q9JFNP AGCT_ARATH)
MEL03C0206224	4,19	1,9E-04	4,1E-03	Similar to Long chain acyl-CoA synthetase 7, peroxisomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LKS5 LAGS7_ARATH)
MEL03C0006545	2,63	2,1E-04	4,4E-03	Similar to Arginine ornithinyltransferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9MB94 ACCO_PRUMU)
MEL03C0019733	2,81	2,2E-04	4,6E-03	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (Peanum mume) (uniprot_sprotsp Q00257 1A12_CUCMA)
MEL03C0010779	4,50	2,3E-04	4,6E-03	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase CMA101 (Cucurbita maxima) (uniprot_sprotsp Q00257 1A12_CUCMA)
MEL03C010779	4,50	2,3E-04	4,6E-03	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9STR4 1A17_ARATH)
MEL03C016224	2,73	2,3E-04	4,7E-03	Similar to Probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O89675 CCD4_ARATH)
MEL03C020688	4,27	2,3E-04	4,7E-03	Similar to 12S kDa kinesin-related protein (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp Q23826 K125_TOBAC)
MEL03C0007702	4,26	2,6E-04	5,1E-03	Similar to Probable mannitol dehydrogenase (Fragaria ananassa) (uniprot_sprotsp Q9ZRF1 MTDH_FRAAN)
MEL03C0018469	4,12	2,6E-04	5,1E-03	Similar to UDP-glucosyltransferase UGT73B1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8VZE9 UG731_ARATH)
MEL03C024461	1,38	2,8E-04	5,3E-03	Similar to Cell division cycle protein 48 homolog (Glycine max) (uniprot_sprotsp P54774 CDC48_SOYBN)
MEL03C0008875	1,89	2,8E-04	5,4E-03	Similar to Putative undenatured protein (Ricinus communis) (uniprot_sprotsp unire906 Unire90_B9SY96)
MEL03C018456	2,34	2,8E-04	5,4E-03	Similar to Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LDD8 MCCB_ARATH)
MEL03C0005616	3,89	2,9E-04	5,5E-03	Similar to Putative undenatured protein (Ricinus communis) (unire906 Unire90_B9RBZ6)
MEL03C0005666	1,48	2,9E-04	5,5E-03	Similar to Probable peroxisome biogenesis factor 6, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O48646 GPX6_ARATH)
MEL03C017953	3,66	3,3E-04	6,0E-03	Similar to Sodium/calcium exchanger 3 (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotsp P70549 NAC3_RAT)
MEL03C022138	1,45	3,4E-04	6,1E-03	Similar to Probable nucleoside 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q80763 NRX1_ARATH)
MEL03C020745	2,58	3,4E-04	6,2E-03	Similar to Putative undenatured protein (Cucumis melo subsp. melo) (unire906 Unire90_E5G02)
MEL03C0007942	1,28	3,5E-04	6,4E-03	Similar to Anionite hydratase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q82560 ACOI_ARATH)
MEL03C015538	4,20	3,6E-04	6,5E-03	Similar to Putative undenatured protein (Fragaria vesca) (Cucumis sativus) (unire906 Unire90_Q8VWX4)
MEL03C019895	1,94	3,7E-04	6,6E-03	Similar to Ferredoxin-3, chloroplastic (Zea mays) (uniprot_sprotsp P27788 FER3_MAZE)
MEL03C024994	1,35	3,8E-04	6,8E-03	Similar to 40S ribosomal protein S4 (Cicer arietinum) (uniprot_sprotsp Q65751 RSSA_CICAR)
MEL03C011028	2,09	4,0E-04	6,9E-03	Similar to Probable polygalacturonase non-enzymatic subunit JP650 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P92290 JP650_ARATH)
MEL03C010662	1,81	4,1E-04	7,1E-03	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase UPL1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8GY23 UPL1_ARATH)
MEL03C011072	1,36	4,1E-04	7,1E-03	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase AIP2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8RXD3 AIP2_ARATH)
MEL03C027057	4,07	4,2E-04	7,2E-03	Similar to 9-oxo-sphoxycarotenoid dioxygenase NCED1, chloroplastic (Phaseolus vulgaris) (uniprot_sprotsp Q9M6E8 NCED1_PHAUU)
MEL03C016933	2,21	4,3E-04	7,4E-03	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase AIP2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8RXD3 AIP2_ARATH)
MEL03C014795	3,69	4,4E-04	7,4E-03	Similar to Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain (Nicotiana tabacum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P49730 RIR2_TOBAC)
MEL03C0006782	1,95	4,6E-04	7,7E-03	Similar to Protein transport protein SEC23 (Ustilago maydis) (uniprot_sprotsp Q4PE39 SEC23_USTMA)
MEL03C010263	4,04	4,6E-04	7,7E-03	Similar to Serine/threonine-protein kinase CTR1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q15669 CTRL_ARATH)
MEL03C021154	3,98	4,6E-04	7,7E-03	Similar to Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LR44 IABG1_ARATH)
MEL03C022162	3,85	4,7E-04	7,8E-03	Similar to Mannan endo-1,4-beta-mannosidase 5 (Solanum lycopersicum) (uniprot_sprotsp Q6YM50 MAN5_SOLLG)
MEL03C022336	2,38	4,7E-04	7,8E-03	Similar to Putative undenatured protein (Ricinus communis) (unire906 Unire90_B9RMA3)
MEL03C018098	2,34	4,8E-04	7,9E-03	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 (Homo sapiens) (unire906 Unire90_B9RMA3)
MEL03C024230	1,50	4,8E-04	7,9E-03	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp P51110 DFRA_VITVI)
MEL03C0101888	1,68	5,4E-04	8,8E-03	Similar to 97 kDa heat shock protein (Strongylocentrotus franciscanus) (uniprot_sprotsp Q94738 HSP97_STRFN)
MEL03C022536	1,49	5,4E-04	8,8E-03	Similar to Dihydroflavonol-4-reductase (Vitis vinifera) (uniprot_sprotsp Q571487 UBR4_HUMAN)
MEL03C018045	1,40	5,5E-04	8,9E-03	Similar to Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial (Phaseolus vulgaris PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp Q101899 HSP70M_PHAUU)
MEL03C023355	1,94	5,6E-04	8,9E-03	Similar to Carotenoid 9,10(9',10')-dehydrogenase 1 (Pisum sativum) (uniprot_sprotsp Q8LPT7 CCD1_PEA)
MEL03C025768	2,34	5,7E-04	9,0E-03	Similar to F-box/kelch-repeat protein At5g60570 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FKJ0 FKJ132_ARATH)
MEL03C016068	1,40	5,8E-04	9,1E-03	Similar to UDP-glucose 6-dehydrogenase (Glycine max PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp Q96538 UGDH_SOYBN)
MEL03C0005637	1,87	6,2E-04	9,6E-03	Similar to Rhomboid family member 1 (Danio rerio) (uniprot_sprotsp Q6GMP8 RHDF1_DANRE)
MEL03C023424	1,57	6,4E-04	9,8E-03	Similar to Cucurbit cupredoxin (Cucumis sativus PE=1 SV=3) (uniprot_sprotsp P22602 CPC_CUCSA)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C013904	1,98	6,5E-04	9,9E-03	Similar to GATA transcription factor 26 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8W4H1 GAT26_ARATH)
MELO3C019001	3,89	7,4E-04	1,1E-02	Similar to Alpha-glucosidase yHq (Escherichia coli (strain K12)) (uniprot_sprotssp P32138 YHq_COLL)
MELO3C013682	3,61	7,8E-04	1,1E-02	Similar to Histone H2A.1 (Solanum lycopersicum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P25469 H2A1_SOJLGC)
MELO3C007372	1,26	8,1E-04	1,2E-02	Similar to Polyubiquitin (Fragment) (Nicotiana glauca) (uniprot_sprotssp PWC884 UB14P_NIGSY)
MELO3C020610	2,57	8,4E-04	1,2E-02	Similar to Protein YOC75-3, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9STE8 YOC75_ARATH)
MELO3C012055	1,34	8,8E-04	1,3E-02	Similar to Nitrate transporter 1.7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8R877 PTR21_ARATH)
MELO3C011234	1,71	9,4E-04	1,3E-02	Similar to GTP-binding nuclear protein Ran-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8H156 RAN3_ARATH)
MELO3C021648	1,10	9,8E-04	1,4E-02	Similar to Heat shock cognate 70 kDa protein (Petunia hybrida) (uniprot_sprotssp P09189 HSP70_PETHY)
MELO3C023476	1,45	1,0E-03	1,4E-02	Similar to 26S protease regulatory subunit 7 (Prunus persica) (uniprot_sprotssp O64982 PRS7_PRUPE)
MELO3C006144	2,13	1,1E-03	1,5E-02	Similar to Probable methyltransferase PMT15 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ZPH9 PMT15_ARATH)
MELO3C021281	2,81	1,1E-03	1,5E-02	Similar to Beta-D-xylosidase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FGY1 BXL1_ARATH)
MELO3C018948	1,69	1,1E-03	1,6E-02	Similar to Alpha-1,4 glucan phosphorylase L-1 isozyme, chloroplastic/amyloplastic (Solanum tuberosum PE=1 SV=2) (uniprot_sprotssp P04045 PHSL1_SOLTU)
MELO3C009168	1,92	1,2E-03	1,6E-02	Similar to Probable pyridoxal biosynthesis protein PDX1 (Hevea brasiliensis) (uniprot_sprotssp Q35963 PDX1_HEVBR)
MELO3C022966	1,40	1,2E-03	1,6E-02	Similar to Limonoid UDP-glucosyltransferase (Citrus unshiu PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q9MB73 LGT_CITUN)
MELO3C017998	3,65	1,2E-03	1,7E-02	Similar to Bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SIE1 PAT_ARATH)
MELO3C021265	1,83	1,4E-03	1,8E-02	Similar to WD repeat-containing protein 26 (Xenopus tropicalis) (uniprot_sprotssp Q281D01 WDR26_XENTR)
MELO3C002628	2,32	1,4E-03	1,9E-02	Similar to NAC domain-containing protein 8 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q6NQK2 NAC8_ARATH)
MELO3C027408	3,63	1,5E-03	2,0E-02	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp P48979 PGLR_PRUPE)
MELO3C005577	1,22	1,6E-03	2,0E-02	Similar to Primary amine oxidase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q8H1H9 AMO_ARATH)
MELO3C010480	2,20	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Small glutamine-rich tetrapeptide repeat-containing protein beta (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotssp Q80W98 SGTB_RAT)
MELO3C018561	3,55	1,6E-03	2,1E-02	None
MELO3C026514	2,29	1,7E-03	2,1E-02	Similar to RNA-binding protein 24 (Homo sapiens) (uniprot_sprotssp Q9BX46 RBM24_HUMAN)
MELO3C003360	3,04	1,8E-03	2,2E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniprot_sprotssp Unire90 Unire90_UPI0001982CBB)
MELO3C026908	2,89	1,8E-03	2,2E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90 Unire90_B9N859)
MELO3C018242	3,67	1,9E-03	2,3E-02	Similar to NAC domain-containing protein 72 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q93VY3 NAC72_ARATH)
MELO3C018490	3,60	1,9E-03	2,3E-02	Similar to Limonoid UDP-glucosyltransferase (Citrus unshiu PE=2 SV=1) (uniprot_sprotssp Q9MB73 LGT_CITUN)
MELO3C016513	2,68	1,9E-03	2,4E-02	Similar to Metallothionein-like protein type 3 (Cucumis) (unire90 Unire90_D2J080)
MELO3C009929	1,75	2,0E-03	2,4E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Vitis vinifera) (unire90 Unire90_A5AGR1)
MELO3C016166	2,75	2,0E-03	2,4E-02	Similar to Probable glutathione S-transferase ptaC (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotssp P49332 GSTXC_TOBAC)
MELO3C010934	1,93	2,0E-03	2,4E-02	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire90 Unire90_UPI0001985313)
MELO3C014763	1,66	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Potassium transporter 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LD18 POT4_ARATH)
MELO3C000113	3,01	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pennisetum americanum) (uniprot_sprotssp P24465 C71A1_PERAPE)
MELO3C013437	1,29	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Vacuolar proton translocating ATPase 100 kDa subunit (Dioscorea alata) (uniprot_sprotssp Q54E04 VATM_DICDD)
MELO3C014870	2,55	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rattus norvegicus) (unire90 Unire90_B9R8K4)
MELO3C016106	1,74	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Uncharacterized protein At3g15000, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LKA5 UMP1_ARATH)
MELO3C026283	1,94	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Protein MODIFIER OF SMC1 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SB65 MOS1_ARATH)
MELO3C008482	3,53	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LV03 GLUT1_ARATH)
MELO3C007994	1,44	2,2E-03	2,5E-02	Similar to 6-phosphofruktokinase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9PHK0 K6PF2_ARATH)
MELO3C004702	3,11	2,2E-03	2,5E-02	Similar to Probable calcium-binding protein CML48 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ZQH1 CML48_ARATH)
MELO3C010162	3,56	2,2E-03	2,5E-02	Similar to L-allo-threonine aldolase (Aeromonas jandaei) (uniprot_sprotssp Q07051 LTAA_AERJA)
MELO3C019722	2,09	2,3E-03	2,6E-02	Similar to Protein disulfide-isomerase like 2.2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9MAU6 PDI22_ARATH)
MELO3C003347	3,50	2,3E-03	2,6E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_12, assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (unire90 Unire90_D7TJ15)
MELO3C006935	1,33	2,3E-03	2,7E-02	Similar to Heat shock protein 83 (Ipomoea nil) (uniprot_sprotssp P51819 HSP83_IPONI)
MELO3C013732	2,50	2,5E-03	2,8E-02	Similar to Phosphoserine aminotransferase, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q96255 SERC_ARATH)
MELO3C006455	3,19	2,5E-03	2,8E-02	Similar to Cellulose synthase-like protein G1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q57087 CSLG1_ARATH)
MELO3C010479	1,83	2,5E-03	2,8E-02	Similar to Long chain acyl-CoA synthetase 9, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9CAF8 LACS9_ARATH)
MELO3C010707	3,13	2,5E-03	2,8E-02	Similar to ALB1N3-like protein 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FYL3 ALB1N3_ARATH)
MELO3C003577	1,84	2,6E-03	2,8E-02	Similar to Aspartate aminotransferase, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp P46644 AAT3_ARATH)
MELO3C023196	1,65	2,6E-03	2,9E-02	Similar to Neutral alpha-glucosidase AB (Dioscorea alata) (uniprot_sprotssp Q94502 GANAB_DICDD)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MEL03C0002175	3,02	2,9E-03	2,9E-02	Similar to Miraculin (Richardella dulcifica PE=1 SV=3) (uniprot_sprotsp P13087 MIRA_RICDU)
MEL03C0017382	2,64	2,6E-03	2,9E-02	Similar to lysosomal beta glucosidase (Dactyosodium discoideum) (uniprot_sprotsp Q22892 GLUA_DICDD)
MEL03C0004398	1,81	2,8E-03	3,0E-02	Similar to Poly(R)-binding protein, putative (Ricinus communis) (unire906 Unire906_B9S7H6)
MEL03C0021992	3,05	2,8E-03	3,0E-02	Similar to PRELECTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire906 Unire906_UPI0001984C33)
MEL03C0014522	1,51	2,8E-03	3,0E-02	Similar to Serine/threonine-protein phosphatase BSL2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q95JF0 BSL2_ARATH)
MEL03C0013330	2,71	2,8E-03	3,1E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Glycine max) (unire906 Unire906_CGT4F8)
MEL03C0019832	3,05	3,0E-03	3,2E-02	Similar to Uncharacterized protein yef45 (Pophyra purpurea) (uniprot_sprotsp P51281 YCF45_PORPU)
MEL03C0002023	2,21	3,0E-03	3,2E-02	Similar to Activating signal co-receptor 1 complex subunit 3 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp Q8N3C0 HELCL1_HUMAN)
MEL03C0004584	1,94	3,0E-03	3,2E-02	Similar to UPI0676 protein C1494.01 (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotsp Q7LJ04 YQK1_SCHPO)
MEL03C0016630	2,87	3,0E-03	3,2E-02	Similar to Cytochrome c (Vigna radiata var. radiata PE=1 SV=1) (uniprot_sprotsp P00052 CYC_VIGRR)
MEL03C0018868	1,48	3,0E-03	3,2E-02	Similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2.1A (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SIV2 RPN1A_ARATH)
MEL03C0016890	1,72	3,0E-03	3,2E-02	Similar to Putroonyl-sensitive aminopeptidase (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q1H011 PSA_MOUSE)
MEL03C0012474	2,93	3,1E-03	3,2E-02	Similar to Transcription factor, putative (Ricinus communis) (unire906 Unire906_B9SY29)
MEL03C0024716	2,50	3,2E-03	3,3E-02	Similar to Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp P52948 NUP98_HUMAN)
MEL03C0021318	1,60	3,3E-03	3,4E-02	Similar to Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-a (Cucumis sativus PE=1 SV=1) (uniprot_sprotsp Q39659 MFPA_CUCSA)
MEL03C0020509	2,43	3,5E-03	3,6E-02	Similar to PRELECTED: hypothetical protein isoform 1 (Vitis vinifera) (unire906 Unire906_UPI00019835D3)
MEL03C0020535	3,00	3,5E-03	3,6E-02	Similar to Mitogen-activated protein kinase kinase ANPI (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q22040 ANPI_ARATH)
MEL03C0024272	1,87	3,6E-03	3,7E-02	Similar to Pyrophosphate-energized membrane proton pump 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q91WR2 AVPX_ARATH)
MEL03C0004275	1,44	3,7E-03	3,7E-02	Similar to Probable xyloglucan glycosyltransferase 12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q91WTC8)
MEL03C0016842	2,46	3,7E-03	3,7E-02	Similar to Nucleolar GTPase (Cucumis melo subsp. melo) (unire906 Unire906_A6YTC8)
MEL03C0013803	2,02	3,8E-03	3,8E-02	Similar to 3-hydroxyisobutyl-CoA hydrolase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LKS1 HIBCL_ARATH)
MEL03C0021901	3,42	3,9E-03	3,9E-02	Similar to Probable carboxylesterase 12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q98MN0 CXE12_ARATH)
MEL03C0014675	1,86	3,9E-03	3,9E-02	Similar to DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 37 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q84W89 RH137_ARATH)
MEL03C0023150	1,40	3,9E-03	3,9E-02	Similar to Guanylate kinase (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q64520 KGUA_MOUSE)
MEL03C0008306	0,97	4,0E-03	3,9E-02	Similar to Chathrin heavy chain 1 (Bos taurus) (uniprot_sprotsp P94951 CLHL_BOVIN)
MEL03C0013684	1,21	4,0E-03	3,9E-02	Similar to Probable histone H2B.1 (Medicago truncatula PE=3 SV=3) (uniprot_sprotsp Q1S919 H2B1_MEDTR)
MEL03C0013774	1,55	4,0E-03	3,9E-02	Similar to Methionine gamma-lyase (Pseudomonas putida) (uniprot_sprotsp P13254 MEGL_PSEPU)
MEL03C0003950	1,69	4,1E-03	4,0E-02	Similar to Calcium-transporting ATPase 10, plasma membrane-type (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9SZR1 ACA10_ARATH)
MEL03C0011063	1,75	4,2E-03	4,1E-02	Similar to GLA BRKA 2 expression modulator (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q888F8 GEM_ARATH)
MEL03C0023067	3,16	4,3E-03	4,1E-02	Similar to Beta-amylase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LJRG BAML_ARATH)
MEL03C0018139	3,35	4,7E-03	4,4E-02	Similar to Probable leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g15730 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LJV3 Y5157_ARATH)
MEL03C0017003	1,68	4,7E-03	4,4E-02	Similar to Prolyl endopeptidase (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q9QUR6 PPCE_MOUSE)
MEL03C0006601	1,48	4,8E-03	4,5E-02	Similar to Chromatin structure-remodeling complex subunit smZ1 (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotsp Q9UTNG SNF2L_SCHPO)
MEL03C0002722	3,29	4,8E-03	4,5E-02	Similar to 3-oxoacyl-acyl-carrier-protein synthase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P52410 KASCL_ARATH)
MEL03C0002149	1,60	4,9E-03	4,6E-02	Similar to Uncharacterized protein ysaA (Escherichia coli (strain K12)) (uniprot_sprotsp P25889 YEA_ECOLI)
MEL03C0008100	1,73	5,0E-03	4,6E-02	Similar to Probable carboxylesterase 18 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LJ10 CXE18_ARATH)
MEL03C0010470	2,92	5,0E-03	4,6E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_1.assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (unire906 Unire906_E0CR86)
MEL03C0010739	1,04	5,0E-03	4,6E-02	Similar to Aspl-acyl-carrier-protein desaturase, chloroplastic (Cucumis sativus PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P32061 STAD_CUCSA)
MEL03C0020357	1,83	5,0E-03	4,6E-02	Similar to Sucrose-phosphate synthase 2 (Craterostigma plantagineum) (uniprot_sprotsp Q04933 SPS2_CRAPI)
MEL03C0024225	2,65	5,0E-03	4,6E-02	Similar to Coatomer subunit beta-2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C827 COB2_ARATH)
MEL03C0006936	2,15	5,1E-03	4,7E-02	Similar to Glutaminyl-peptide cyclotransferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q84WV9 QPCT_ARATH)
MEL03C0012492	2,70	5,2E-03	4,7E-02	Similar to Glutathione S-transferase PARB (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp P30109 GSTF1_TOBAC)
MEL03C0006460	1,46	5,3E-03	4,8E-02	Similar to MA1H domain-containing protein At5g43560 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8RY18 Y5456_ARATH)
MEL03C0003104	1,73	5,3E-03	4,8E-02	Similar to Eukaryotic peptide chain release factor subunit L-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P35614 ERFIZ_ARATH)
MEL03C0005383	1,40	5,3E-03	4,9E-02	Similar to Putative glycerol-3-phosphate transporter 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C5L3 GLPT1_ARATH)
MEL03C0004108	2,26	5,4E-03	4,9E-02	Similar to Tetrahydropeptide repeat protein 1 (Homo sapiens) (uniprot_sprotsp Q99614 TTC1_HUMAN)
MEL03C0021300	1,74	5,6E-03	5,0E-02	Similar to Probable protein phosphatase 2C.73 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q0WRB2 P2C73_ARATH)
MEL03C0024766	2,87	5,6E-03	5,0E-02	Similar to Omega-hydroxyphenylacetate O-feruloyl transferase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q94CD1 HHT1_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C012667	1,86	5,6E-03	5,0E-02	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotosp P56286 IF2A_SCHIPO)
MELO3C015995	-3,44	1,8E-15	8,6E-13	Similar to Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2 (Vigna radiata var. radiata) (uniprot_sprotosp P32292 ARG2_VIGRR)
MELO3C016232	-4,91	2,6E-14	8,3E-12	Similar to Root phototropism protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q68250 RPT2_ARATH)
MELO3C002874	-3,34	1,4E-12	3,7E-10	Similar to Protein PHLOEM PROTEIN 2-LIKE A1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp O81865 P2A01_ARATH)
MELO3C002457	-4,15	8,3E-12	1,7E-09	Similar to Peroxidase 42 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9S881 PER42_ARATH)
MELO3C012701	-3,26	1,1E-11	2,1E-09	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniprot_sprotosp P94012)
MELO3C018579	-3,31	3,1E-11	5,6E-09	Similar to Phloem filament protein (Cucumis melo subsp. melo) (uniprot_sprotosp F5GCR5)
MELO3C010774	-4,95	2,4E-10	3,3E-08	Similar to Zinc finger CCHC domain-containing protein 49 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9M0G2 C3H49_ARATH)
MELO3C012911	-2,08	2,9E-10	4,1E-08	Similar to S-adenosylmethionine synthase 2 (Elaeagnus umbellata) (uniprot_sprotosp Q9AT55 METK2_ELAUM)
MELO3C022613	-2,98	4,7E-09	5,6E-07	Similar to Datta(24)-sterol reductase (Bism. sativum) (uniprot_sprotosp P93472 DIM_PE.A)
MELO3C023537	-1,97	8,0E-09	9,3E-07	Similar to Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 8 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotosp A3BD18 SA.P8_ORYS)
MELO3C007736	-2,25	9,9E-09	1,1E-06	Similar to Homocysteine lyase zipper protein ATHB-6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp P46668 ATHB6_ARATH)
MELO3C003817	-2,65	1,9E-08	2,0E-06	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniprot_sprotosp B91H4G)
MELO3C023417	-2,16	3,5E-08	3,4E-06	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous communis) (uniprot_sprotosp B9RV58)
MELO3C005111	-2,29	3,9E-08	3,6E-06	Similar to Predicted protein (Fragaria) (Populus trichocarpa) (uniprot_sprotosp B9GNEF3)
MELO3C002641	-4,38	4,4E-08	3,8E-06	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous communis) (uniprot_sprotosp B9S988)
MELO3C006476	-3,98	5,6E-08	4,8E-06	Similar to Auxin-responsive protein IAA14 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q38832 IAA14_ARATH)
MELO3C010668	-5,58	8,5E-08	7,0E-06	Similar to Polygalacturonase A1g48100 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q949Z1 PGLR4_ARATH)
MELO3C016366	-2,12	1,3E-07	1,1E-05	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniprot_sprotosp UPI0001982D0F)
MELO3C017151	-3,58	2,1E-07	1,3E-05	Similar to Tubulin beta-1 chain (Zea mays) (uniprot_sprotosp P18025 TBB1_MAIZE)
MELO3C0017151	-5,46	2,0E-07	1,5E-05	Similar to Putative uncharacterized protein (Vitis vinifera) (uniprot_sprotosp B9A5CV2)
MELO3C007779	-2,37	2,1E-07	1,5E-05	Similar to Metal ion binding protein, putative (Rimous communis) (uniprot_sprotosp B9GQJ4)
MELO3C021047	-4,24	3,6E-07	2,5E-05	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniprot_sprotosp B9GQJ4)
MELO3C010272	-3,15	4,9E-07	3,2E-05	Similar to Probable flavin-containing monooxygenase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q91LMA1 FMOL_ARATH)
MELO3C001444	-4,15	6,4E-07	3,9E-05	None
MELO3C014883	-1,85	7,6E-07	4,5E-05	Similar to B2 protein (Daucus carota PE=2SV=1) (uniprot_sprotosp P37707 B2_DAUCA)
MELO3C007507	-2,72	9,9E-07	5,7E-05	Similar to Oxygen-evolving enhancer protein 1, thiolplastocyanin (Nicotiana glauca) (uniprot_sprotosp Q40459 PSBO_TOBAG)
MELO3C010866	-2,42	1,2E-06	6,6E-05	None
MELO3C021766	-2,89	1,3E-06	7,5E-05	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniprot_sprotosp P94012)
MELO3C018729	-3,95	2,1E-06	1,1E-04	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniprot_sprotosp B9NSW3)
MELO3C012702	-3,74	2,3E-06	1,1E-04	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniprot_sprotosp P94012)
MELO3C010297	-3,58	2,7E-06	1,3E-04	Similar to Bifunctional purple acid phosphatase 26 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q949Y3 PPA26_ARATH)
MELO3C017480	-2,57	2,9E-06	1,4E-04	Similar to Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q38857 XTH22_ARATH)
MELO3C018766	-5,13	4,4E-06	2,0E-04	None
MELO3C007269	-1,65	5,0E-06	2,3E-04	Similar to Auxin-repressed 12.5 kDa protein (Fragaria ananassa PE=2SV=1) (uniprot_sprotosp Q05349 12KD_FRAAN)
MELO3C006670	-2,05	5,4E-06	2,4E-04	Similar to Translationally-controlled tumor protein homolog (Cucumis melo) (uniprot_sprotosp Q9M518 TCTP_CUCME)
MELO3C016601	-2,29	5,3E-06	2,4E-04	Similar to Organic cation transporter protein (Drosophila melanogaster) (uniprot_sprotosp Q9VCA2 ORCT_DROME)
MELO3C019601	-2,14	5,5E-06	2,4E-04	Similar to CBS domain-containing protein CBSX3, mitochondriai (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q91EV3 CBSX3_ARATH)
MELO3C012869	-1,88	5,6E-06	2,4E-04	Similar to Uncharacterized protein A1g165900 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q681Q7 Y139U_ARATH)
MELO3C025164	-1,85	6,2E-06	2,7E-04	Similar to Probable aquaporin PIP1-5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q81AA6 PIP15_ARATH)
MELO3C019142	-3,14	7,1E-06	2,9E-04	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase RING1 (Crossidium hirsutum) (uniprot_sprotosp P0CH30 RING1_GOSHI)
MELO3C004589	-1,74	8,0E-06	3,2E-04	Similar to Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9SP35 TIM17_ARATH)
MELO3C016487	-1,44	1,1E-05	4,3E-04	Similar to Elongation factor 1-gamma (Prunus avium PE=2SV=1) (uniprot_sprotosp Q9FUM1 EFG1G_PRUAV)
MELO3C021404	-1,99	1,2E-05	4,7E-04	Similar to Putative uncharacterized protein (Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (uniprot_sprotosp D7L465)
MELO3C018681	-4,19	1,4E-05	5,1E-04	Similar to Protein PHLOEM PROTEIN 2-LIKE A1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp O81865 P2A01_ARATH)
MELO3C015184	-4,71	1,5E-05	5,5E-04	Similar to Putative uncharacterized protein (Vitis vinifera) (uniprot_sprotosp Q59536 PTRB_MORLA)
MELO3C012725	-2,50	1,8E-05	6,4E-04	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniprot_sprotosp B9GNH0)
MELO3C025232	-1,46	2,1E-05	7,2E-04	Similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2 28 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q94F47 UBC28_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C017358	-3,33	2,1E-05	7,3E-04	Similar to Probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD11 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8L7A4 AGD11_ARATH)
MELO3C013470	-1,98	2,4E-05	7,9E-04	Similar to Ankyrin repeat domain-containing protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q5SAR5 AKR2_ARATH)
MELO3C0006821	-2,86	2,7E-05	9,0E-04	Similar to 21 kDa protein (Daucus carota PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P17407 21KD_DAUCA)
MELO3C0009596	-4,66	3,0E-05	9,4E-04	Similar to F-box/kelch-repeat protein At2g44130 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O89582 FBK46_ARATH)
MELO3C0009787	-4,30	3,5E-05	1,1E-03	None
MELO3C0007297	-3,85	3,6E-05	1,1E-03	Similar to Stem-specific protein TSJ11 (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp P24805 TSJ11_TOBAC)
MELO3C0007351	-1,80	3,8E-05	1,2E-03	Similar to Transcription regulator, putative (Riönus communis) (uniref90 UniRef90_B9RXV5)
MELO3C013710	-2,80	4,7E-05	1,4E-03	Similar to Auxin/hydrogen symporter, putative (Riönus communis) (uniref90 UniRef90_B9S6X0)
MELO3C021556	-1,82	5,9E-05	1,7E-03	Similar to ADP-ribosylation factor 1 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q06396 ARF1_ORYSI)
MELO3C016852	-1,69	8,5E-05	2,3E-03	Similar to Zinc finger CCH domain-containing protein 20 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O82199 C3H20_ARATH)
MELO3C024376	-1,48	8,8E-05	2,4E-03	Similar to Eukaryotic initiation factor 4A-11 (Nicotiana tabacum PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp Q40465 IF411_TOBAC)
MELO3C014237	-1,92	9,3E-05	2,5E-03	Similar to 60S ribosomal protein L12-1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P50883 RL121_ARATH)
MELO3C0003412	-1,77	9,5E-05	2,5E-03	Similar to Transcription factor MYC2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q39204 RAP1_ARATH)
MELO3C027332	-3,19	1,0E-04	2,7E-03	Similar to UDP-glucuronate 4-epimerase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M0B6 GAE1_ARATH)
MELO3C002508	-1,99	1,2E-04	3,0E-03	Similar to Thionin-like protein CXXS1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LDJ5 CXXS1_ARATH)
MELO3C0005178	-2,94	1,2E-04	3,1E-03	Similar to Transcription factor bHLH49 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9CAL9 BH049_ARATH)
MELO3C015924	-2,36	1,3E-04	3,1E-03	None
MELO3C017303	-1,81	1,3E-04	3,3E-03	Similar to PREDICTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_UPI0001982A99)
MELO3C0009736	-3,34	1,4E-04	3,3E-03	Similar to Probable nitrate transporter At1g68570 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q5S8X20 PTR18_ARATH)
MELO3C021934	-3,32	1,4E-04	3,3E-03	None
MELO3C007317	-3,05	1,5E-04	3,6E-03	None
MELO3C013727	-3,51	1,5E-04	3,6E-03	Similar to WUSCHEL-related homeobox 13 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O81788 WOX13_ARATH)
MELO3C017755	-2,17	1,6E-04	3,7E-03	Similar to Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 14 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q22800 COL14_ARATH)
MELO3C0004139	-1,79	1,6E-04	3,7E-03	Similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 23 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q2F84 UBP23_ARATH)
MELO3C017100	-2,00	1,6E-04	3,7E-03	Similar to Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q28U03 AL2B4_ARATH)
MELO3C0004434	-2,39	1,7E-04	3,8E-03	Similar to Putative undhamaterized protein (Medicago truncatula) (uniref90 UniRef90_B7F6G55)
MELO3C001994	-3,21	1,7E-04	3,9E-03	Similar to Thionin-like 1-1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O64654 TRL11_ARATH)
MELO3C013954	-4,56	1,8E-04	3,9E-03	Similar to 14 kDa proline-rich protein DC2.15 (Daucus carota PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P14009 14KD_DAUCA)
MELO3C021383	-1,42	1,8E-04	4,0E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B9HYA3)
MELO3C015841	-1,78	1,8E-04	4,0E-03	Similar to 40S ribosomal protein S19-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FNP8 RS193_ARATH)
MELO3C020023	-3,37	1,9E-04	4,0E-03	Similar to Elongation factor 1-delta (Pimpinella bradycarpa PE=2 SV=3) (uniprot_sprotsp P93447 EH1D_PIMBR)
MELO3C015601	-2,82	2,0E-04	4,3E-03	Similar to SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q84VQ1 KINBL_ARATH)
MELO3C026613	-1,26	2,0E-04	4,3E-03	Similar to Tubulin alpha-3 chain (Eleusine indica) (uniprot_sprotsp O22349 TBA3_ELEIN)
MELO3C018099	-1,41	2,1E-04	4,3E-03	Similar to Polyubiquitin (fragment) (Nicotiana glauca) (uniprot_sprotsp PWC684 UBI4P_NIGSY)
MELO3C020877	-2,11	2,0E-04	4,3E-03	Similar to Putative undhamaterized protein (Riönus communis) (uniref90 UniRef90_B9S6G0)
MELO3C0009215	-1,33	2,1E-04	4,4E-03	Similar to Putative undhamaterized protein (Glycine max) (uniref90 UniRef90_G6SZM4)
MELO3C023255	-2,70	2,1E-04	4,4E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B9HEJ7)
MELO3C002878	-1,25	2,2E-04	4,6E-03	Similar to Elongation factor 1-alpha (Manihot esculenta) (uniprot_sprotsp O49169 EF1A_MANES)
MELO3C026612	-1,60	2,3E-04	4,7E-03	Similar to Eukaryotic transkition initiation factor-4E, type 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FK59 IF4E3_ARATH)
MELO3C023354	-4,25	2,4E-04	4,8E-03	Similar to Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9S U4 ALFCL_ARATH)
MELO3C017113	-2,77	2,4E-04	4,8E-03	Similar to Putative undhamaterized protein (Glycine max) (uniref90 UniRef90_G6T02)
MELO3C026741	-2,69	2,5E-04	4,9E-03	Similar to CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 25 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8W1D5 CIPKP_ARATH)
MELO3C010183	-2,83	2,5E-04	5,0E-03	None
MELO3C0008854	-1,78	2,5E-04	5,0E-03	Similar to High affinity cationic amino acid transporter 1 (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q99145 CTR1_MOUSE)
MELO3C0003313	-1,27	2,6E-04	5,0E-03	Similar to Membrane steroid-binding protein 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O48845 MSBP2_ARATH)
MELO3C006316	-1,37	2,7E-04	5,2E-03	Similar to Probable cytochrome b5 isoform 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O48845 CYB52_ARATH)
MELO3C013539	-3,02	2,8E-04	5,4E-03	Similar to V-aside-associated protein 4-2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8VYN2 VAP42_ARATH)
MELO3C025759	-2,99	2,8E-04	5,4E-03	None
MELO3C001012	-1,58	3,0E-04	5,6E-03	Similar to Elongation factor 1-alpha (Manihot esculenta) (uniprot_sprotsp O49169 EF1A_MANES)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C011835	-3,54	3,0E-04	5,6E-03	Similar to Transcription factor TCP8 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C518 TCP8_ARATH)
MELO3C011731	-2,21	3,2E-04	5,8E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire900UniRef90_B9HH73)
MELO3C017898	-4,29	3,4E-04	6,1E-03	Similar to Ubiquitin-protein ligase, putative (Rénus communis) (unire90UniRef90_B9RV30)
MELO3C002085	-2,31	3,5E-04	6,3E-03	Similar to PREDICTION: hypothetical protein (Vitis vinifera) (unire90UniRef90_LUP10001984F08)
MELO3C013136	-1,68	3,8E-04	6,7E-03	Similar to GDP-L-galactose phosphorylase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8RWES GGAPI_ARATH)
MELO3C011417	-1,53	4,0E-04	6,9E-03	Similar to TTK7.26 protein (Arabidopsis thaliana) (unire90UniRef90_Q9FEZ2)
MELO3C025601	-3,35	3,9E-04	6,9E-03	Similar to PREDICTION: hypothetical protein isoform 1 (Vitis vinifera) (unire90UniRef90_LUP100019857AF)
MELO3C004381	-2,66	4,1E-04	7,1E-03	Similar to Auxin-induced protein 22D (Vigna radiata var. radiata) (uniprot_sprotsp O24542 AX22D_VIGRR)
MELO3C024684	-1,94	4,1E-04	7,1E-03	Similar to 60S ribosomal protein L30 (Lupinus luteus) (uniprot_sprotsp O49884 RL30_LUPLU)
MELO3C022177	-1,50	4,2E-04	7,1E-03	Similar to 40S ribosomal protein S9-2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9H1F0 RS92_ARATH)
MELO3C018459	-1,97	4,8E-04	7,9E-03	Similar to Putative undcharacterized protein S24-2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LCC3 RS242_ARATH)
MELO3C018765	-1,55	5,1E-04	8,3E-03	Similar to Putative undcharacterized protein (Rénus communis) (unire90UniRef90_B9RW76)
MELO3C020710	-1,78	5,1E-04	8,3E-03	Similar to RNA and export factor-binding protein 2 (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q9JWG1 REFP2_MOUSE)
MELO3C018459	-1,12	5,3E-04	8,6E-03	Similar to 40S ribosomal protein S16 (Grossypium hirsutum) (uniprot_sprotsp P46293 RS16_GOSHI)
MELO3C000538	-2,13	5,6E-04	8,9E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90UniRef90_B9MTW2)
MELO3C007788	-1,43	5,8E-04	9,0E-03	None
MELO3C025741	-2,76	5,7E-04	9,0E-03	Similar to Putative undcharacterized protein (Rénus communis) (unire90UniRef90_B9SK16)
MELO3C015833	-1,90	5,9E-04	9,2E-03	Similar to Cytin-P3-1 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q751V0 CCP31_ORYSJ)
MELO3C023322	-1,64	6,1E-04	9,4E-03	Similar to Whole genome shotgun sequence of line FN40024, scaffold_46.assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (unire90UniRef90_D7UC25)
MELO3C017897	-2,01	6,2E-04	9,6E-03	Similar to Undcharacterized protein Atlg15400 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9X129 Y1540_ARATH)
MELO3C012597	-1,17	6,3E-04	9,7E-03	Similar to DCN1-like protein 2 (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q8BZJ7 DCN12_MOUSE)
MELO3C007834	-1,35	6,6E-04	1,0E-02	Similar to Tubby-like F-box protein 5 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotsp Q6Z2G9 TLP5_ORYSJ)
MELO3C003482	-1,87	6,6E-04	1,0E-02	Similar to Probable histone H2A variant 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9C944 H2AV3_ARATH)
MELO3C023389	-2,14	6,9E-04	1,0E-02	Similar to Basic7S globulin (Glycine max) (uniprot_sprotsp P13917 7SBI_SOYBN)
MELO3C021406	-2,14	6,9E-04	1,0E-02	Similar to Putative undcharacterized protein (Vitis vinifera) (unire90UniRef90_A5AE90)
MELO3C007609	-2,10	6,9E-04	1,0E-02	Similar to Subtilisin-like protease (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O65351 SUBL_ARATH)
MELO3C023076	-2,09	6,9E-04	1,0E-02	Similar to GATA transcription factor 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LAU9 GATA1_ARATH)
MELO3C020141	-2,38	7,2E-04	1,1E-02	Similar to 40S ribosomal protein S26-1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P49206 RS261_ARATH)
MELO3C011276	-1,78	7,6E-04	1,1E-02	Similar to 40S ribosomal protein S11-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42733 RS113_ARATH)
MELO3C016083	-2,10	7,7E-04	1,1E-02	Similar to Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (Nicotiana glauca) (uniprot_sprotsp P49636 RL40_NICSY)
MELO3C009187	-2,12	8,3E-04	1,2E-02	Similar to BAHID acyltransferase DCR (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9HF86 DCR_ARATH)
MELO3C008129	-3,38	8,3E-04	1,2E-02	None
MELO3C007139	-1,13	9,1E-04	1,3E-02	Similar to Putative undcharacterized protein (Glycine max) (unire90UniRef90_G6TAG6)
MELO3C021333	-2,01	9,4E-04	1,3E-02	Similar to Vesicle-associated membrane protein 724 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O23429 VA724_ARATH)
MELO3C023924	-1,69	9,8E-04	1,4E-02	Similar to Putative vesicle-associated membrane protein 726 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9MA55 VA726_ARATH)
MELO3C002753	-3,03	1,0E-03	1,4E-02	None
MELO3C018694	-2,95	1,1E-03	1,5E-02	Similar to F-box protein At5g46170 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FNK5 FB285_ARATH)
MELO3C021906	-4,17	1,1E-03	1,5E-02	Similar to TPR repeat-containing thionedoxin TLL1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9MAH1 TLL1_ARATH)
MELO3C024587	-1,63	1,1E-03	1,5E-02	Similar to Undcharacterized RNA-binding protein C23E6.01c (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotsp O60176 YG41_SCHPO)
MELO3C025336	-1,73	1,1E-03	1,5E-02	Similar to Digalactosyl-diacylglycerol synthase 1, chloroplastic (Lotus japonicus) (uniprot_sprotsp Q6DW74 DGDG1_LOTJA)
MELO3C021201	-1,38	1,3E-03	1,8E-02	None
MELO3C019310	-3,27	1,4E-03	1,8E-02	Similar to Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic (Spinacia oleracea) (uniprot_sprotsp P32260 CYSKP_SPIOI)
MELO3C007205	-3,05	1,4E-03	1,9E-02	Similar to Nitrate transporter 1.3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LVE0 PTR33_ARATH)
MELO3C014482	-1,53	1,5E-03	2,0E-02	Similar to Putative undcharacterized protein (Glycine max) (unire90UniRef90_G6TDDV1)
MELO3C005341	-1,73	1,5E-03	2,0E-02	Similar to Lipoxigenase 5, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LUV0 LOX5_ARATH)
MELO3C016963	-0,97	1,5E-03	2,0E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (unire90UniRef90_B9HWD7)
MELO3C023346	-2,39	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 5A (Manihot esculenta PE=2 SV=2) (uniprot_sprotsp Q9AXJ4 I15A_MANES)
MELO3C027126	-1,89	1,6E-03	2,1E-02	Similar to Squalene synthase (Nicotiana glauca PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P53800 FDFT_NICBE)
MELO3C011352	-3,21	1,7E-03	2,1E-02	Similar to Transcription regulator, putative (Rénus communis) (unire90UniRef90_B9RXV5)
				Similar to Prostaglandin H synthase 2 (Danio rerio) (uniprot_sprotsp Q7ZUC7 PGES2_DANRE)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C01019363	-1,22	1,7E-03	2,2E-02	None
MELO3C0204610	-1,94	1,7E-03	2,2E-02	None
MELO3C02036006	-1,10	1,7E-03	2,2E-02	Similar to S-adenosylmethionine synthase 1 (Elaeagnus umbellata) (uniprot_sprotssp Q9A1756 METTK1_ELAUM)
MELO3C017775	-2,81	1,8E-03	2,2E-02	Similar to DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit rpabc3 (Deinostelium discoideum) (uniprot_sprotssp Q54YVW8 RPAB3_DICD1)
MELO3C0206532	-1,26	1,8E-03	2,2E-02	Similar to Catalase isozyme 3 (Cucurbita pepo) (uniprot_sprotssp P48352 CAT3A3_CUCPE)
MELO3C007438	-2,26	1,8E-03	2,2E-02	None
MELO3C014519	-1,28	2,0E-03	2,4E-02	Similar to BEL1-like homeodomain protein 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9S156 BLH1_ARATH)
MELO3C0103355	-2,75	2,0E-03	2,4E-02	Similar to Nitrate transporter 1.4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SY41 PTR27_ARATH)
MELO3C024375	-1,36	2,1E-03	2,5E-02	Similar to PRE(D)CTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_UPI0001983E21)
MELO3C007784	-2,00	2,1E-03	2,5E-02	None
MELO3C018523	-1,34	2,1E-03	2,5E-02	Similar to ADP-ribosylation factor-like protein 8A (Gallus gallus) (uniprot_sprotssp Q5ZKQ8 ARL8A_CHICK)
MELO3C020014	-1,65	2,1E-03	2,5E-02	Similar to Transcription elongation factor A protein 3 (Bos taurus) (uniprot_sprotssp Q2K109 TCEA3_BOVIN)
MELO3C002464	-0,99	2,2E-03	2,5E-02	Similar to RNA-binding post-transcriptional regulator exs1 (Schizosaccharomyces pombe) (uniprot_sprotssp O13759 CSX1_SCHPO)
MELO3C014441	-1,99	2,2E-03	2,5E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp O80639 ERF82_ARATH)
MELO3C007466	-2,63	2,2E-03	2,6E-02	Similar to UPRF0202 protein At3g57940 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9M2Q4 U202B_ARATH)
MELO3C010731	-1,06	2,2E-03	2,6E-02	Similar to Cydin-dependent kinase G-2 (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q7XUH4 CDKG2_ORYSJ)
MELO3C024206	-2,45	2,3E-03	2,7E-02	Similar to Chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplastic (Cossyptum hirsutum) (uniprot_sprotssp P27518 CB21_GOSHI)
MELO3C021326	-2,50	2,4E-03	2,7E-02	Similar to Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-4 (Cucumis sativus PE=1 SV=1) (uniprot_sprotssp Q39659 MIFPA_CUCSA)
MELO3C011375	-2,28	2,4E-03	2,7E-02	Similar to Predicted protein (rosids) (uniref90 UniRef90_B9GUH4)
MELO3C0005949	-3,09	2,5E-03	2,8E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_48.assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_D7U821)
MELO3C017761	-2,64	2,7E-03	2,9E-02	Similar to Transcription factor bHLH113 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9L167 BHLH13_ARATH)
MELO3C0004110	-1,19	2,7E-03	3,0E-02	Similar to S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (Oryza sativa subsp. japonica) (uniprot_sprotssp Q9JG10 DCAM_ORYSJ)
MELO3C010295	-1,85	2,8E-03	3,0E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B9N716)
MELO3C022753	-2,02	2,8E-03	3,1E-02	Similar to Probable methyltransferase PMT21 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q94H13 PMTL_ARATH)
MELO3C013738	-1,98	3,0E-03	3,2E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous omumunus) (uniref90 UniRef90_B9SXL2)
MELO3C023117	-1,03	3,0E-03	3,2E-02	Similar to 40S ribosomal protein S2-2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q93VB8 RS22_ARATH)
MELO3C011754	-1,87	3,1E-03	3,3E-02	Similar to Transcription factor TCP7 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9FMX2 TCP7_ARATH)
MELO3C025217	-2,74	3,2E-03	3,3E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_58.assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_D7SR01)
MELO3C012019	-2,22	3,2E-03	3,3E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rimous omumunus) (uniref90 UniRef90_B9SZ15)
MELO3C003108	-2,11	3,2E-03	3,3E-02	Similar to Probable histone H2A.4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LZ46 H2A4_ARATH)
MELO3C026494	-1,71	3,3E-03	3,4E-02	Similar to Cytochrome P450 82A3 (Glycine max) (uniprot_sprotssp Q49858 C82A3_SOYBN)
MELO3C007749	-1,66	3,3E-03	3,4E-02	Similar to Tyrosin-O-glucosyltransferase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9SK82 COGT2_ARATH)
MELO3C014614	-2,75	3,3E-03	3,4E-02	Similar to DNA-damage-repair/tolerance protein DRT100 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q00874 DRT100_ARATH)
MELO3C004928	-1,86	3,4E-03	3,4E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_4.assembly12x (Fragment) (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_D7SL16)
MELO3C021212	-2,52	3,4E-03	3,5E-02	Similar to Protein LURP-one-related 12 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9LVZ8 LOR12_ARATH)
MELO3C023425	-2,45	3,5E-03	3,6E-02	Similar to Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4 (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotssp Q51QNI HERC4_RAT)
MELO3C0008944	-1,82	3,7E-03	3,7E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B9GEL0)
MELO3C020628	-2,59	3,7E-03	3,8E-02	Similar to L-asparaginase (Cucumis sativus PE=1 SV=1) (uniprot_sprotssp P14133 ASO_CUCSA)
MELO3C012956	-2,41	3,8E-03	3,8E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B9GEL0)
MELO3C015643	-2,05	3,8E-03	3,9E-02	Similar to At4g31130 (Arabidopsis) (uniref90 UniRef90_Q9M089)
MELO3C0006245	-1,26	3,9E-03	3,9E-02	Similar to 60S ribosomal protein L11 (Medicago sativa) (uniprot_sprotssp P46287 RL11_MEIDSA)
MELO3C011233	-2,37	4,0E-03	3,9E-02	Similar to PRE(D)CTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_UPI00015C9152)
MELO3C0009025	-2,36	4,4E-03	4,2E-02	Similar to Probable protein phosphatase 2C 68 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q84JD5 P2C68_ARATH)
MELO3C0142028	-1,89	4,4E-03	4,3E-02	Similar to Dm3 (Pisum sativum) (uniref90 UniRef90_Q8LKG1)
MELO3C018378	-1,18	4,5E-03	4,3E-02	Similar to 40S ribosomal protein S4 (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotssp P46300 RS4_SOLTU)
MELO3C012628	-1,89	4,6E-03	4,4E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B9NAA8)
MELO3C025812	-1,38	4,6E-03	4,4E-02	Similar to PRE(D)CTED: hypothetical protein (Vitis vinifera) (uniref90 UniRef90_UPI0001983DC9)
MELO3C024609	-2,05	4,7E-03	4,5E-02	Similar to Auxin-responsive protein IAA27 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotssp Q9ZSY8 IAA27_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (D, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MEL03C011173	-1,73	5,0E-03	4,6E-02	Similar to Cation transport regulator-like protein 2 (Rattus norvegicus) (uniprot_sprotsp Q64IZ5 CHAC2_RAT)
MEL03C005298	-2,17	5,1E-03	4,7E-02	Similar to DELLA protein GAIP-B (Cucurbita maxima) (uniprot_sprotsp Q6EI05 GAIPB_CUCMA)
MEL03C005675	-2,68	5,3E-03	4,8E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_B9GCKH8)
MEL03C013353	-1,83	5,2E-03	4,8E-02	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref90 UniRef90_A9PI31)
MEL03C009644	-1,54	5,4E-03	4,9E-02	Similar to Protein translocase, putative (Rattus communis) (uniref90 UniRef90_B9T270)
MEL03C013000	-1,00	5,4E-03	4,9E-02	Similar to NADP-dependent malic enzyme, chloroplastic (Flaveria pringlei) (uniprot_sprotsp P36444 MAOC_FLAPR)
MEL03C025555	-1,80	5,4E-03	4,9E-02	Similar to Putative MO25-like protein At5g47540 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FGK3 MO25N_ARATH)
MEL03C006088	-2,37	5,6E-03	5,0E-02	Similar to 50S ribosomal protein L5, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O94603 RK5_ARATH)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (E). Relación de genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración.

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C0022978	4,97	2,0E-11	4,3E-08	Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q8H1SH ACCH3_ARATH)
MELO3C0007779	8,61	4,7E-08	3,0E-05	Similar to Metal ion binding protein, putative (Ricinus communis) (uniref00 UniRef90_B9SS12)
MELO3C0008010	4,77	1,2E-07	5,1E-05	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref00 UniRef90_B91H20)
MELO3C0025798	3,30	8,1E-07	2,6E-04	Similar to Cytochrome P450 71A1 (Pennisia americana) (uniprot_sprotosp P24465) C71A1_PERAIE
MELO3C0002943	8,19	7,0E-06	1,2E-03	Similar to Lipool synthase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q8RWT0 LUP2_ARATH)
MELO3C0007736	3,67	9,7E-06	1,6E-03	Similar to Homocysteine zipper protein ATHB-6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp P46668) ATHB6_ARATH
MELO3C0021688	2,47	1,3E-05	2,0E-03	None
MELO3C0003441	7,36	1,8E-05	2,6E-03	Similar to Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q38908) XTH30_ARATH
MELO3C0008214	3,48	9,6E-05	8,2E-03	Similar to Putative uncharacterized protein (Ricinus communis) (uniref00 UniRef90_B9RBM9)
MELO3C0009300	3,77	9,3E-05	8,2E-03	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_66, assembly12x (fragment) (Vitis vinifera) (uniref00 UniRef90_D7TWT7)
MELO3C0011117	7,72	1,4E-04	9,7E-03	Similar to Receptor-like protein HSL1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9SGP2 HSL1_ARATH)
MELO3C0015130	4,75	1,3E-04	9,7E-03	Similar to Polygalacturonase (Prunus persica PE=2 SV=1) (uniprot_sprotosp P48979) PGLR_PRUPE
MELO3C0021231	4,46	1,6E-04	1,1E-02	Similar to CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q8RWC9) CIPK1_ARATH
MELO3C0024317	7,31	1,7E-04	1,1E-02	Similar to GDSL esterase/lipase 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9S8A7) GLIP5_ARATH
MELO3C0009791	3,64	2,0E-04	1,2E-02	Similar to Cation/calcium exchanger 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9LJ12) CCX3_ARATH
MELO3C0018458	3,00	2,5E-04	1,5E-02	Similar to ABSXIS1 ACID-INSENSITIVE 5-like protein 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9M7Q3) AIS16_ARATH
MELO3C0006405	4,18	2,7E-04	1,5E-02	Similar to Long-chain-1,3-galactosyltransferase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp B5WWZ8) FAOL10T1A
MELO3C0018819	3,57	2,8E-04	1,5E-02	Similar to Probable beta-1,3-galactosyltransferase 2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp A8MRC7) B3GT2_ARATH
MELO3C0025758	3,69	2,9E-04	1,5E-02	Similar to Aaun response factor 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9ZTX9) ARFD_ARATH
MELO3C0005564	2,26	3,4E-04	1,8E-02	Similar to Vacuolar-processing enzyme (Ricinus communis PE=1 SV=1) (uniprot_sprotosp P49042) VPE_RICCO
MELO3C0005267	2,24	4,9E-04	2,2E-02	Similar to Probable receptor protein kinase TMK1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp P43298) TMK1_ARATH
MELO3C0010739	1,84	5,3E-04	2,2E-02	Similar to Aq1-jac1-cancer-protein) desaturase, chloroplastic (Cucumis sativus PE=2 SV=1) (uniprot_sprotosp P32061) STAD_CUCSA
MELO3C0021052	2,05	5,2E-04	2,2E-02	Similar to Dnaj homolog subfamily B, member 4 (Mus musculus) (uniprot_sprotosp Q9D832) DNJB4_MOUSE
MELO3C0013838	3,51	5,8E-04	2,2E-02	Similar to Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q25367) TPS5_ARATH
MELO3C0021183	2,43	5,9E-04	2,2E-02	Similar to Heavy metal-associated domain containing protein, expressed (Onyza sativa) (uniref00 UniRef90_Q8LN41)
MELO3C0024326	2,49	7,1E-04	2,6E-02	Similar to Aq1 cric1 protein (Ricinus communis) (uniref00 UniRef90_B9RR02)
MELO3C0021404	3,97	7,3E-04	2,6E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Arabidopsis lyrata subsp. lyrata) (uniref00 UniRef90_D7L4S5)
MELO3C00043491	4,41	7,5E-04	2,7E-02	Similar to Zinc finger CCHC domain-containing protein 20 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp O82199) C3H20_ARATH
MELO3C0005681	2,80	9,4E-04	3,1E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Ricinus communis) (uniref00 UniRef90_B9RC7)
MELO3C0003491	4,41	9,7E-04	3,2E-02	Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] (Cucumis sativus) (uniprot_sprotosp P42166) PCGA_CUCSA
MELO3C0018816	1,98	1,1E-03	3,4E-02	Similar to Aconitate hydratase, cytoplasmic (Cucurbita maxima 2 SV=1) (uniprot_sprotosp P49508) ACOC_CUCMA
MELO3C0021173	2,86	1,2E-03	3,8E-02	Similar to DNA-directed RNA polymerase 2, chloroplastic/mitochondrial (Nicotiana glauca) (uniprot_sprotosp Q8VWF8) RPO12_NICSY
MELO3C0022288	2,22	1,2E-03	3,8E-02	Similar to Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_21, assembly12x (fragment) (Vitis vinifera) (uniref00 UniRef90_D7SILZ5)
MELO3C0009097	6,36	1,4E-03	4,1E-02	Similar to Probable WRKY transcription factor 70 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9LY00) WRK70_ARATH
MELO3C0007104	1,84	1,5E-03	4,1E-02	Similar to Aaun response factor 6 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9ZTX8) ARFF_ARATH
MELO3C0012987	1,73	1,5E-03	4,1E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Vitis vinifera) (uniref00 UniRef90_A5AUD3)
MELO3C0025925	2,88	1,5E-03	4,1E-02	Similar to Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBA131 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q94B55) XB31_ARATH
MELO3C0026494	4,07	1,7E-03	4,4E-02	Similar to Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBA131 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q94B55) XB31_ARATH
MELO3C0010183	6,88	1,8E-03	4,6E-02	None
MELO3C0017480	-5,82	1,0E-09	1,1E-06	Similar to Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q38857) XTH22_ARATH
MELO3C0011392	-4,58	5,7E-08	3,0E-05	Similar to Subtilisin-like protease (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp O65351) SUBL_ARATH
MELO3C0003107	-5,79	8,7E-07	2,6E-04	Similar to Soluble inorganic pyrophosphatase (Zea mays) (uniprot_sprotosp O48556) IPYR_MAIZE
MELO3C0016342	-8,74	1,1E-06	2,9E-04	Similar to Calmodulin (Capsicum annuum) (uniprot_sprotosp P93087) CALM_CAPAN
MELO3C0011317	-4,73	3,0E-06	7,1E-04	Similar to Zinc finger protein CONSTANTS-LIKE 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q940T9) COL4_ARATH
MELO3C0021306	-2,70	6,2E-06	1,2E-03	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp P42736) RAP23_ARATH
MELO3C0012217	-3,37	2,0E-05	2,7E-03	Similar to AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor RAV2 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp P82280) RAV2_ARATH
MELO3C0019581	-2,95	2,6E-05	3,2E-03	Similar to Poly(A)-binding protein C-terminal interacting protein 6 (Cucumis sativus) (uniref00 UniRef90_QGELP9)
MELO3C0016562	-8,23	4,0E-05	4,5E-03	Similar to Putative uncharacterized protein (Glycine max) (uniref00 UniRef90_GGT050)
MELO3C0023802	-2,55	4,0E-05	4,5E-03	Similar to LOB domain-containing protein 41 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotosp Q9M886) LBD41_ARATH
MELO3C0009339	-3,20	5,2E-05	5,5E-03	Similar to Predicted protein (Populus trichocarpa) (uniref00 UniRef90_B91FN1)

Tabla A.4.5.1. Análisis de expresión diferencial (E, continuación).

Gen	log2(FoldChange)	p-value	p-value ajustado	Anotación
MELO3C0005685	-2,57	6,0E-05	6,1E-03	Similar to Aquaporin PIP1-2 (Zea mays) (uniprot_sprotsp Q9XFS9 PIPI2_MAIZE)
MELO3C0011008	-3,39	6,7E-05	6,4E-03	Similar to Snakin-2 (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotsp Q93X17 SNAK2_SOLTU)
MELO3C0026532	-2,32	9,5E-05	8,2E-03	Similar to Catalase isozyme 3 (Cucurbita pepo) (uniprot_sprotsp P48832 CATA3_CUCPE)
MELO3C0009886	-3,22	1,1E-04	9,1E-03	Similar to 2-aminoethanol deoxygenase (Mus musculus) (uniprot_sprotsp Q6PDY2 AEDO_MOUSE)
MELO3C0013774	-3,22	1,2E-04	9,5E-03	Similar to Methionine gamma-lyase (Pseudomonas putida) (uniprot_sprotsp P15254 MEGL_PSEFU)
MELO3C0022961	-2,67	1,4E-04	9,7E-03	Similar to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P93836 HPPD_ARATH)
MELO3C0007272	-5,03	1,7E-04	1,1E-02	Similar to Glyoxysomal processing protease, glyoxysomal (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8VZD4 DEG15_ARATH)
MELO3C0012702	-4,60	2,3E-04	1,4E-02	Similar to Phloem filament protein (Cucurbita maxima) (uniref90 UniRef90_P94012)
MELO3C002452	-5,06	3,5E-04	1,8E-02	Similar to Probable fructokinase-4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9MIB9 SCRK4_ARATH)
MELO3C0009145	-2,68	3,9E-04	1,8E-02	Similar to Pyruvate decarboxylase isozyme 2 (Nicotiana tabacum) (uniprot_sprotsp P51846 PDC2_TOBAC)
MELO3C0026732	-2,60	3,8E-04	1,8E-02	Similar to Chaperone protein dnaJ 8, chloroplastic (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp D9A18_ARATH)
MELO3C0013888	-4,02	4,4E-04	2,1E-02	Similar to Probable receptor-like protein kinase A15g47070 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LTC0 Y570Z_ARATH)
MELO3C0017940	-4,18	4,7E-04	2,1E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P42736 RAP23_ARATH)
MELO3C0017306	-2,56	5,3E-04	2,2E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Glycine max) (uniref90 UniRef90_C65Y14)
MELO3C0009729	-2,97	5,4E-04	2,2E-02	Similar to Putative uncharacterized protein (Rönuss communis) (uniref90 UniRef90_B9RL65)
MELO3C0015841	-2,38	5,8E-04	2,2E-02	Similar to 40S ribosomal protein S19-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FNP8 RS193_ARATH)
MELO3C0009956	-1,99	6,9E-04	2,6E-02	Similar to Formate dehydrogenase, mitochondrial (Solanum tuberosum) (uniprot_sprotsp Q07511 FDH_SOLTU)
MELO3C0003230	-4,48	8,4E-04	2,9E-02	Similar to BAH1D acyltransferase DCR (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9HF86 DCR_ARATH)
MELO3C0025164	-2,11	8,7E-04	3,0E-02	Similar to Probable aquaporin PIP1-5 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q8LAA6 PIPI5_ARATH)
MELO3C0014441	-3,45	9,1E-04	3,1E-02	Similar to Ethylene-responsive transcription factor 3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp O80339 ERF82_ARATH)
MELO3C0017305	-3,46	1,1E-03	3,5E-02	Similar to LOB domain-containing protein 41 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9M886 LBD41_ARATH)
MELO3C0024378	-2,29	1,2E-03	3,7E-02	Similar to Putative phospholipid-transporting ATPase 4 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9LNG4 ALA4_ARATH)
MELO3C0015995	-2,07	1,3E-03	3,8E-02	Similar to Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2 (Vigna radiata var. radiata) (uniprot_sprotsp P32292 ARG2_VGRR)
MELO3C0003106	-3,26	1,5E-03	4,1E-02	Similar to Ras-related protein ARA-3 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P28186 ARA3_ARATH)
MELO3C0024483	-3,14	1,5E-03	4,1E-02	Similar to Aquaporin TIP1-1 (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp P25818 TIP1_ARATH)
MELO3C002228	-2,44	1,6E-03	4,3E-02	Similar to MYBR domain class transcription factor (Malus x domestica) (uniref90 UniRef90_D9ZJ86)
MELO3C0016083	-2,98	1,6E-03	4,3E-02	Similar to Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (Nicotiana sylvestris) (uniprot_sprotsp P49636 RL40_NICSY)
MELO3C0019142	-3,27	1,6E-03	4,3E-02	Similar to E3 ubiquitin-protein ligase RING1 (Gossypium hirsutum) (uniprot_sprotsp P0CH30 RING1_GOSHI)
MELO3C0011173	-3,07	1,7E-03	4,4E-02	Similar to Cation transport regulator-like protein 2 (Kartus norvegicus) (uniprot_sprotsp Q64HZ5 CHAC2_RAT)
MELO3C0004075	-2,37	1,8E-03	4,5E-02	Similar to Xylose isomerase (Arabidopsis thaliana) (uniprot_sprotsp Q9FKK7 XYLA_ARATH)
MELO3C0026512	-1,59	1,8E-03	4,5E-02	Similar to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 (Hevea brasiliensis) (uniprot_sprotsp P229057 HMDH1_HEVBR)
MELO3C0011872	-2,07	2,0E-03	4,9E-02	Similar to Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (Populus katkamsiensis PE=2 SV=1) (uniprot_sprotsp P93711 CAMT_POPKI)

Tabla A.4.5.2: Resumen de términos GO en los genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1. Se indica el número de genes asociado con cada término GO en los grupos de genes sobreexpresados (SE) e infraexpresados (IE) separados por categoría. Los genes sobreexpresados e infraexpresados son en SC3-5-1|RIPE respecto a PS|RIPE.

Categoría	Código GO	Descripción	Nº SE	Nº IE	
Proceso Biológico	GO:0008150	biological process	165	99	
	GO:0008152	metabolic process	165	92	
	GO:0009987	cellular process	139	95	
	GO:0009058	biosynthetic process	57	47	
	GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	42	34	
	GO:0006810	transport	31	35	
	GO:0006950	response to stress	33	11	
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	33	8	
	GO:0006464	cellular protein modification process	17	24	
	GO:0009056	catabolic process	27	6	
	GO:0019538	protein metabolic process	19	14	
	GO:0007165	signal transduction	16	14	
	GO:0009628	response to abiotic stimulus	17	11	
	GO:0016043	cellular component organization	16	10	
	GO:0006629	lipid metabolic process	20	4	
	GO:0009719	response to endogenous stimulus	13	9	
	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	20	1	
	GO:0007275	multicellular organismal development	12	8	
	GO:0009791	post-embryonic development	10	7	
	GO:0006412	translation	3	13	
	GO:0000003	reproduction	8	5	
	GO:0009790	embryo development	9	4	
	GO:0019725	cellular homeostasis	6	4	
	GO:0040007	growth	6	4	
	GO:0007049	cell cycle	5	4	
	GO:0008219	cell death	6	3	
	GO:0007154	cell communication	8	0	
	GO:0030154	cell differentiation	4	4	
	GO:0009605	response to external stimulus	6	1	
	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	5	1	
	GO:0016049	cell growth	2	2	
	GO:0009607	response to biotic stimulus	3	0	
	GO:0009991	response to extracellular stimulus	3	0	
	GO:0006259	DNA metabolic process	0	2	
	GO:0007610	behavior	0	2	
	GO:0009908	flower development	0	2	
	GO:0009835	fruit ripening	1	0	
	GO:0015979	photosynthesis	1	0	
	Función Molecular	GO:0005488	binding	141	86
		GO:0003824	catalytic activity	113	35
		GO:0016740	transferase activity	67	38
GO:0000166		nucleotide binding	51	47	
GO:0005515		protein binding	51	39	
GO:0016787		hydrolase activity	63	26	
GO:0016301		kinase activity	20	20	
GO:0003677		DNA binding	14	21	
GO:0005215		transporter activity	17	17	
GO:0003674		molecular function	23	9	
GO:0003700		sequence-specific DNA binding transcription factor activity	7	11	
GO:0004872		receptor activity	5	9	
GO:0005198		structural molecule activity	3	11	
GO:0003676		nucleic acid binding	1	11	
GO:0004871		signal transducer activity	4	8	
GO:0003723		RNA binding	1	8	
GO:0008135		translation factor activity, RNA binding	3	4	
GO:0030234		enzyme regulator activity	7	0	
GO:0008289		lipid binding	1	3	
GO:0003774		motor activity	1	1	
GO:0030246		carbohydrate binding	2	0	
GO:0003682		chromatin binding	0	1	
GO:0004518		nuclease activity	0	1	
GO:0045182		translation regulator activity	0	1	

Tabla A.4.5.2: Resumen de términos GO en los genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1 (continuación).

Categoría	Código GO	Descripción	N° SE	N° IE
Componente Celular	GO:0005575	cellular component	68	51
	GO:0016020	membrane	51	42
	GO:0005622	intracellular	54	35
	GO:0005737	cytoplasm	60	21
	GO:0005623	cell	51	27
	GO:0005634	nucleus	29	22
	GO:0009536	plastid	28	6
	GO:0005739	mitochondrion	27	6
	GO:0005886	plasma membrane	20	13
	GO:0005829	cytosol	17	3
	GO:0005576	extracellular region	17	2
	GO:0005618	cell wall	11	3
	GO:0005783	endoplasmic reticulum	10	4
	GO:0005840	ribosome	3	8
	GO:0005773	vacuole	7	3
	GO:0005777	peroxisome	8	1
	GO:0005794	Golgi apparatus	4	3
	GO:0005856	cytoskeleton	3	4
	GO:0005730	nucleolus	1	4
	GO:0005654	nucleoplasm	1	2
GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	1	0	
GO:0005764	lysosome	0	1	
GO:0009579	thylakoid	1	0	

Tabla A.4.5.3: Análisis de enriquecimiento de términos GO de los genes DE entre los frutos maduros de las líneas PS y SC3-5-1. Para los grupos de genes sobreexpresados (SE) e infraexpresados (IE) se indica el nivel de significación (p-valor y p-ajustado) del análisis de enriquecimiento realizado en base al número de apariciones de cada término GO en el grupo respecto al número de apariciones en el genoma de referencia. Los genes sobreexpresados e infraexpresados son en SC3-5-1 | RIPE respecto a PS | RIPE.

Grupo	Código GO	Descripción	N° en grupo	N° en referencia	p-valor	p-valor ajustado
SE	GO:0008152	metabolic process	98	3311	6,08E-07	3,53E-05
	GO:0003824	catalytic activity	64	2001	1,55E-05	4,49E-04
	GO:0008150	biological process	129	5202	6,19E-05	1,20E-03
	GO:0005777	peroxisome	6	65	1,58E-03	2,29E-02
	GO:0005739	mitochondrion	18	446	2,63E-03	2,45E-02
	GO:0005737	cytoplasm	57	2086	3,18E-03	2,45E-02
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	18	460	3,65E-03	2,45E-02
	GO:0030312	external encapsulating structure	9	159	3,80E-03	2,45E-02
	GO:0005618	cell wall	9	159	3,80E-03	2,45E-02
	GO:0000003	reproduction	8	148	8,16E-03	4,73E-02
IE	GO:004871	signal transducer activity	6	81	6,55E-04	3,47E-02

Tabla A.4.5.4: Resumen de términos GO en los genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración. Se indica el número de genes asociado con cada término GO en los grupos de genes sobreexpresados (SE) e infraexpresados (IE) separados por categoría. En los genes sobreexpresados la expresión aumenta a lo largo de la maduración en la línea PS y disminuye en la línea SC3-5-1, y en los infraexpresados su expresión disminuye en PS y aumenta en SC3-5-1 durante la maduración.

Categoría	Código GO	Descripción	N° SE	N° IE
Proceso Biológico	GO:0008150	biological_process	18	20
	GO:0008152	metabolic process	19	19
	GO:0009987	cellular process	15	19
	GO:0009058	biosynthetic process	10	8
	GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	5	9
	GO:0006810	transport	5	5
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	5	3
	GO:0006950	response to stress	0	5
	GO:0006464	cellular protein modification process	4	1
	GO:0019538	protein metabolic process	3	3
	GO:0006629	lipid metabolic process	3	2
	GO:0009056	catabolic process	0	3
	GO:0009628	response to abiotic stimulus	0	3
	GO:0007165	signal transduction	2	2
	GO:0009719	response to endogenous stimulus	2	2
	GO:0006412	translation	0	2
	GO:0007154	cell communication	0	1
	GO:0009605	response to external stimulus	0	1
GO:0009791	post-embryonic development	1	0	
GO:0009991	response to extracellular stimulus	0	1	
GO:0030154	cell differentiation	1	0	
Función Molecular	GO:0005488	binding	16	15
	GO:0003824	catalytic activity	11	10
	GO:0003677	DNA binding	7	6
	GO:0005515	protein binding	6	7
	GO:0016740	transferase activity	6	7
	GO:0000166	nucleotide binding	5	6
	GO:0016787	hydrolase activity	4	6
	GO:0003700	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	3	4
	GO:0005215	transporter activity	0	4
	GO:0016301	kinase activity	3	2
	GO:0003674	molecular_function	2	1
	GO:0005198	structural molecule activity	0	2
	GO:0003676	nucleic acid binding	1	0
	GO:0004871	signal transducer activity	0	1
GO:0004872	receptor activity	0	1	
Componente Celular	GO:0005575	cellular component	3	8
	GO:0005622	intracellular	0	8
	GO:0016020	membrane	3	6
	GO:0005634	nucleus	5	4
	GO:0005737	cytoplasm	0	5
	GO:0009536	plastid	1	4
	GO:0005623	cell	0	4
	GO:0005739	mitochondrion	0	3
	GO:0005829	cytosol	0	3
	GO:0005840	ribosome	0	3
	GO:0005576	extracellular region	1	2
	GO:0005618	cell wall	1	2
	GO:0005773	vacuole	1	2
	GO:0005777	peroxisome	0	2
	GO:0005783	endoplasmic reticulum	0	2
	GO:0005886	plasma membrane	0	2
	GO:0005794	Golgi apparatus	1	0
	GO:0009579	thylakoid	0	1

Tabla A.4.5.5: Análisis de enriquecimiento de términos GO de los genes DE entre las líneas PS y SC3-5-1 a lo largo de la maduración. Para el grupo de genes infraexpresados (IE) se indica el nivel de significación (p-valor y p-valor ajustado) del análisis de enriquecimiento realizado en base al número de apariciones de cada término GO en el grupo respecto al número de apariciones en el genoma de referencia (v3.5.1). En los genes infraexpresados la expresión disminuye en PS y aumenta en SC3-5-1 durante la maduración.

Grupo	Código GO	Descripción	Nº en grupo	Nº en referencia	p-valor	p-valor ajustado
IE	GO:0005372	water transmembrane transporter activity	3	27	3,75E-05	9,64E-03
	GO:0015250	water channel activity	3	27	3,75E-05	9,64E-03
	GO:0036293	response to decreased oxygen levels	2	10	2,57E-04	3,27E-02
	GO:0070482	response to oxygen levels	2	10	2,57E-04	3,27E-02
	GO:0019321	pentose metabolic process	2	12	3,76E-04	3,27E-02
	GO:0000287	magnesium ion binding	4	142	3,81E-04	3,27E-02

Tabla A.4.5.6: Genes de la ruta del etileno. Genes implicados en la síntesis, la señalización y la regulación de la hormona vegetal etileno anotados en el genoma de referencia de melón 3.5.1.

Categoría	Gen	Categoría	Gen	Categoría	Gen
<i>CmSAM</i>	MELO3C012911	<i>CmEREBP</i> (cont.)	MELO3C004503	<i>CmEREBP</i> (cont.)	MELO3C011287
	MELO3C023606		MELO3C005088		MELO3C011364
	MELO3C024471		MELO3C005465		MELO3C011572
<i>CmACS</i>	MELO3C021182	MELO3C005466	MELO3C011671		
	MELO3C016340	MELO3C005502	MELO3C011722		
	MELO3C007662	MELO3C005630	MELO3C011947		
	MELO3C005597	MELO3C005734	MELO3C012217		
	MELO3C010779	MELO3C005747	MELO3C012242		
	MELO3C019008	MELO3C005808	MELO3C012314		
	MELO3C015444	MELO3C005867	MELO3C012896		
	MELO3C006840	MELO3C005940	MELO3C013593		
<i>CmACO</i>	MELO3C014437	MELO3C005941	MELO3C013916		
	MELO3C004619	MELO3C005972	MELO3C013917		
	MELO3C007425	MELO3C006059	MELO3C013926		
	MELO3C010508	MELO3C006149	MELO3C014053		
	MELO3C019735	MELO3C006333	MELO3C014181		
<i>CmETR</i>	MELO3C003906	MELO3C006430	MELO3C014441		
	MELO3C006451	MELO3C006431	MELO3C014722		
	MELO3C015961	MELO3C006432	MELO3C015543		
	MELO3C022858	MELO3C006626	MELO3C015737		
<i>CmETR1</i>	MELO3C002125	MELO3C006688	MELO3C015739		
	MELO3C002407	MELO3C006870	MELO3C016285		
	MELO3C003518	MELO3C006973	MELO3C016313		
	MELO3C004081	MELO3C007241	MELO3C016780		
	MELO3C006335	MELO3C007267	MELO3C016927		
	MELO3C009433	MELO3C007559	MELO3C016980		
	MELO3C010263	MELO3C007573	MELO3C017645		
	MELO3C013571	MELO3C007769	MELO3C017826		
	MELO3C015389	MELO3C008014	MELO3C017860		
	MELO3C016868	MELO3C008082	MELO3C017888		
	MELO3C016904	MELO3C008308	MELO3C017940		
	MELO3C019637	MELO3C008331	MELO3C018744		
	MELO3C021267	MELO3C008810	MELO3C019506		
	MELO3C024518	MELO3C009307	MELO3C019590		
	<i>CmEIN</i>	MELO3C015210	MELO3C009441	MELO3C019725	
MELO3C015633		MELO3C009889	MELO3C020448		
MELO3C017592		MELO3C010341	MELO3C020847		
MELO3C019931		MELO3C010425	MELO3C020971		
MELO3C003696		MELO3C010466	MELO3C021079		
<i>CmEREBP</i>	MELO3C002623	MELO3C010692	MELO3C021306		
	MELO3C002624	MELO3C010840	MELO3C022010		
	MELO3C003695	MELO3C011286	MELO3C022119		

Tabla A.4.5.6: Genes de la ruta del etileno (continuación).

Categoría	Gen	Categoría	Gen	Categoría	Gen	
<i>CmEREBP</i> (cont.)	MELO3C022179	<i>CmMADS-box</i> (cont.)	MELO3C019694	<i>CmNAC/NAM</i> (cont.)	MELO3C008790	
	MELO3C022181		MELO3C020871		MELO3C022117	
	MELO3C022281		MELO3C021689		MELO3C022002	
	MELO3C022358		MELO3C021692		MELO3C021587	
	MELO3C022694		MELO3C022209		MELO3C025099	
	MELO3C022718		MELO3C022316		MELO3C005563	
	MELO3C022983		MELO3C022516		MELO3C005791	
	MELO3C022985		MELO3C024001		MELO3C012391	
	MELO3C023454		MELO3C026299		MELO3C012390	
	MELO3C023458		<i>CmNAC/NAM</i>		MELO3C027409	MELO3C012215
	MELO3C024315				MELO3C000922	MELO3C012114
	MELO3C024520				MELO3C018675	MELO3C012091
	MELO3C024989				MELO3C024115	MELO3C023195
	MELO3C025608				MELO3C013173	MELO3C023230
	MELO3C025726				MELO3C013287	MELO3C019332
	MELO3C026158				MELO3C012573	MELO3C013641
	MELO3C027196				MELO3C021131	MELO3C019620
	MELO3C027289				MELO3C015355	MELO3C019663
	MELO3C026738				MELO3C015357	MELO3C019665
	<i>CmAP2/ERF</i>	MELO3C003002	MELO3C015427	MELO3C019666		
MELO3C010235		MELO3C017308	MELO3C022254			
MELO3C015667		MELO3C017185	MELO3C022342			
<i>CmTAGL</i>	MELO3C022205	MELO3C026251	MELO3C004694			
Proteosoma 26S	MELO3C001305	MELO3C026180	MELO3C025584			
	MELO3C002335	MELO3C010632	MELO3C002628			
	MELO3C002930	MELO3C019954	MELO3C002573			
	MELO3C004083	MELO3C019845	MELO3C001996			
	MELO3C004136	MELO3C026521	MELO3C001959			
	MELO3C004218	MELO3C011164	<i>CmHD-zip</i>	MELO3C003443		
	MELO3C004531	MELO3C010923		MELO3C003686		
	MELO3C007918	MELO3C003390		MELO3C004378		
	MELO3C009183	MELO3C018242		MELO3C004728		
	MELO3C010970	MELO3C018237		MELO3C006054		
	MELO3C012807	MELO3C012873		MELO3C007811		
	MELO3C013344	MELO3C009980		MELO3C007865		
	MELO3C013760	MELO3C009855		MELO3C008128		
	MELO3C013814	MELO3C009236		MELO3C009730		
	MELO3C015296	MELO3C014509		MELO3C009753		
	MELO3C016262	MELO3C014505	MELO3C010492			
	MELO3C016738	MELO3C008534	MELO3C011116			
	MELO3C018868	MELO3C004604	MELO3C011388			
	MELO3C019587	MELO3C006814	MELO3C011550			
	MELO3C020453	MELO3C019401	MELO3C011839			
	MELO3C020972	MELO3C014922	MELO3C012181			
	MELO3C022496	MELO3C016444	MELO3C012332			
	MELO3C023476	MELO3C016536	MELO3C013357			
	MELO3C023913	MELO3C016540	MELO3C013407			
	MELO3C024608	MELO3C014141	MELO3C013820			
	MELO3C025923	MELO3C013971	MELO3C015377			
	MELO3C026627	MELO3C017052	MELO3C015754			
	MELO3C026651	MELO3C016767	MELO3C016260			
	<i>CmMADS-box</i>	MELO3C002050	MELO3C025611	MELO3C017064		
		MELO3C002723	MELO3C022962	MELO3C017572		
		MELO3C003801	MELO3C010555	MELO3C017790		
		MELO3C005617	MELO3C010501	MELO3C017918		
		MELO3C006860	MELO3C024865	MELO3C018845		
		MELO3C007148	MELO3C017754	MELO3C019237		
		MELO3C007700	MELO3C007255	MELO3C020145		
MELO3C009552		MELO3C007888	MELO3C021427			
MELO3C015239		MELO3C008056	MELO3C022062			
MELO3C018030		MELO3C024561	MELO3C023318			
MELO3C019192		MELO3C024560	MELO3C023710			

Tabla A.4.5.6: Genes de la ruta del etileno (continuación).

Categoría	Gen	Categoría	Gen	Categoría	Gen
<i>CmF-box</i>	MELO3C002360	<i>CmF-box</i> (cont.)	MELO3C009863	<i>CmF-box</i> (cont.)	MELO3C015825
	MELO3C002443		MELO3C010335		MELO3C015898
	MELO3C002753		MELO3C010359		MELO3C016130
	MELO3C003539		MELO3C010482		MELO3C016277
	MELO3C003563		MELO3C010523		MELO3C016381
	MELO3C003818		MELO3C010688		MELO3C016784
	MELO3C004126		MELO3C010722		MELO3C016791
	MELO3C004213		MELO3C010742		MELO3C016912
	MELO3C004254		MELO3C010800		MELO3C017000
	MELO3C004412		MELO3C010832		MELO3C017484
	MELO3C004498		MELO3C011038		MELO3C017485
	MELO3C005056		MELO3C011260		MELO3C017487
	MELO3C005203		MELO3C011360		MELO3C017489
	MELO3C005288		MELO3C011450		MELO3C017665
	MELO3C005372		MELO3C011685		MELO3C017666
	MELO3C005373		MELO3C011757		MELO3C017667
	MELO3C005495		MELO3C011777		MELO3C017898
	MELO3C005980		MELO3C011866		MELO3C017961
	MELO3C006114		MELO3C011897		MELO3C017962
	MELO3C006145		MELO3C012066		MELO3C018024
	MELO3C006146		MELO3C012185		MELO3C018662
	MELO3C006323		MELO3C012462		MELO3C018720
	MELO3C006604		MELO3C012467		MELO3C019003
	MELO3C006795		MELO3C013232		MELO3C019160
	MELO3C006930		MELO3C013321		MELO3C019366
	MELO3C007094		MELO3C013657		MELO3C019498
	MELO3C007095		MELO3C013752		MELO3C020856
	MELO3C007122		MELO3C013909		MELO3C020857
	MELO3C007321		MELO3C014055		MELO3C021363
	MELO3C007403		MELO3C014209		MELO3C021388
	MELO3C007404		MELO3C014347		MELO3C021691
	MELO3C007834		MELO3C014362		MELO3C022415
	MELO3C007953		MELO3C014363		MELO3C022422
	MELO3C008341		MELO3C014381		MELO3C024047
	MELO3C008429		MELO3C014388		MELO3C024542
	MELO3C008578		MELO3C014507		MELO3C024789
	MELO3C008911		MELO3C014522		MELO3C025152
	MELO3C009128		MELO3C014551		MELO3C025465
	MELO3C009392		MELO3C014678		MELO3C025768
	MELO3C009397		MELO3C014710		MELO3C025964
	MELO3C009400		MELO3C014876		MELO3C026207
	MELO3C009421		MELO3C014931		MELO3C026526
	MELO3C009497		MELO3C015149		MELO3C026603
	MELO3C009577		MELO3C015287		MELO3C027345
	MELO3C009862		MELO3C015764		