



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



Piramidació de 3 QTLs implicats en la maduració climatèrica del meló

Núria Bernat Camps

Grau de Biotecnologia

Tutor Acadèmic: María Jesús Torija

Tutor professional: Marta Pujol

Tarragona, 17/06/19

Treball de fi de grau

Índex

1. Dades del centre.....	4
2. Resum.....	5
3. Introducció.....	7
4. Objectiu.....	14
5. Metodologia.....	14
6. Resultats.....	21
7. Discussió.....	28
8. Conclusió i perspectives de futur.....	32
9. Bibliografia.....	33
10. Autoavaluació.....	35
10. Annex.....	36

1. Dades del centre

El Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) és un consorci creat pel Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) i la Universitat de Barcelona (UB). El seu àmbit de treball se centra en la genòmica animal i vegetal. En el grup de recerca on he estat, Genètica i Genòmica de Cultius Vegetals, treballen en el desenvolupament d'eines genètiques i genòmiques per caracteritzar trets agronòmics importants de cultius vegetals, i més en concret del meló.

2. Resum

La maduració dels fruits carnosos es classifica en climatèrics i no climatèrics. Els fruits climatèrics inicien la maduració quan es produeix un pic d'etilè i un augment de la taxa de respiració, mentre que els no climatèrics no presenten cap canvi ni en la producció d'etilè ni en la taxa de respiració durant la maduració. El meló és una planta molt interessant per l'estudi de la maduració climatèrica del fruit perquè presenta varietats climatèriques i no climatèriques, que permeten el desenvolupament de poblacions de *Recombinant Inbred Lines* (RILs) i *Near-Isogenic Lines* (NILs) per l'estudi de la genètica de la maduració. Un estudi realitzat en una població de NILs amb fons genètic de la varietat no climatèrica *Piel de Sapo* i introgressions de la varietat no climatèrica *Songwhan Charmi*, va permetre la identificació de dos QTLs capaços de donar fenotip climatèric: *ETHQB3.5* (línia 1Q3) i *ETHQV6.3* (línia 1Q6). Quan els dos QTLs es trobaven junts (2Q36) es va observar que el fenotip del fruit era encara més climatèric que cada QTL independentment. Un tercer QTL es va identificar a partir d'una població de RILs amb fons genètic *Piel de Sapo* i introgressions de la varietat climatèrica *Védrantais*: *ETHQV8.1* (línia 1Q8).

L'objectiu d'aquest estudi ha estat crear una col·lecció de línies de meló amb totes les combinacions possibles dels 3 QTLs en homozigosi i heterozigosi. Per poder realitzar els creuaments, primer es van seleccionar les plantes homozigotes pels QTLs *ETHQB3.5* i *ETHQV8.1* (línia 2Q38) i pels QTLs *ETHQV6.3* i *ETHQV8.1* (línia 2Q68). D'una altra població es van seleccionar les plantes heterozigots pels QTLs *ETHQB3.5*, *ETHQV6.3* i *ETHQV8.1*. A partir d'aquestes línies seleccionades es van efectuar els creuaments pertinents amb altres línies ja fixades per obtenir totes les combinacions possibles dels 3 QTLs, obtenint fruits de molts d'ells. D'altra banda, durant el genotipat de les línies es va detectar una contaminació generalitzada de VED en el QTLETHQB3.5. Es va poder netejar obtenint noves plantes 1Q8 amb una sola introgressió.

Actualment l'estudi continua, s'estan realitzant els creuaments dels quals encara no s'ha obtingut fruit. Un cop es tinguin tots els fruits, es fenotiparan els trets relacionats amb la maduració del fruit. Finalment, s'extrauran les llavors per

poder estudiar l'any vinent les variacions que causen en el fenotip les diferents combinacions dels QTLs.

Paraules clau: meló, genotipat, maduració climatèrica i no climatèrica, *Single Nucleotide Polimorphism* (SNP), *Quantitative Trait Loci* (QTL), introgressió, *Recombinant Inbred Lines* (RILs), *Near-Isogenic Lines* (NILs).

3. Introducció

La maduració dels fruits carnosos

Els fruits carnosos aporten una gran quantitat de vitamines i nutrients en les dietes humanes d'arreu del món. El desenvolupament d'aquests fruits culmina amb l'etapa de maduració, on es produeixen una sèrie de canvis químics i fisiològics relacionats amb el color, la textura, el gust i l'aroma del fruit. Totes aquestes variacions provoquen que el fruit sigui més atractiu a ulls dels depredadors, facilitant la dispersió de les seves llavors (Giovannoni et al., 2017).

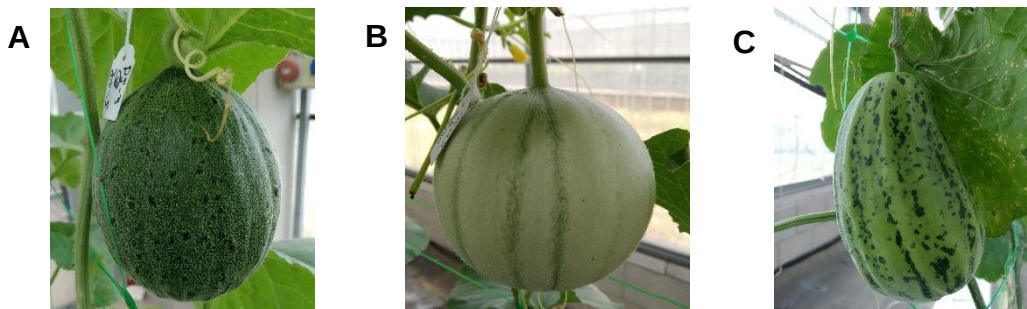
Depenent de les diferències en la taxa de respiració i en la producció d'etilè, els fruits carnosos es poden classificar entre climatèrics i no climatèrics. Els fruits climatèrics, com el tomàquet, el plàtan o la poma, mostren un augment en la taxa de respiració i un pic de producció d'etilè a l'inici de la maduració, suggerint que tenen una maduració dependent de l'etilè. Mentre que els fruits no climatèrics, com la maduixa, el raïm o la taronja, no presenten cap canvi significatiu en la taxa de respiració i la quantitat d'etilè produïda es manté a nivells basals (Cherian et al., 2014). Tot i així, estudis actuals demostren que la classificació entre climatèric i no climatèric no és absoluta. Així doncs s'ha vist que fruits típicament classificats com a no climatèrics com la maduixa i el raïm, presenten una producció d'etilè típica dels fruits climatèrics (Chen et al., 2018).

La planta més utilitzada com a model per l'estudi de la maduració climatèrica del fruit és la tomaquera. Té un cicle de vida curt, és diploide, és fàcil de transformar i cada planta produeix una gran quantitat de fruits. Com a planta climatèrica que és, la seva maduració s'inicia amb l'augment de la producció d'etilè i un increment de la taxa de respiració. Els canvis que causa la maduració en el tomàquet són la pèrdua de clorofil·la, l'acumulació de carotenoides, la pèrdua de fermesa de la polpa, l'alteració de l'acidesa, la conversió del midó a sucres i la producció d'aromes. S'ha observat que l'administració exògena d'etilè només inicia la maduració quan el fruit és competent per respondre a l'estímul, és a dir, quan les llavors ja són madures. L'obtenció de mutants en tomàquet ha permès identificar diferents gens responsables d'iniciar la maduració, com els codificants pels factors de transcripció *ripening-inhibitor (rin)*, *non-ripening (nor)* i *colorless*

non-ripening (cnr). La mutació d'aquests gens, tots reguladors positius, provoca la inhibició de la maduració (Giovannoni et al., 2017)

El meló

Actualment, l'estudi de la maduració en meló (*Cucumis melo* L.) ha despertat un gran interès ja que dins de la mateixa espècie coexisteixen varietats climatèriques i varietats no climatèriques. La planta del meló és una espècie diploide i es creu que la seva domesticació va començar a Àsia fa uns 4000 anys. Pertany a la família de les cucurbitàcies, juntament amb un miler més d'espècies (Pereira et al., 2018). Aquestes espècies es classifiquen en dues subespècies, *agrestis* i *melo*. Les principals varietats de meló que han estat objecte d'estudi



Imatge 1: Fotografies dels fruits de PS (A), VED (B) i SC (C).

són les varietats *Piel de Sapo* (PS), *Védrantais* (VED) i *Songwhan Charmi* (SC). La varietat PS (Imatge 1 A) és una varietat espanyola no climatèrica del grup *inodorus*. El seu fruit és gran, allargat i amb taques. Presenta la pell de color verd fosc i la polpa blanca. La varietat VED (Imatge 1 B) en canvi, és francesa i es classifica com a climatèrica. Es troba dins del grup *cantalupensis* i presenta uns fruits petits i circulars. El color de la polpa del meló és taronja i el de la pell blanc quan és immadur, mentre que quan madura passa a ser color crema. La varietat koreana SC (Imatge 1 C) és no climatèrica i es classifica dins del grup *chinensis*. Presenta fruits en forma de pera de color verd fosc i amb taques. La seva polpa és de color taronja (Pitrat et al., 2000).

Estudis en la varietat climatèrica VED, mitjançant l'obtenció de plantes transgèniques on s'havia silenciat el gen *CmACO1*, que codifica per un enzim involucrat en la síntesi d'etilè, van permetre determinar quins processos de la maduració són dependents de l'etilè i quins no en meló (Pech et al., 2008). Concretament es va observar que el perfil d'aromes, la formació de la capa d'abscisió i la degradació de clorofil·les són etilè dependents. En canvi,

l'acumulació de carotenoides, de sucres i la pèrdua d'acidesa són etilè independents. Alguns caràcters com la pèrdua de duresa de la polpa ve determinada per les dues vies (Pech et al., 2008).

La millora genètica

El desenvolupament de tècniques i mètodes biotecnològics, la reducció del cost de la seqüenciació i la disponibilitat de sistemes de tractament i anàlisi de dades han permès fer un salt en el millorament i l'estudi genètic dels cultius vegetals. Actualment el genoma del meló està seqüenciat (Garcia-Mas et al., 2012) i es troba disponible una versió millorada de l'assemblatge de seqüències (v3.6.1) i de l'anotació genòmica (v4.0) en la web <http://melonomics.net> (Ruggieri et al., 2018). Aquests coneixements, juntament amb la diversitat genètica que presenten les diferents varietats de meló, permeten estudiar les bases genètiques de caràcters agronòmics i organolèptics. Les poblacions que s'utilitzen per aquests estudis són principalment *Near Isogenic Lines* (NILs) i *Recombinant Inbred Lines* (RILs) (Figura 1). Les NILs es desenvolupen a partir del creuament entre dues línies parentals genèticament diferents. A la descendència se li realitza repetides vegades retrocreuaments amb l'objectiu de transferir una sola introgressió del parental donador al fons genètic del receptor. La col·lecció sencera de NILs representa el genoma complet del parental donador, permetent l'estudi individualitzat de *Quantitative Trait Locus* (QTL). Les RILs en canvi s'obtenen a partir del mètode *single seed descent* (SSD) a partir de la generació F2. El mètode SSD consisteix en plantar una sola llavor de cada meló obtingut en la F2, per després auto-pol·linitzar. Es repeteix aquest procés fins la F7 o F8 aproximadament, quan les línies presenten totes les introgressions en homozigosi. Les col·leccions de RILs són útils per identificar QTLs (Close et al., 2009).

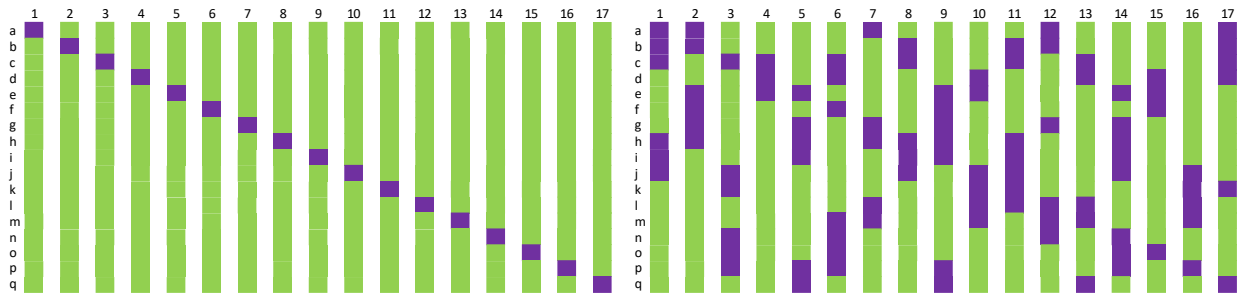


Figura 1: Representació d'un població de NILs (esquerre) i de RILs (dreta). Els números representen una regió del genoma i les lletres cada línia de plantes. El color verd indica el *background* genètic i el lila la introgressió

Per desenvolupar una població de NILs és necessari realitzar un genotipat dels individus, que es coneix com l'ús d'eines moleculars per determinar els polimorfismes d'una única planta en comparació amb altres individus o espècies. Actualment, un tipus de marcador molecular molt utilitzat és el basat en la detecció de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) mitjançant una PCR al·lel específica. Aquesta metodologia permet genotipar una gran quantitat de mostres amb alta resolució. Els SNPs són el tipus de polimorfismes més abundants en el genoma. Existeixen diferents assajos disponibles al mercat, com els xips d'Illumina Infinium BeadChip® i d'Affimetrix GeneChip®, capaços de genotipar milers de mostres i SNPs en un sol assaig (Close et al., 2009). Però per projectes a petita i gran escala una opció versàtil i econòmica és utilitzar KASPar™ *genotyping chemistry* de LGC (<https://www.biosearchtech.com>). Es fonamenta en una reacció de PCR competitiva, on intervenen dos encebadors *forward*

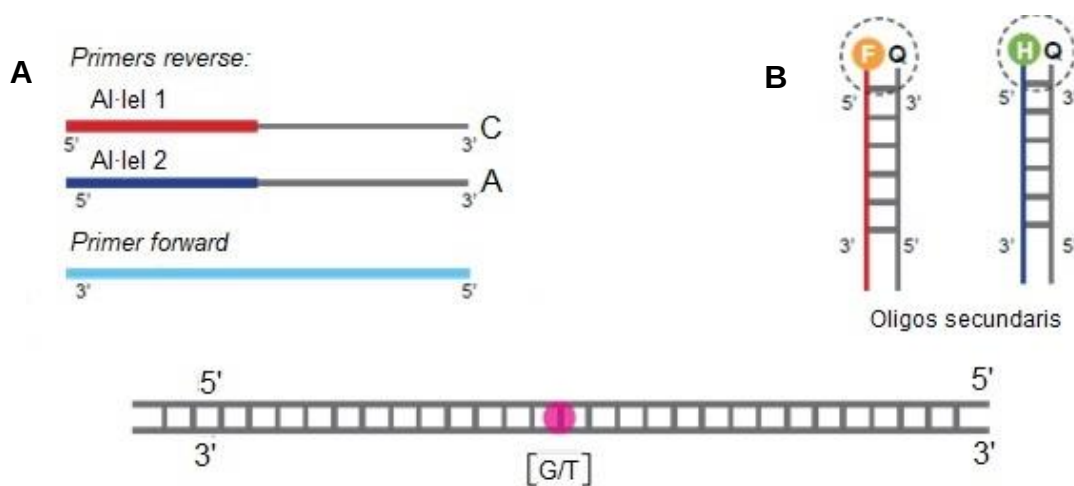


Figura 2: Esquema dels *primers* que participen en la KASPar. A, *encebadors reverse* i *forward*. B, *oligos secundaris* amb els fluoròfors i els *quenchers* units. C, seqüència diana. (Font: (Smith and Maughan, 2015))

específics, un per cada al·lel, un encebador *reverse* i dues seqüències d'oligonucleòtids (oligos) amb fluoròfors units que donen una senyal fluorescent específica per cada al·lel (Figura 2). Els encebadors *forward* tenen en el seu extrem 3' la base complementària a l'SNP, mentre que en l'extrem 5' tenen una cua d'oligonucleòtids homòlegs als oligos secundaris (Figura 2 A). Aquests oligos secundaris són universals i tenen unit un fluoròfor FAM o HEX, inicialment inhibits per un *quencher* (Figura 2 B). La Master Mix que facilita els laboratoris LGC conté els oligos secundaris i tots els reactius necessaris per dur a terme la PCR.

En el primer cicle d'amplificació (Figura 3 A) s'hibriden els encebadors *forward* als seus al·lells diana, obtenint un amplicó amb la cua 5' d'oligos. En el segon cicle, l'encebador *reverse* (Figura 3 B) sintetitza la cadena complementària a la cua 5' d'oligos, permetent als oligos secundaris hibridar-s'hi i amplificar el producte de la PCR en el tercer cicle (Figura 3 C). Quan els oligos queden incorporats en l'amplicó ja no estan sent inhibits pel *quencher*, per tant emeten fluorescència. En els següent cicles els oligos secundaris amplifiquen repetidament, augmentant la intensitat de la senyal. Quan la PCR finalitza es

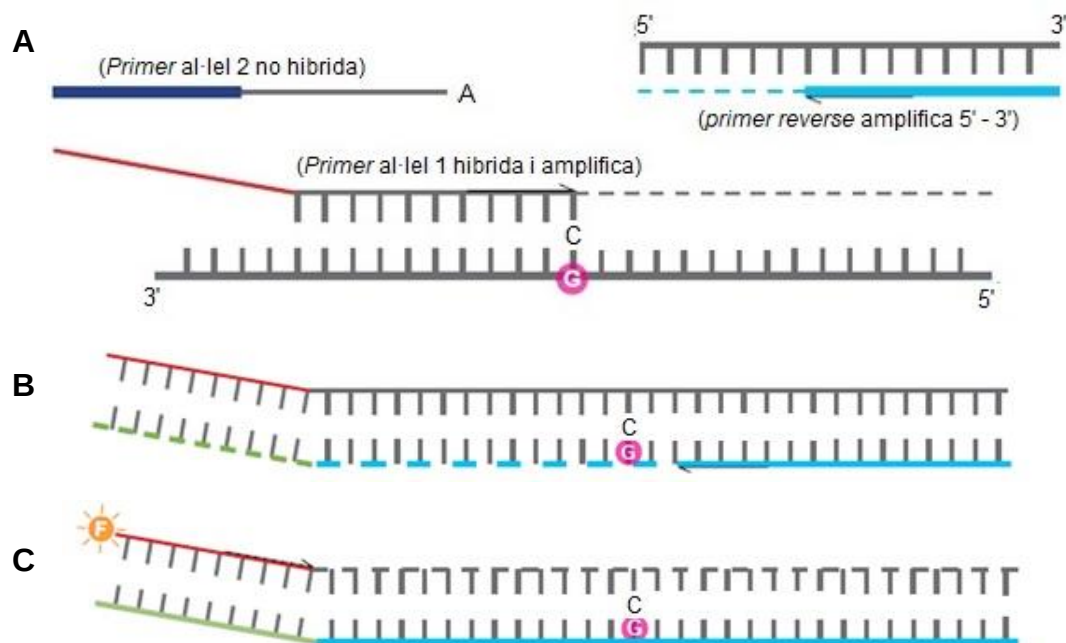


Figura 3: Esquema de les amplificacions de KASPar. A, primer cicle d'amplificació. B, segon cicle d'amplificació. C, tercer cicle d'amplificació. (Font: (Smith and Maughan, 2015))

llegeix la fluorescència i s'obté un gràfic on es veuen representades les mostres segons la intensitat de fluorescència de cada fluoròfor (Figura 4) (Smith and Maughan, 2015).

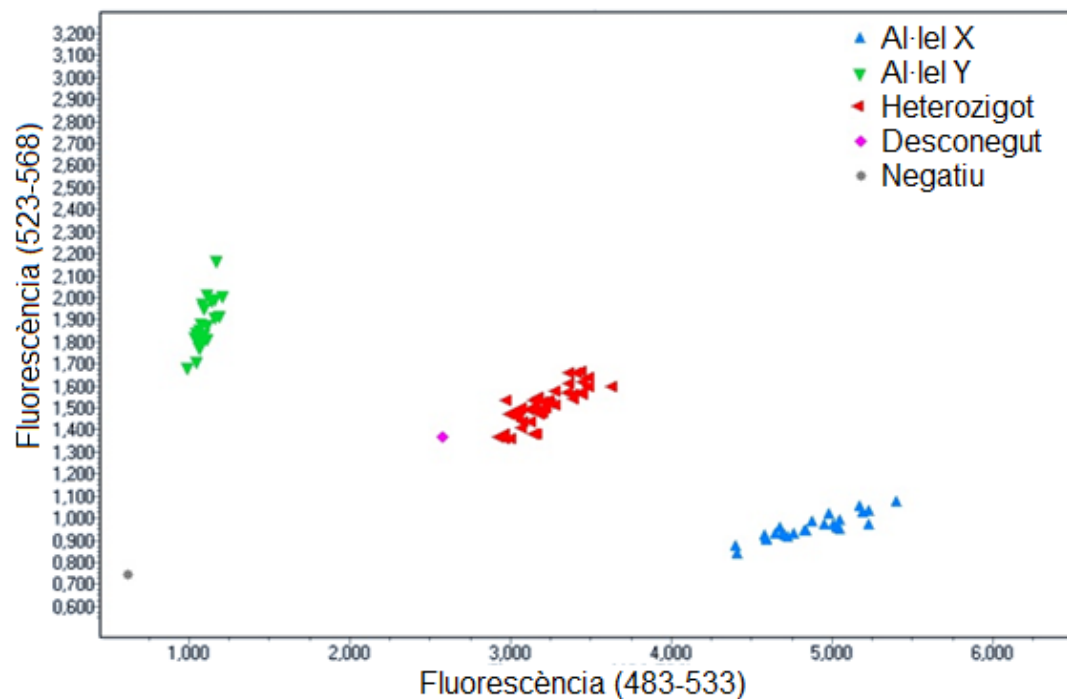


Figura 4: Representació dels resultats de KASPar segons el nivell de fluorescència emès per cada fluoròfor.

Del genotipat mitjançant KASPar d'individus diploides s'obté un gràfic amb tres núvols diferenciats (Figura 4). Els núvols de punts situats sobre els eixos X i Y corresponen als al·lels A i B, perquè l'amplicó de cada al·lel té un únic tipus de fluoròfor. Mentre que el núvol de punts situat sobre la perpendicular del gràfic són els individus heterozigots, ja que presenten un al·lel de cada i per tant un fluoròfor de cada.

Antecedents

L'estudi d'una població de NILs creada a partir de la varietat no climatèrica PS i la varietat no climatèrica PI 161375 (SC) va permetre la identificació de dos QTL, *ETHQB3.5* i *ETHQV6.3*, relacionats amb la maduració de fruit. La línia 8M35 presentava fenotip climatèric, indicant que la introgressió de SC en el cromosoma 3 del genoma de PS contenia un gen involucrat en la maduració del fruit. També es va observar un fenotip climatèric a la línia 8M40, que tenia una introgressió de SC en el cromosoma 6 del genoma de PS. Per estudiar l'efecte d'ambdós QTL es va obtenir la línia 8M31, que contenia el *ETHQB3.5* i *ETHQV6.3* en homozigosi. Els efectes del QTL *ETHQB3.5* (8M35) en el fenotip climatèric eren menys pronunciats que els de *ETHQV6.3* (8M40). En canvi, els fruits amb les

dues introgressions *ETHQB3.5* i *ETHQV6.3* (8M31), tenien un fenotip climatèric més marcat. La mesura del pic d'etilè de les línies va indicar que tant 8M35 com 8M40 es comportaven com a fruits climatèrics, essent capaces de produir un pic d'etilè (Figura 5). Pel que fa 8M31, el pic d'etilè es produïa abans i la quantitat produïda era major que en les línies que tenien un únic QTL. Per tant, la presència del dos QTL indueix una major síntesi d'etilè (Vegas et al., 2013).

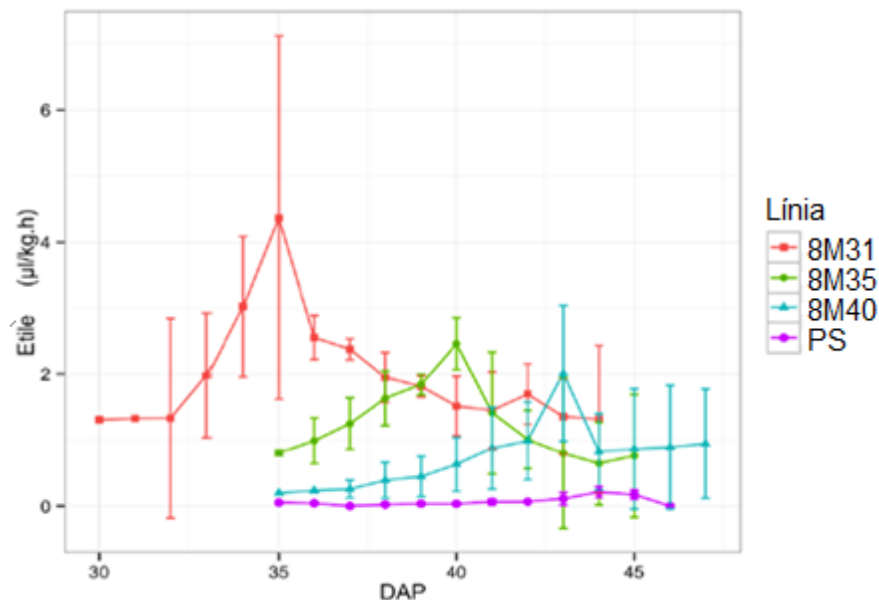


Figura 5: Producció d'etilè durant la maduració del fruit a les línies 8M31, 8M35, 8M40 i PS. DAP: dies després de la pol·linització. (Font: Vegas et al., 2013)

A partir de la realització d'un mapeig fi de *ETHQV6.3* (Ríos et al., 2017), es va poder validar el gen responsable de la maduració en aquest QTL: *MELO3C016540* (*CmNAC-NOR*). Aquest gen codifica per un factor de transcripció NAC, que correspon a l'ortòleg del gen *NOR* de tomàquet. El fet que els dos gens siguin ortòlegs indica que hi ha mecanismes comuns en el control de la maduració entre les dues espècies (Ríos et al., 2017). També es va realitzar el mapeig fi de *ETHQB3.5*, permetent identificar dos QTL: *ETHQB3.5.1* i *ETHQB3.5.2*, malgrat que encara no s'ha pogut clonar cap gen responsable (Pereira et al., 2018)

Per tal d'identificar altres QTL involucrats en la maduració climatèrica del meló, es va realitzar un experiment de mapeig de QTLs en una població de RILs desenvolupada a partir la varietat climatèrica VED i la varietat no climatèrica PS (Pereira et al., 2018). Gràcies a un mapa genètic d'alta densitat obtingut per Genotyping-by-Sequencing (GBS) i a les mesures d'etilè de la població de RILs,

es va poder detectar un QTL principal en el cromosoma 8, *ETHQV8.1* en un interval que conté 14 gens anotats.

4. Objectius

Sabent que la combinació dels QTL *ETHQB3.5* i *ETHQV6.3* augmenta el fenotip climàtic, i havent detectat un nou QTL, *ETHQV8.1*, relacionat amb la maduració climàtica del fruit de meló, l'objectiu principal d'aquest treball és obtenir una col·lecció de plantes que continguin totes les combinacions possibles entre els tres QTL, en homozigosi i heterozigosi, per poder analitzar les interaccions entre ells i el seu efecte durant la maduració climàtica del meló.

Els objectius específics d'aquest treball són:

1. Seleccionar plantes que tinguin els QTLs *ETHQB3.5* i *ETHQV8.1* en homozigosi, els QTLs *ETHQV6.3* i *ETHQV8.1* en homozigosi i els QTLs *ETHQB3.5*, *ETHQV6.3* i *ETHQV8.1* en heterozigosi, mitjançant el genotipat de SNPs.
2. Creuar les diferents plantes obtingudes per generar noves combinacions.

5. Metodologia

Material vegetal

Les llavors utilitzades en aquest estudi tenen el fons genètic de la varietat espanyola no climàtica PS, amb introgressions de la varietat Koreana no climàtica SC i/o la varietat francesa climàtica VED. Les llavors provenen d'una col·lecció de NILs obtingudes en anys anteriors (Taula 1). La línia que conté la introgressió de SC en el QTL *ETHQB3.5* del cromosoma 3 (1Q3) prové de la NIL 8M35 de (Vegas et al., 2013). En el mateix estudi es va obtenir la línia 8M40 que conté la introgressió de SC en el QTL *ETHQV6.3* (1Q6). La línia amb la introgressió de VED en el QTL *ETHQ8.2* (1Q8) prové d'una família d'una col·lecció d'ILs en desenvolupament (Pereira et al., 2018). La línia que conté les introgressions de SC dels dos QTLs *ETHQB3.5* i *ETHQV6.3* (2Q36) correspon a la NIL 8M31 de Vegas et al., 2013). A partir del creuament entre 1Q3 i 1Q8 i entre 1Q6 i 1Q8 es van obtenir plantes de meló amb les dues introgressions en

heterozigosi, 1Q3x1Q8 i 1Q6X1Q8 respectivament. Mitjançant l'autopol·linització de les plantes 1Q3x1Q8 i 1Q6X1Q8 es van obtenir les llavors utilitzades en aquest estudi (2Q38 i 2Q68). Finalment, les llavors 2Q36x1Q8 provenen del creuament entre les línies 2Q36 i 1Q8 (Figura 6).

Taula 1: Línies establertes utilitzades en l'estudi.

Línia	Fons genètic	Introgressió	ETHQB3.5	ETHQV6.3	ETHQV8.1
1Q3	PS	SC	Si	No	No
1Q6	PS	SC	No	Si	No
1Q8	PS	VED	No	No	Si
2Q36	PS	SC	Si	No	Si

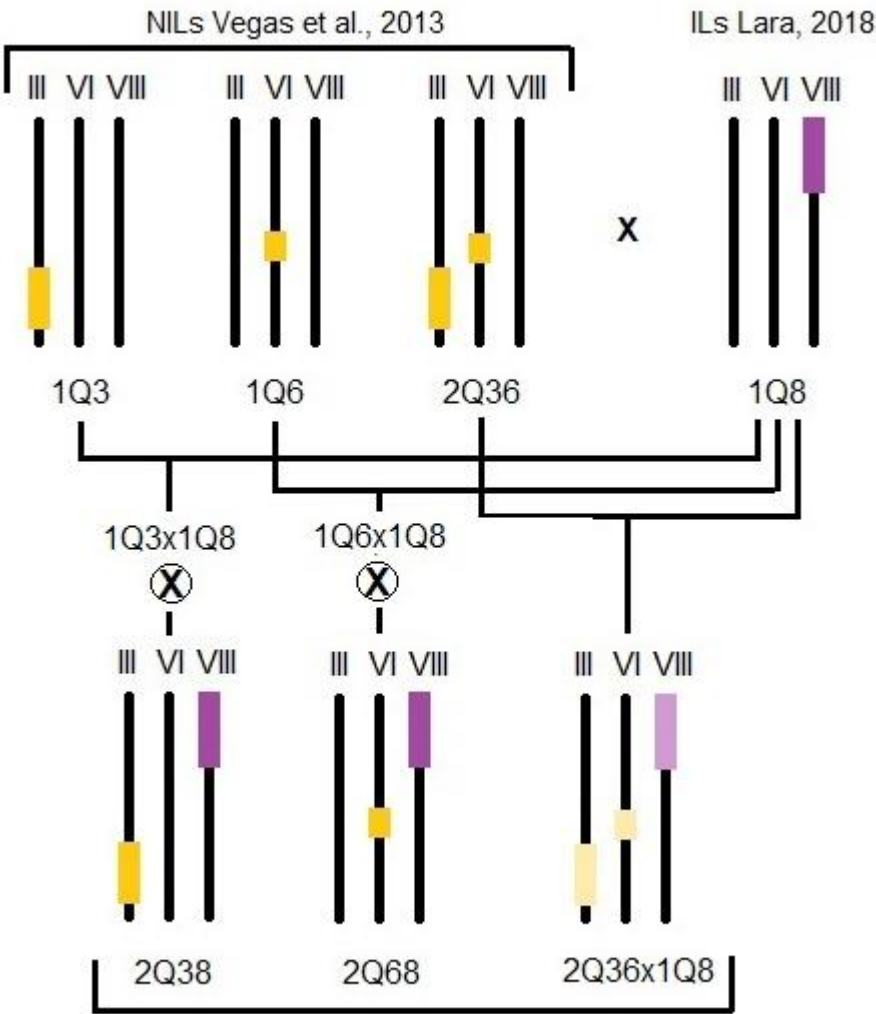


Figura 6: Esquema dels creuaments realitzats per obtenir les llavors de l'estudi. De cada línia es troben representats els cromosomes III, VI i VIII de PS amb les pertinents introgressions de SC (groc fosc homozigosi, groc clar heterozigosi) i VED (lila fosc homozigosi, lila clar heterozigosi).

Totes les llavors es van tractar prèviament amb el fungicida Merpan. Un cop fet el tractament, les llavors es van posar a germinar en plaques de petri humitejades amb paper de filtre dins de càmeres *in vitro* a 28°C, 12h/12h fosc/llum i durant una setmana. El substrat utilitzat per sembrar les llavors germinades es troba en proporcions 1:3:1 de vermiculita, substrat i perlita respectivament. De les línies de meló VED, 1Q3, 1Q6, 1Q8 i 2Q36 es van sembrar un total de 10 llavors, mentre que de la parental PS se'n van sembrar 15. Per obtenir les línies 2Q38 i 2Q68, es van segregar les famílies 1Q3x1Q8 i 1Q6x1Q8. Com que es volien seleccionar 12 plantes homozigotes pels dos QTLs, es van sembrar 192 llavors, tenint en compte una segregació mendeliana on s'esperen 1/16 de plantes homozigotes pels dos QTL. Per obtenir la línia 2Q368 en heterozigosi es van plantar 12 llavors provinents del creuament entre 2Q36x1Q8. Les plàntules de meló es van créixer als hivernacles del CRAG dins de cabines amb temperatura i llum controlades (22°C). Un cop genotipades i seleccionades, es van trasplantar als hivernacles de l'IRTA a Caldes de Montbui per continuar el creixement a planta adulta i produir els fruits.

Extracció de DNA i genotipat

L'extracció de DNA es va fer a partir de la fulla més jove de la planta i seguint el protocol Doyle et al., (1990) amb lleugeres modificacions. Les fulles es van triturar en plaques de 96 tubs, contenint una bola de tungstè/tub, amb el *Tissue Lyser* a temperatura ambient i amb 340 µl de tampó d'extracció (2 % CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH8), 20 mM EDTA, 0,2 % 2-mercaptoetanol. Autoclavar abans d'afegir 2-mercaptoetanol). L'operació amb el *Tissue Lyser* es va efectuar repetides vegades fins que les fulles quedaven completament triturades. Posteriorment es van posar els tubs 45 minuts en una estufa a 65 °C. Passat el temps, es van afegir 340 µl de cloroform isoamílic (24:1) i es va fer un vòrtex als tubs. Es van centrifugar a 3000 rpm durant 10 min, produint-se la separació de la mostra en tres fases. Acabada la centrifuga es van agafar 200 µl de la fase aquosa i es van posar en nous tubs, descartant la resta de mostra. Es van afegir 200 µl d'isopropanol a – 20 °C en els tubs nous i es van invertir suaument per facilitar la precipitació del DNA. Es van centrifugar els tubs durant 30 min a 3000 rpm. Vigilant que no es desprengués el DNA, es va eliminar el sobrenedant per inversió dels tubs. Seguidament es va efectuar un rentat amb

400 µl d'etanol al 70 %, centrifugant 10 min a 3000 rpm. Es va eliminar el sobrenedant per inversió dels tubs i es van deixar assecar en una centrífuga de buit, aproximadament durant 20 min. Finalment es va resuspendre el DNA amb 50 µl d'aigua MiliQ.

El genotipat es va fer mitjançant marcadors moleculars de tipus SNP, utilitzant la tècnica *KASPar SNP Genotyping System* (KBiosciences, Herts, UK). Es van utilitzar un total de 14 marcadors (Taula 2, dissenyats a partir de dades de reseqüenciació dels parentals i la posició física dels diferents QTL (Pereira et al., 2018). El disseny dels primers (Taula 3) es va fer amb el programa *Primer Picker* (KBiosciences), i es va comprovar l'especificitat fent un *Blast* contra el genoma del meló. La PCR es va realitzar en plaques de 384 pous, on en cada pou es produeix la reacció amb 1,89 µl d'aigua MiliQ, 0,11 µl d'encebadors, 4 µl de Master Mix i 2 µl de DNA diluït 1:4. L'amplificació es va fer en un termociclador LightCycler 480 (Roche). El programa de PCR (Taula 4) es divideix en 4 programes diferents: *hot-start*, *touch-down*, PCR i quantificació.

Taula 2: Nom i posició dels SNPs utilitzats pel genotipat. Es mostra l'al·lel de les varietats SC, VED i PS en l'SNP

QTL	CODI SNP	POSICIÓ SNP (VERSIÓ V3.6.1)		SC	VED	PS
		Parells de bases	Respecte QTL			
<i>ETHQB3.5*</i>	QTL3_5'	Chr03_24634711		C	C	T
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_2	Chr03_24792568		A	G	A
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_3	QTL3_3		C	C	T
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_4	Chr03_26757471		G	G	A
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_5	Chr03_27163070		T	T	C
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_6	Chr03_27675609		G	G	A
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_7	Chr03_28014057		T	T	C
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_8	Chr03_28484226		C	C	T
<i>ETHQB3.5*</i>	QTL3_3'	Chr03_28730284		C	C	A
<i>ETHQB3.5</i>	QTL3_9	Chr03_28759416		T	C	C
<i>ETHQV6.3*</i>	QTL6_	QTL6_		C	T	T
<i>ETHQ8.1*</i>	QTL8_5'	QTL8_5'		G	A	G
<i>ETHQ8.1*</i>	QTL8_3'	QTL8_3'		A	A	T

* Marcadors seleccionats per aquest estudi en concret

Taula 3: Llistat dels encebadors utilitzats amb les seqüències de l'encebador *forward* de l'al·lel A (A1), de l'al·lel B (A2) i el *reverse* (C1).

Codi SNP	Seqüència primers
QTL3_5'	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATGACAAAAAATCACTAATGAGCAAAAATC
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACATGACAAAAAATCACTAATGAGCAAAAATT
	C1 CGAAATGACAAAATATGCCGTTGGTGAAA
QTL3_3'	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAAGAATTGCCAAAAAGTTATCATGAAT
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAAGAATTGCCAAAAAGTTATCATGAAG
	C1 GGACATGTGGAGTAAAATATATTGCTTGAA
QTL3_2	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTACTAATTTTAGATTGCGATCTTTCATCA
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACTAATTTTAGATTGCGATCTTTCATCG
	C1 CACTATGCTTGATGGAATTTGTCCTTGTA
QTL3_3	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGAAGATGAATAACGAGAAGAAGATAAC
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAAGAAGATGAATAACGAGAAGAAGATAAT
	C1 ACTCGTCCATGAACCTCGAATCTTTATCTA
QTL3_4	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCACTTGCAAAAGTCGTTTTTCACATAAT
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCACTTGCAAAAGTCGTTTTTCACATAAC
	C1 ATGTGATAATAACCCATTCTCCAGATAAA
QTL3_5	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAGTTATTATTGCTATTAATTTTCCCACA
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAGTTATTATTGCTATTAATTTTCCCACG
	C1 CAATTATATGTGCTCACAAAAGAACTTGAA
QTL3_6	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATGGCACTACTAAATCATCATACCAC
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGGCACTACTAAATCATCATACCAT
	C1 AATTACGGTCTATTGGTTTTCAAATTTTGT
QTL3_7	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAACCAATAACTAAGGGGTGTCATGAT
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACCAATAACTAAGGGGTGTCATGAC
	C1 GTTGCTGTTGGTTTTGTTATTGTGATGTAT
QTL3_8	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCCAAACACGATTACTCTTTTCCCA
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCCAAACACGATTACTCTTTTCCCG
	C1 TAAACATGTTTCCTTTTTCGCTAATAGCAA
QTL3_9	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCACCATTACTATTGGATTGGACAG
	A2 GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGCACCATTACTATTGGATTGGACAA
	C1 AAAATCTGTTGGGGCAAAAGGTGATGTT
QTL6_	A1 GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGAGCTCCATTATTATTATTATCATTGT

	A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTAAGAGCTCCATTATTATTATTATCATTGC
	C1	TTTGCTTCAAGGAATAGTGGCCAACAATA
	A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATTTTCTCCCTCTCATTTTAATCCCTT
QTL8_5'	A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTCTCCCTCTCATTTTAATCCCTC
	C1	GAAGACAATTGTTTTAGTATTAGAAGTTAA
	A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATTTTGATGAGATTCTACAAGCAGCA
QTL8_3'	A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCATTTTGATGAGATTCTACAAGCAGCT
	C1	GATCTATACCCAAATTCCCACGGGAT

Bases en negreta: SNP. Bases en cursiva: seqüència híbrida l'encebador secundari marcat amb fluorescència

Taula 4: Condicions del programa de la PCR per genotipar SNPs amb KASPar

Programa	Cicles	Temperatura (°C)	Temps	Ramp rate	Quantificació	Sec Target (°C)	Step Size (°C)
Hot-start	1	94	00:15:00	4,4	No	0	0
Touch-down	10	94	00:00:20	4,4	No	0	0
		61	00:01:00	2,2	No	55	0,6
PCR	26	94	00:00:20	2,2	No	0	0
		55	00:01:00	2,2	No	0	0
Quantificació	1	37	00:01:00	2,2	No	0	0
		37	00:00:01	4,4	Sí	0	0

Obtenció dels creuaments i fenotipat dels melons

Per obtenir totes les combinacions possibles dels 3 QTL es van creuar les diferents línies seguint les dades indicades a la Taula 5. De cada planta es van pol·linitzar manualment entre 2 i 3 flors femelles, fins que es va obtenir un sol fruit per planta.

Taula 5: Esquema dels creuaments efectuats entre les línies de plantes del meló

Parenta	Parental	Genotip seleccionat de la descendència			Parenta	Parental	Genotip seleccionat de la descendència		
		l recep-	donant				l recep-	donant	
		ETHQB3.5	ETHQV6.3	ETHQ8.1			ETHQB3.5	ETHQV6.3	ETHQ8.1

tor de pol·len	de pol·len			
PS-1	PS-1			
PS-2	PS-2			
PS-3	PS-3	PS/PS	PS/PS	PS/PS
PS-4	PS-4			
PS-5	1Q3			
PS-6	1Q3	SC/PS	PS/PS	PS/PS
PS-7	1Q6			
PS-8	1Q6	PS/PS	SC/PS	PS/PS
PS-9	1Q8			
PS-10	1Q8	PS/PS	PS/PS	VED/PS
PS-11	2Q36			
PS-12	2Q36	SC/PS	SC/PS	PS/PS
PS-13	2Q38			
PS-14	2Q38	SC/PS	PS/PS	VED/PS
PS-15	2Q68			
PS-16	2Q68	PS/PS	SC/PS	VED/PS
1Q8-1	2Q38			
1Q8-2	2Q38	SC/PS	PS/PS	VED/VED
1Q8-3	2Q68			
1Q8-4	2Q68	PS/PS	SC/PS	VED/VED
1Q6-1	1Q6-1			
1Q6-2	1Q6-2	PS/PS	SC/SC	PS/PS
1Q6-3	PS			
1Q6-4	PS	PS/PS	SC/PS	PS/PS
1Q6-5	1Q8			
		PS/PS	SC/PS	VED/PS
1Q6-6	1Q8			
1Q6-7	2Q38			
		SC/PS	SC/PS	VED/PS
1Q6-8	2Q38			

tor de pol·len	de pol·len			
1Q3-1	1Q3-1			
1Q3-2	1Q3-2	SC/SC	PS/PS	PS/PS
1Q3-3	PS			
1Q3-4	PS	SC/PS	PS/PS	PS/PS
1Q3-5	1Q8			
1Q3-6	1Q8	SC/PS	PS/PS	VED/PS
1Q3-7	2Q38			
1Q3-8	2Q38	SC/SC	PS/PS	VED/PS
1Q3-9	2Q68			
1Q3-10	2Q68	SC/PS	SC/PS	VED/PS
2Q36-1	2Q36-1			
2Q36-2	2Q36-2	SC/SC	SC/SC	PS/PS
2Q36-3	1Q3			
2Q36-4	1Q3	SC/SC	SC/PS	PS/PS
2Q36-5	1Q6			
2Q36-6	1Q6	PS/PS	SC/SC	PS/PS
2Q36-7	2Q68			
2Q36-8	2Q68	SC/PS	SC/SC	VED/PS
2Q36-9	2Q38			
2Q36-10	2Q38	SC/SC	SC/PS	VED/PS
2Q38-1	2Q38-1			
2Q38-2	2Q38-2	SC/SC	PS/PS	VED/VED
2Q68-1	2Q68-1			
2Q68-2	2Q68-2	PS/PS	PS/PS	VED/VED
3Q368-1	3Q368-1			
3Q368-2	3Q368-2			
3Q368-3	3Q368-3	SC/SC	SC/SC	VED/VED
3Q368-5	3Q368-5			

1Q6-9	2Q68				3Q368-	3Q368-
		PS/PS	PS/PS	VED/PS	6	6
1Q6-10	2Q68				3Q368-	3Q368-
					7...15	7...15

Després de cada pol·linització es va anotar la data i es va posar un sobre a la flor per evitar creuaments no desitjats.

Anàlisi estadística

Per estimar si els resultats del genotipat s'ajustaven a la segregació mendeliana 1:2:1 es va realitzar la prova Khi quadrat (χ^2). La hipòtesi nul·la formulada era que les freqüències al·lèliques observades no diferien significativament de les proporcions 1:2:1, mentre que la hipòtesi alternativa plantejava que sí diferien significativament. El valor χ^2 es va calcular a partir de les freqüències al·lèliques observades i les freqüències esperades segons les proporcions mendelianes 1:2:1. Es va considerar un nivell de significació de 0,05 i 2 graus de llibertat ($v = \kappa - 1$, on $\kappa = 3$) per seleccionar el valor crític tabulat. Comparant el valor χ^2 i el valor crític es va determinar la hipòtesi a acceptar: si el valor χ^2 era més petit que el valor crític s'acceptava la hipòtesi nul·la, en canvi si era major s'acceptava la hipòtesi alternativa (Wilson and Hilferty, 1931).

6. Resultats

Selecció de plantes 2Q38

Es van sembrar un total de 192 llavors provinents de l'auto-pol·linització de la línia 1Q3x1Q8. Després de l'extracció de DNA de la fulla més jove de cada planta, es va genotipar amb la tècnica KASPar en dues plaques òptiques de 384 pous. En una placa es va amplificar amb els marcadors QTL3_5' i QTL3_3'; i en l'altre amb QTL8_5' i QTL8_3'. Com a controls es va utilitzar DNA dels parents, DNA de l'híbrid i un control negatiu amb aigua enlloc de DNA.

Els resultats del genotipat de les plantes 2Q38 es troben a la Taula S1 dels annexos. Per comprovar si seguien les proporcions mendelianes es va calcular

el χ^2 per determinar si hi havia una diferència significativa entre la freqüència teòrica (1:2:1) i la real (Taula 7).

Taula 7: Proporcions al·lèliques de cada marcador i els seus valors χ^2 .

Marcador		Al·lel A	H	Al·lel B	χ^2	Valor crític (95 % confiança)
		SC/VED		PS		
QTL3_5'	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	24,551	52,695	22,754	0,355	5,991
		SC/VED		PS		
QTL3_3'	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	98,947	0,526	0,526	291,640	5,991
		VED		PS/SC		
QTL8_5'	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	17,241	41,379	41,379	14,625	5,991
		VED/SC		PS		
ChrQTL8_3'	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	25,000	45,238	29,762	1,361	5,991

Les diferències significatives en les proporcions al·lèliques es troben indicades amb un *.

Els resultats pels marcadors QTL3_5' i QTL8_3' no presentaven una diferència significativa entre la freqüència al·lèlica teòrica i la real. En canvi, els resultats de QTL3_3' i QTL8_5' mostraven una diferència significativa en la seva proporció al·lèlica respecte l'esperada. En el marcador QTL3_3' cal subratllar que el 100 % de les plantes presentaven l'al·lel de SC o VED. Tenint en compte que les plantes genotipades provenien d'una població heterozigota pel *ETHQB3.5* de SC i pel *ETHQ8.1* de VED, que va ser auto-pol·linitzada, els resultats havien de ser segregants pels tres al·lells. Per tant, la presència de l'al·lel VED/SC fixat al cromosoma 3 era una contaminació. Per seleccionar plantes que no tinguessin aquesta contaminació es van genotipar de nou les 192 plantes 2Q38 utilitzant dos marcadors de la regió del *ETHQ3.5* per veure fins a on arribava la contaminació, QTL3_3 i QTL3_10, aquest últim permetria diferenciar entre SC i VED i descartar les plantes amb la contaminació no desitjada (Taula S2 annex 2).

Taula 8: Proporcions al·lèliques de cada marcador i els seus valors χ^2 .

Marcador		Al·lel A	H	Al·lel B	χ^2	valor crític (95 % confiança)
		SC/VED		PS		
QTL3_3	Freq teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq real	28,402	52,071	19,527	1,747	5,991
		SC/VED		PS		
QTL3_10	Freq teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq real	28,671	48,951	22,378	0,836	5,991

Les diferències significatives en les proporcions al·lèliques es troben indicades amb un *. Els resultats negatius o desconeguts i els controls parentals no es tenen en consideració pels càlculs

Les proporcions al·lèliques dels resultats dels marcadors no eren significativament diferents a les teòriques (Taula 8). S'observaven en els dos marcadors utilitzats la segregació esperada: $\frac{1}{4}$ homozigots per SC, $\frac{1}{4}$ homozigots per VED i $\frac{1}{2}$ heterozigots pels dos al·lells. Per tant amb els resultats d'aquest segon genotipat es van poder seleccionar les plantes que eren homozigotes SC en QTL3_3 i QTL3_10 i homozigotes VED en QTL8_5' i QTL8_3' (Taula 9).

Taula 9: Plantes seleccionades 2Q38

	QTL3_3	QTL3_10	QTL8_5'	QTL8_3'
Al·lel A	SC/VED	SC	VED	VED
Al·lel B	PS	PS/VED	PS/SC	PS/SC
Planta	QTL3_3	QTL3_10	QTL8_5'	QTL8_3'
2Q38_26	A	A	A	A
2Q38_86	A	A	A	A

El color groc fa referència a l'al·lel SC i el lila a l'al·lel VED.

De les 192 plantes genotipades únicament la 2Q38_26 i la 2Q38_86 presentaven les introgressions desitjades (Taula 9). Per tant van ser seleccionades i portades als hivernacles ubicats a Caldes de Montbui, propietat de l'IRTA.

Selecció de plantes 2Q68

Es van genotipar les 192 plantes provinents de l'auto-pol·linització de 1Q6x1Q8 en plaques òptiques de 384 pous. Es van utilitzar els marcadors QTL6_, situat en el gen MELO3C016540 per detectar *ETHQV6.3*, i els marcadors flanquejants de *ETHQ8.1* QTL8_5' i QTL8_3'. També es va genotipar amb l'SNP QTL3_3', on s'havia trobat la contaminació de VED. Els resultats del genotipat (Taula S3 annex 2) evidenciaven que la població 2Q68 també tenia una contaminació de VED en l'extrem 3' de *ETHQB3.5*.

Taula 10: Proporcions al·lèliques de cada marcador i els seus valors χ^2

Marcador		Al·lel A	H	Al·lel B	χ^2	valor crític (95 % confiança)
		SC/VED		PS		
QTL6_*	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	51,786	24,405	23,810	41,858	5,991
		SC/VED		PS		
QTL8_5'*	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	12,583	23,841	63,576	79,378	5,991
		VED		PS/SC		
QTL8_3'*	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	14,557	19,620	65,823	89,481	5,991
		VED/SC		PS		
QTL3_3'*	Freq. teòrica	25,000	50,000	25,000		
	Freq. real	6,024	14,458	79,518	158,557	5,991

Les diferències significatives en les proporcions al·lèliques es troben indicades amb un *. Els resultats negatius o desconeguts i els controls parentals no es tenen en consideració pels càlculs

Les proporcions al·lèliques dels resultats de tots els marcadors (Taula 10) eren significativament diferents als teòrics. Observant la taula S3 es va veure que cap al final de la taula gairebé totes les llavors eren PS en els marcadors QTL8_5', QTL8_3' i QTL3_3', superant el 50 %. En canvi en el marcador QTL6_ la majoria eren SC.

Es van escollir les plantes que eren PS en QTL3_3', SC en QTL6_ i VED en QTL8_5' i QTL8_3' (Taula 11), obtenint-ne únicament dues plantes: 2Q68_50 i

2Q68_69. Les dues plantes es van portar als hivernacles de l'IRTA, situats a Caldes de Montbui.

Taula 11: Plantes seleccionades 2Q68

	QTL3_3'	QTL6_	QTL8_5'	QTL8_3'
Al·lel A	VED/SC	SC	VED	VED/SC
Al·lel B	PS	PS/VED	PS/SC	PS
Planta	QTL3_3'	QTL6_	QTL8_5'	QTL8_3'
2Q68_50	B	A	A	A
2Q68_69	B	A	A	A

El color groc fa referència a l'al·lel SC i el lila a l'al·lel VED.

Selecció de plantes 1Q8

Les línies 1Q3x1Q8 i 1Q6x1Q8 presentaven un introgressió no desitjada de VED al final del QTL ETHQB3.5. El parental que tenien en comú aquestes dues línies era 1Q8, per tant per comprovar si 1Q8 tenia aquesta contaminació es va extreure el DNA i es van genotipar 4 de les 10 plantes que es tenien plantades. Es van utilitzar SNPs localitzats al llarg de tot el QTL *ETHQB3.5*: QTL3_5', QTL3_2, QTL3_3, QTL3_4, QTL3_5, QTL3_6, QTL3_7, QTL3_8 i QTL3_3'. Per cada marcador es van realitzar tres repeticions de cada planta.

Taula 12: Resultats del genotipat de les plantes 1Q8 en el QTL ETHQB3.5

	QTL3_5'	QTL3_2	QTL3_3	QTL3_4	QTL3_5	QTL3_6	QTL3_7	QTL3_8	QTL3_3'
Al·lel A	VED/SC	VED	VED/SC	VED/SC	VED/SC	VED/SC	VED/SC	VED/SC	VED/SC
Al·lel B	PS	PS/SC	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Planta	QTL3_5'	QTL3_2	QTL3_3	QTL3_4	QTL3_5	QTL3_7	QTL3_8	QTL3_9	QTL3_3'
1Q8_1	B	B	B	B	B	B	A	A	H
1Q8_2	B	B	B	B	B	B	A	A	H
1Q8_3	B	B	B	B	B	B	A	A	A
1Q8_4	B	B	B	B	B	B	A	A	H

El color verd fa referència a l'al·lel PS, el lila a l'al·lel VED i el blau l'heteroziot.

Els resultats del genotipat (Taula 12) van demostrar que la línia 1Q8 era la font de contaminació de VED a l'extrem 3' del QTL *ETHQB3.5*. Concretament, la introgressió es trobava entre els marcadors QTL3_6 i QTL3_3'. És important remarcar que, en les plantes analitzades, la introgressió es trobava fixada en QTL3_7 i QTL3_8, mentre que segregava en QTL3_3'. Per tant, la línia anomenada com a 1Q8 no es va utilitzar ja que no tenia una sola introgressió.

Per intentar recuperar la línia 1Q8 sense contaminacions al cromosoma tres, es van seleccionar plantes a partir de la població segregant de 1Q6x1Q8 que tenien l'al·lel PS en homozigosi en QTL3_3' i QTL6_ i l'al·lel VED en homozigosi en QTL8_5' i QTL8_3' (taula 13). En total es van obtenir 4 plantes únicament amb la introgressió de VED en el QTL *ETHQ8.1*: 2Q68_4, 2Q68_7, 2Q68_77 i 2Q68_188. Se'ls va canviar el nom a 1Q8_1, 1Q8_2, 1Q8_3 i 1Q8_4 i es van posar ens els hivernacles de l'IRTA a Caldes de Montbui.

Taula 13: Plantes seleccionades 2Q68

	QTL3_3'	QTL6_	QTL8_5'	QTL8_3'	
Al·lel A	VED/SC	SC	VED	VED/SC	
Al·lel B	PS	PS/VED	PS/SC	PS	
Planta	QTL3_3'	QTL6_	QTL8_5'	QTL8_3'	Nom
2Q68_4	B	B	A	A	1Q8_1
2Q68_7	B	B	A	A	1Q8_2
2Q68_77	B	B	A	A	1Q8_3
2Q68_188	B	B	A	A	1Q8_4

El color verd fa referència a l'al·lel PS i el lila a l'al·lel VED.

Selecció plantes 2Q36x1Q8

Les llavors 2Q36x1Q8 provenien del creuament entre 2Q36 i 1Q8. Es va extreure el DNA de les plantes i es van genotipar per comprovar que eren heterozigotes. L'objectiu d'aquesta línia era auto-pol·linitzar-les per obtenir en la generació següent plantes amb els tres QTLs en homozigosi.

Les 10 plantes van germinar a diferents temps. Això va fer que primer es genotipessin 9 plantes i més tard les 6 restants. En el primer genotipat es va

utilitzar el marcador QTL8_5' per comprovar que eren heterozigotes, mentre que en el segon el QTL6_. Les plantes 2Q68x1Q8_4 i 2Q68x1Q8_10 no es van genotipar perquè es van morir.

Els resultats dels dos genotipats (taula 14) indicaven que totes les plantes eren heterozigotes, tret de 2Q68x1Q8_9 i 2Q68x1Q8_11 que el marcador va donar negatiu (manca d'assignació de genotip). Per tant, es van portar les 13 heterozigotes als hivernacles de l'IRTA a Caldes de Montbui.

Taula 14: Resultats del genotipat de 2Q36x1Q8 en els QTLs *ETHQV6.3* i *ETHQV8.1*

QTL8_5'		QTL6_	
Al·lel A	VED	Al·lel A	SC
Al·lel B	PS/SC	Al·lel B	PS/VED
Planta	QTL8_5'	Planta	QTL6_
2Q68x1Q8_1	H	2Q68x1Q8_12	H
2Q68x1Q8_2	H	2Q68x1Q8_13	H
2Q68x1Q8_3	H	2Q68x1Q8_14	H
2Q68x1Q8_5	H	2Q68x1Q8_15	H
2Q68x1Q8_6	H		
2Q68x1Q8_7	H		
2Q68x1Q8_8	H		
2Q68x1Q8_9	-		
2Q68x1Q8_11	-		

El color blau fa referència a l'heterozigot.

Obtenció dels fruits dels creuaments

Gràcies a la selecció de les línies 1Q8, 2Q38, 2Q68 i 2Q36x1Q8 es van poder realitzar els creuaments necessaris per obtenir totes les combinacions possibles dels 3 QTLs, en homozigosi i heterozigosi. Les línies es van creuar seguint la taula 5, permetent el creixement d'un sol meló per planta i obtenint-ne dos del mateix genotip.

Actualment s'han obtingut els fruits presents en la taula 15. És important recalcar que s'han obtingut tots els melons provinents de l'auto-pol·linització de 2Q36x1Q8.

Taula 15: Fruits obtinguts dels creuaments realitzats.

Nombre plantes	Genotip seleccionat de la descendència		
	<i>ETHQB3.5</i>	<i>ETHQV6.3</i>	<i>ETHQ8.1</i>
1	PS/PS	PS/PS	PS/PS
2	SC/PS	PS/PS	PS/PS
1	SC/PS	PS/PS	VED/VED
2	PS/PS	SC/PS	VED/VED
1	PS/PS	SC/SC	PS/PS
2	PS/PS	SC/PS	PS/PS
2	PS/PS	SC/PS	VED/PS
1	SC/PS	SC/PS	VED/PS
1	PS/PS	SC/SC	VED/PS
1	SC/SC	SC/PS	PS/PS
2	SC/PS	SC/SC	VED/PS
1	SC/SC	PS/PS	VED/VED
2	PS/PS	SC/SC	VED/VED
13	SC/SC	SC/SC	VED/VED

7. Discussió

La correcta realització d'una piramidació de gens depèn en gran mesura de la disponibilitat de marcadors moleculars que permetin introgressar de forma ben definida les regions genòmiques d'interès. En aquest treball, la disponibilitat del genoma de meló, i de la reseqüenciació de les línies parentals, PS, VED i SC Garcia-Mas et al., (2012) ha permès la introgressió dirigida dels tres QTLs relacionats amb la maduració climatèrica del fruit.

El mètode utilitzat per genotipar va ser KASPar *genotyping*, una tècnica de *screening high-throughput*. És a dir, permet analitzar un gran nombre de mostres ràpidament i amb una alta resolució. Depenent de la seqüència que envolta l'SNP, a vegades alguns marcadors poden donar baixa fiabilitat tècnica, que s'observa quan el núvol de punts dels tres al·lels no estan ben definits. A nivell tècnic, tots els marcadors utilitzats en aquest estudi van funcionar correctament, tret del marcador QTL8_3'. L'encebador d'aquest marcador estava mal dissenyat per l'al·lel PS, ja que el núvol de punts no estava definit per aquest al·lel.

Les plantes 2Q38 per genotipar provenien del creuament entre 1Q3 i 1Q8. 1Q3 presentava una introgressió de SC (QTL *ETHQB3.5*) i 1Q8 una introgressió de VED (QTL *ETHQ8.1*). En realitzar el creuament i auto-pol·linitzar la descendència, s'esperaven obtenir una segregació dels dos QTLs (homozigots per l'al·lel A, homozigots per l'al·lel B i heterozigots pels dos al·lels) per cada marcador en les proporcions 1:2:1. En canvi, els resultats obtinguts del genotipat en el marcador QTL3_3' mostraven un sol genotip, fixat per l'al·lel A (100 %). En el marcador QTL3_3' l'al·lel A corresponia a SC i VED, mentre que l'al·lel B era PS. Per tant, la població 2Q38 presentava una introgressió de VED/SC enlloc de PS en QTL3_3'. En el creuament realitzat per originar la població 2Q38, 1Q3 era el donador de l'al·lel SC en el QTL *ETHQB3.5* mentre que 1Q8 era donador de l'al·lel PS. Per tant, el parental 1Q8 era qui presentava la contaminació de VED en QTL3_3'.

En el mateix genotipat de les plantes 2Q38, es va observar que els resultats en el marcador QTL8_5' presentaven una diferència significativa de les freqüències al·lèliques. En canvi, els resultats del marcador QTL8_3' no tenien cap diferència significativa en les proporcions al·lèliques. Això va ser degut a que l'encebador del marcador QTL8_3' subestimava l'al·lel B, distorsionant les segregacions reals. Per tant, si QTL8_3' hagués funcionat correctament, hauria donat una major freqüència d'al·lel B, igual que els resultats de QTL8_5'. Això indicava que l'al·lel de PS es veia afavorit en la segregació genètica comparat amb l'al·lel de VED.

En el segon genotipat de 2Q38 amb els marcadors QTL3_3 i QTL3_10 les proporcions al·lèliques dels resultats no eren significativament diferents a les mendelianes. D'altra banda, en la taula S2 de l'annex 2 es va observar un gran nombre de recombinacions entre aquests dos marcadors: 46 recombinacions simples i 6 dobles recombinacions (total de plantes: 128). Entre els dos marcadors hi havia 2.75 Mb. La taxa de recombinació entre aquests dos marcadors en el cromosoma 3 és d'aproximadament 32 cM (Pereira et al., 2018). Això significa que entre els marcadors QTL3_3 i QTL3_10 s'esperaria trobar uns 41 recombiants, que s'aproxima força al nombre observat. Cal remarcar que el meló és una espècie que té una elevada taxa de recombinació. Es coneix que la part central del cromosoma recombina en menor mesura que la resta, i aquesta disminució es veu més afectada en cromosomes llargs. El QTL *ETHQB3.5* es troba cap el final del braç llarg, regió que acostuma a recombinar més, com s'ha observat en aquest treball.

Les plantes 2Q68 provenien del creuament entre 1Q6, donador del QTL *ETHQV6.3* de SC, i 1Q8, donador del QTL *ETHQ8.1* de VED. Per tant, després d'auto-pol·linitzar F1 s'esperava obtenir una segregació dels dos QTLs en proporcions mendelianes 1:2:1. Els resultats del seu genotipat en canvi, presentaven diferències significatives en les proporcions al·lèliques de tots els marcadors utilitzats. Pel marcador QTL6_ es va observar que un 51,786 % eren al·lel SC, enlloc del 25 % esperat. Mentre que en els marcadors QTL8_5', QTL8_3' i QTL3_3' el percentatge d'al·lells PS eren 63,567 %, 65,823 % i 79,518 %, respectivament, molt més elevat de l'esperat. La causa d'aquestes proporcions va ser deguda a una mala pol·linització, ja que es va observar que la segona meitat de la taula S3 de l'annex 2 tenia l'al·lel SC fixat en QTL6_ i l'al·lel PS fixat en QTL8_5', QTL8_3' i QTL3_3'. Per tant, l'origen d'aquestes plantes vindria de dues plantes diferents, una que era correctament 1Q6x1Q8, i una altra que venia de l'autopol·linització de 1Q6. Quan es van descartar les plantes errònies (a partir 2Q68_80) i es va tornar a calcular χ^2 , es va observar que QTL3_3' i QTL8_3' tenien una segregació significativament diferent a la 1:2:1 (Annex 3). En canvi, QTL6_ i QTL8_5' presentaven la segregació esperada. Tenint en compte però que QTL8_5' tenia un alt nombre de resultats negatius,

es podria afirmar de nou que l'al·lel PS es veia afavorit en la segregació genètica respecte VED.

Pel que fa a la baixa freqüència de l'al·lel SC en el marcador QTL3_3' (11,756 %), l'explicació es va trobar en el genotipat de 1Q8. La línia 1Q8 provenia d'una població d'ILs, desenvolupada a partir del genotipat amb un gran nombre de marcadors distribuïts per tot el genoma (Pereira et al., 2018). Els resultats que s'han obtingut en aquest treball del genotipat de 1Q8 mostren que s'havia produït una introgressió de l'al·lel VED no desitjada entre els marcadors QTL3_6 i QTL3_3'. La contaminació de l'al·lel VED estava fixada en QTL3_7 i QTL3_8, mentre que segregava en QTL3_3'. L'absència dels segregants per l'al·lel PS segurament va ser degut al baix nombre de mostra analitzat. Per tant, els resultats indicaven que la línia 1Q8, utilitzada per obtenir 1Q3x1Q8 i 1Q6x1Q8, segregava per l'al·lel A en homozigosi, l'al·lel B en homozigosi i els dos al·lells en heterozigosi en el marcador QTL3_3'. Segons els resultats dels genotipats de 2Q38 i 2Q68, les plantes 1Q8 utilitzades per crear 2Q38 eren homozigots per VED en QTL3_3', ja que 2Q38 en QTL3_3' segregava en proporcions mendelianes. En canvi, per crear 2Q68 és possible que s'utilitzés una planta 1Q8 heterozigota pels al·lells VED i PS en QTL3_3' i una altra homozigota per PS i que les seves llavors es barreassin.

Les plantes 2Q36x1Q8 van ser creades a partir del creuament entre 2Q36 i 1Q8 per poder obtenir una línia amb els tres QTLs fixats. Per això primer calia obtenir el triple heterozigot PS/SC de *ETHQB3.5*, PS/SC de *ETHQV6.3* i PS/VED *ETHQV8*. No obstant, degut a la contaminació detectada a 1Q8 que aporta l'al·lel VED no desitjat al *ETHQB3.5*, el triple heterozigot tindrà VED/SC al marcador QTL3_3'. Per continuar amb l'estudi, les plantes 2Q36x1Q8 s'han d'autopol·linitzar. Per tant es podran seleccionar les homozigotes per l'al·lel SC en QTL3_3' i QTL6_, i homozigotes per l'al·lel VED en QTL8_5' i QTL8_3'.

Pel que fa als fruits dels creuaments obtinguts, es va observar que l'autopol·linització de les plantes va tenir més èxit que els creuaments amb altres línies. Possiblement es va deure a que no totes les plantes van treure flors alhora.

Per tant, si de dos plantes que s'havien de creuar, una tenia flor femenina i l'altra no tenia flors, no es podia realitzar cap pol·linització.

8. Conclusions i perspectives de futur

Per obtenir totes les combinacions possibles dels QTLs *ETHQB3.5*, *ETHQV6.3* i *ETHQV8.1* en homozigosi i heterozigosi primer es van haver de seleccionar les línies 2Q38, 2Q68 i 2Q36x1Q8. En el procés de selecció es va detectar la presència d'una contaminació de l'al·lel VED a l'extrem 3' del QTL *ETHQB3.5* de totes les línies, provinent de la línia 1Q8. Tot i aquest inconvenient, es van aconseguir seleccionar les combinacions al·lèliques dels tres QTLs desitjades: 2Q38, 2Q68, 2Q36x1Q8. A més es va poder aconseguir una nova línia 1Q8 neta de la contaminació del cromosoma 3.

L'objectiu d'aquest estudi era crear col·lecció de línies amb totes les combinacions possibles d'introgrossar els QTLs *ETHQB3.5*, *ETHQV6.3* i *ETHQV8.1*. Aquest objectiu s'ha assolit satisfactòriament, i alguns dels creuaments encara no han donat fruit, però l'estudi continua. Un cop s'obtinguin els fruits de tots els creuaments, es fenotiparan els caràcters relacionats amb la maduració climatèrica i s'extrauran les llavors. De manera que l'estiu vinent s'estudiaran els canvis que causen els diferents genotips en la maduració climatèrica.

8. Bibliografia

Chen, Y., Grimplet, J., David, K., Castellarin, S.D., Terol, J., Wong, D.C.J., Luo, Z., Schaffer, R., Celton, J.-M., Talon, M., Gambetta, G.A., Chervin, C., 2018. *Plant Sci.* 276, 63–72.

Cherian, S., Figueroa, C.R., Nair, H., 2014. *J. Exp. Bot.* 65, 4705–4722.

Close, T.J., Bhat, P.R., Lonardi, S., Wu, Y., Rostoks, N., Ramsay, L., Druka, A., Stein, N., Svensson, J.T., Wanamaker, S., Bozdog, S., Roose, M.L., Moscou, M.J., Chao, S., Varshney, R.K., Szűcs, P., Sato, K., Hayes, P.M., Matthews, D.E., Kleinhofs, A., Muehlbauer, G.J., DeYoung, J., Marshall, D.F., Madishetty, K., Fenton, R.D., Condamine, P., Graner, A., Waugh, R., 2009. *BMC Genomics* 10, 582.

Doyle, J.J., DOYLE, J.L., DOYLE, J.L., DOYLE, JJ, DOYLE, J.J., Doyle, J.L., DOYLE, J., Doyle, JJ, Doyle, JL, Doyle, JL, Doyle, JLJJ, Doyle, J.J., Doyle, J., DOYLE, JL., Doyle, LH, Hortoriun, L.B., Hortoriun, L., Doyle, L., Doyle, J.J.D.J.L.J.J., Doyle, J., L, Doyle, LJ, Doyle, Jennifer L, Doyle, J.J.T., Doyle, JJT, Doyle, JS, Doyle, JE, Doyle, LL, Doyle, M., Doyle, H., Dolye, J., 1990. *Focus* 12.

Garcia-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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11872–11877.

Giovannoni, J., Nguyen, C., Ampofo, B., Zhong, S., Fei, Z., 2017. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 61–84.

- Pech, J.C., Bouzayen, M., Latché, A., 2008. *Plant Sci.* 175, 114–120.
- Pereira, L., Pujol, J.M., Gunsé, B., Pereira, L., Abajo, G.-M., Barcelona, G., 2018. Genetic dissection of fruit quality and ripening traits in melon. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pitrat, M., Hanelt, P., Hammer, K., 2000. *Acta Hortic.* 29–36.
- Ríos, P., Argyris, J., Vegas, J., Leida, C., Kenigswald, M., Tzuri, G., Troadec, C., Bendahmane, A., Katzir, N., Picó, B., Monforte, A.J., Garcia-Mas, J., 2017. *Plant J.* 91, 671–683.
- Ruggieri, V., Alexiou, K.G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., Nonaka, S., Ezura, H., Latrasse, D., Boualem, A., Benhamed, M., Bendahmane, A., Cigliano, R.A., Sanseverino, W., Puigdomènech, P., Casacuberta, J.M., Garcia-Mas, J., 2018. *Sci. Rep.* 8, 8088.
- Smith, S.M., Maughan, P.J., 2015. *Methods Mol. Biol.* 1245, 243–256.
- Vegas, J., Garcia-Mas, J., Monforte, A.J., 2013. *Theor. Appl. Genet.* 126, 1531–1544.
- Wilson and Hilferty, 1931

9. Autoavaluació

A través d'aquest treball he posat en pràctica coneixements adquirits durant aquests 4 anys de grau. Gràcies a l'oportunitat que m'ha brindat el CRAG, he pogut realitzar aquest treball de Biotecnologia Vegetal. Trobo que gràcies a aquest treball, he refrescat conceptes de genètica i de biologia molecular que tenia una mica oblidats.

Vull agrair de tot cor a l'equip de l'IRTA per ajudar-me en tot el que he necessitat, i sobretot al Miguel Santo Domingo però deixar-me fer meu una part del seu projecte. Però per damunt de tot, donar les gràcies a la meva tutora professional, Marta Pujol, i a la meva tutora acadèmica, María Jesús Torija.

10. Annex

Taula S1: Resultats del primer genotipat de 1Q3x1Q8.

	QTL3_5'	QTL3_3'	QTL8_5'	QTL8_3'
Al·lel A	SC/VED	SC/VED	VED	VED/SC
Al·lel B	PS	PS	PS/SC	PS
Planta	QTL3_5'	QTL3_3'	QTL8_5'	QTL8_3'
2Q38_1	A	A	H	H
2Q38_2	H	A	A	A
2Q38_3	-	A	B	-
2Q38_4	A	A	H	H
2Q38_5	H	A	B	-
2Q38_6	B	A	H	H
2Q38_7	H	A	H	H
2Q38_8	-	A	H	H
2Q38_9	-	A	B	-
2Q38_10	H	A	H	A
2Q38_11	A	A	H	H
2Q38_12	A	A	B	B
2Q38_13	H	A	H	H
2Q38_14	H	A	H	H
2Q38_15	H	A	H	H
2Q38_16	-	A	A	A
2Q38_17	-	A	H	H
2Q38_18	B	A	A	A
2Q38_19	H	A	H	H
2Q38_20	H	A	B	-
2Q38_21	H	A	H	H
2Q38_22	H	A	A	A
2Q38_23	B	A	H	H
2Q38_24	A	A	B	B
2Q38_25	-	A	B	-

2Q38_26	A	A	A	A
2Q38_27	-	A	A	A
2Q38_28	H	A	H	H
2Q38_29	H	A	H	H
2Q38_30	H	A	B	B
2Q38_31	B	A	B	H
2Q38_32	B	A	H	H
2Q38_33	H	A	H	H
2Q38_34	H	A	A	A
2Q38_35	B	A	B	B
2Q38_36	H	A	H	H
2Q38_37	A	A	-	H
2Q38_38	A	A	B	B
2Q38_39	H	A	H	H
2Q38_40	H	A	H	H
2Q38_41	-	A	B	B
2Q38_42	H	A	H	H
2Q38_43	H	A	B	B
2Q38_44	A	A	H	H
2Q38_45	H	A	H	H
2Q38_46	A	A	B	B
2Q38_47	B	A	H	H
2Q38_48	H	A	B	B
2Q38_49	-	-	B	-
2Q38_50	H	A	B	B
2Q38_51	H	A	H	H
2Q38_52	B	A	H	H
2Q38_53	H	A	B	B
2Q38_54	A	A	A	A
2Q38_55	H	A	B	B
2Q38_56	B	A	H	H
2Q38_57	B	A	B	B
2Q38_58	B	A	B	B

2Q38_59	H	-	B	B
2Q38_60	-	A	B	-
2Q38_61	H	A	H	H
2Q38_62	H	A	-	-
2Q38_63	H	A	B	B
2Q38_64	A	A	H	-
2Q38_65	-	A	B	-
2Q38_66	H	A	B	B
2Q38_67	B	A	A	A
2Q38_68	-	A	B	-
2Q38_69	H	A	H	H
2Q38_70	H	A	H	-
2Q38_71	-	A	B	-
2Q38_72	B	A	H	H
2Q38_73	-	A	B	-
2Q38_74	A	A	H	H
2Q38_75	H	A	H	H
2Q38_76	H	A	B	B
2Q38_77	B	A	B	H
2Q38_78	H	A	A	A
2Q38_79	H	A	B	B
2Q38_80	A	A	A	H
2Q38_81	-	A	B	-
2Q38_82	H	A	B	B
2Q38_83	B	A	A	A
2Q38_84	H	A	H	H
2Q38_85	-	A	B	-
2Q38_86	A	A	A	A
2Q38_87	H	A	A	A
2Q38_88	-	H	B	-
2Q38_89	H	A	A	A
2Q38_90	B	A	B	B
2Q38_91	H	A	H	H

2Q38_92	A	A	B	B
2Q38_93	H	A	H	H
2Q38_94	H	A	H	H
2Q38_95	A	A	B	B
2Q38_96	-	A	B	B
2Q38_97	A	A	B	A
2Q38_98	A	A	B	B
2Q38_99	H	A	B	B
2Q38_100	H	A	-	H
2Q38_101	A	A	-	A
2Q38_102	A	A	B	H
2Q38_103	H	A	-	A
2Q38_104	A	A	H	H
2Q38_105	H	A	H	B
2Q38_106	B	A	B	B
2Q38_107	H	A	-	H
2Q38_108	A	A	-	H
2Q38_109	B	A	-	H
2Q38_110	H	A	B	B
2Q38_111	A	A	H	H
2Q38_112	H	A	H	-
2Q38_113	B	B	B	-
2Q38_114	A	A	A	-
2Q38_115	A	A	H	-
2Q38_116	H	A	A	A
2Q38_117	H	A	H	A
2Q38_118	H	A	B	B
2Q38_119	H	A	-	A
2Q38_120	B	A	A	A
2Q38_121	-	A	A	-
2Q38_122	H	A	H	H
2Q38_123	B	A	B	B
2Q38_124	H	A	A	A

2Q38_125	H	A	B	B
2Q38_126	B	A	A	A
2Q38_127	A	A	-	H
2Q38_128	-	A	H	A
2Q38_129	-	A	B	-
2Q38_130	A	A	H	A
2Q38_131	B	A	B	B
2Q38_132	B	A	B	B
2Q38_133	H	A	B	B
2Q38_134	H	A	H	H
2Q38_135	A	A	B	B
2Q38_136	H	A	H	H
2Q38_137	-	A	B	-
2Q38_138	-	A	B	A
2Q38_139	B	A	B	B
2Q38_140	B	A	B	B
2Q38_141	A	A	-	B
2Q38_142	B	A	B	B
2Q38_143	H	A	B	B
2Q38_144	B	A	B	B
2Q38_145	H	A	B	B
2Q38_146	A	A	H	H
2Q38_147	H	A	A	A
2Q38_148	H	A	H	A
2Q38_149	B	A	H	A
2Q38_150	B	A	B	B
2Q38_151	A	A	A	A
2Q38_152	H	A	H	H
2Q38_153	H	A	H	B
2Q38_154	A	A	H	H
2Q38_155	H	A	H	H
2Q38_156	B	A	A	A
2Q38_157	-	A	B	B

2Q38_158	B	A	H	H
2Q38_159	H	A	H	H
2Q38_160	B	A	-	H
2Q38_161	H	A	A	A
2Q38_162	H	A	-	H
2Q38_163	B	A	H	A
2Q38_164	A	A	H	H
2Q38_165	H	A	H	H
2Q38_166	H	A	H	A
2Q38_167	A	A	B	H
2Q38_168	-	A	B	A
2Q38_169	H	A	A	H
2Q38_170	H	A	H	H
2Q38_171	H	A	H	H
2Q38_172	H	A	H	H
2Q38_173	H	A	A	H
2Q38_174	A	A	H	H
2Q38_175	B	A	A	A
2Q38_176	H	A	-	H
2Q38_177	H	A	H	H
2Q38_178	H	A	A	A
2Q38_179	B	A	-	A
2Q38_180	B	A	-	H
2Q38_181	H	A	B	B
2Q38_182	H	A	-	A
2Q38_183	H	A	B	B
2Q38_184	A	A	H	A
2Q38_185	A	A	H	H
2Q38_186	A	A	H	H
2Q38_187	H	A	B	H
2Q38_188	A	A	A	A
2Q38_189	H	A	B	B
2Q38_190	H	A	B	B

2Q38_191	A	A	H	H
2Q38_192	B	A	-	H

El color groc fa referència a l'al·lel SC, el verd a PS, el lila VED i el blau a l'heterozigot. – indica resultat negatiu o desconegut.

Taula S2: Resultats del segon genotipat de 1Q3x1Q8

	QTL3_3	QTL3_10	QTL8_5'	QTL8_3'
Al·lel A	SC/VED	SC	VED	VED/SC
Al·lel B	PS	PS/VED	PS/SC	PS
Planta	QTL3_3	QTL3_10	QTL8_5'	QTL8_3'
2Q38_1	A	A	H	H
2Q38_2	H	H	A	A
2Q38_3	A	-	B	-
2Q38_4	A	H	H	H
2Q38_5	-	A	B	-
2Q38_6	B	B	H	H
2Q38_7	H	B	H	H
2Q38_8	H	H	H	H
2Q38_9	-	-	B	-
2Q38_10	H	H	H	A
2Q38_11	A	A	H	H
2Q38_12	A	A	B	B
2Q38_13	H	-	H	H
2Q38_14	H	H	H	H
2Q38_15	H	H	H	H
2Q38_16	H	B	A	A
2Q38_17	H	A	H	H
2Q38_18	B	A	A	A
2Q38_19	H	B	H	H
2Q38_20	H	H	B	-
2Q38_21	H	B	H	H
2Q38_22	H	H	A	A

2Q38_23	B	A	H	H
2Q38_24	A	H	B	B
2Q38_25	-	A	B	-
2Q38_26	A	A	A	A
2Q38_27	B	B	A	A
2Q38_28	H	H	H	H
2Q38_29	H	B	H	H
2Q38_30	H	A	B	B
2Q38_31	H	H	B	H
2Q38_32	H	H	H	H
2Q38_33	H	A	H	H
2Q38_34	H	H	A	A
2Q38_35	B	B	B	B
2Q38_36	H	H	H	H
2Q38_37	A	H	-	H
2Q38_38	A	A	B	B
2Q38_39	H	A	H	H
2Q38_40	H	H	H	H
2Q38_41	B	A	B	B
2Q38_42	H	H	H	H
2Q38_43	H	H	B	B
2Q38_44	A	A	H	H
2Q38_45	H	B	H	H
2Q38_46	A	H	B	B
2Q38_47	B	B	H	H
2Q38_48	H	H	B	B
2Q38_49	-	H	B	-
2Q38_50	H	H	B	B
2Q38_51	H	H	H	H
2Q38_52	B	H	H	H
2Q38_53	H	B	B	B
2Q38_54	A	H	A	A
2Q38_55	H	H	B	B

2Q38_56	H	H	H	H
2Q38_57	-	H	B	B
2Q38_58	B	B	B	B
2Q38_59	H	H	B	B
2Q38_60	-	-	B	-
2Q38_61	H	A	H	H
2Q38_62	H	H	-	-
2Q38_63	H	A	B	B
2Q38_64	H	B	H	-
2Q38_65	-	A	B	-
2Q38_66	H	A	B	B
2Q38_67	B	B	A	A
2Q38_68	-	A	B	-
2Q38_69	H	H	H	H
2Q38_70	H	H	H	-
2Q38_71	-	A	B	-
2Q38_72	B	B	H	H
2Q38_73	-	A	B	-
2Q38_74	A	A	H	H
2Q38_75	H	H	H	H
2Q38_76	H	H	B	B
2Q38_77	B	B	B	H
2Q38_78	H	A	A	A
2Q38_79	H	H	B	B
2Q38_80	A	H	A	H
2Q38_81	B	A	B	-
2Q38_82	H	A	B	B
2Q38_83	B	H	A	A
2Q38_84	H	B	H	H
2Q38_85	-	A	B	-
2Q38_86	A	A	A	A
2Q38_87	H	H	A	A
2Q38_88	-	A	B	-

2Q38_89	-	H	A	A
2Q38_90	-	A	B	B
2Q38_91	H	H	H	H
2Q38_92	A	A	B	B
2Q38_93	H	-	H	H
2Q38_94	H	H	H	H
2Q38_95	A	H	B	B
2Q38_96	-	H	B	B
2Q38_97	A	H	B	A
2Q38_98	H	A	B	B
2Q38_99	H	B	B	B
2Q38_100	H	H	-	H
2Q38_101	A	A	-	A
2Q38_102	A	H	B	H
2Q38_103	H	H	-	A
2Q38_104	A	A	H	H
2Q38_105	H	B	H	B
2Q38_106	B	B	B	B
2Q38_107	H	B	-	H
2Q38_108	A	B	-	H
2Q38_109	B	H	-	H
2Q38_110	H	H	B	B
2Q38_111	A	H	H	H
2Q38_112	H	A	H	-
2Q38_113	B	B	B	-
2Q38_114	A	A	A	-
2Q38_115	A	A	H	-
2Q38_116	H	H	A	A
2Q38_117	H	H	H	A
2Q38_118	H	H	B	B
2Q38_119	H	B	-	A
2Q38_120	B	H	A	A
2Q38_121	H	H	A	-

2Q38_122	H	B	H	H
2Q38_123	B	B	B	B
2Q38_124	H	H	A	A
2Q38_125	H	H	B	B
2Q38_126	B	H	A	A
2Q38_127	A	H	-	H
2Q38_128	H	H	H	A
2Q38_129	-	A	B	-
2Q38_130	A	H	H	A
2Q38_131	B	B	B	B
2Q38_132	B	B	B	B
2Q38_133	H	H	B	B
2Q38_134	H	H	H	H
2Q38_135	A	A	B	B
2Q38_136	B	B	H	H
2Q38_137	-	H	B	-
2Q38_138	A	A	B	A
2Q38_139	B	B	B	B
2Q38_140	B	A	B	B
2Q38_141	A	H	-	B
2Q38_142	B	H	B	B
2Q38_143	A	H	B	B
2Q38_144	H	H	B	B
2Q38_145	H	H	B	B
2Q38_146	A	-	H	H
2Q38_147	H	B	A	A
2Q38_148	H	-	H	A
2Q38_149	B	B	H	A
2Q38_150	B	-	B	B
2Q38_151	A	-	A	A
2Q38_152	H	-	H	H
2Q38_153	H	H	H	B
2Q38_154	A	-	H	H

2Q38_155	H	-	H	H
2Q38_156	H	-	A	A
2Q38_157	-	-	B	B
2Q38_158	B	-	H	H
2Q38_159	A	-	H	H
2Q38_160	A	-	-	H
2Q38_161	H	-	A	A
2Q38_162	H	-	-	H
2Q38_163	B	-	H	A
2Q38_164	A	-	H	H
2Q38_165	H	-	H	H
2Q38_166	-	-	H	A
2Q38_167	A	-	B	H
2Q38_168	A	-	B	A
2Q38_169	H	-	A	H
2Q38_170	H	-	H	H
2Q38_171	H	-	H	H
2Q38_172	H	-	H	H
2Q38_173	A	-	A	H
2Q38_174	A	-	H	H
2Q38_175	B	-	A	A
2Q38_176	H	-	-	H
2Q38_177	H	-	H	H
2Q38_178	H	-	A	A
2Q38_179	-	-	-	A
2Q38_180	B	-	-	H
2Q38_181	-	-	B	B
2Q38_182	-	-	-	A
2Q38_183	A	-	B	B
2Q38_184	A	-	H	A
2Q38_185	A	-	H	H
2Q38_186	A	-	H	H
2Q38_187	A	-	B	H

2Q38_188	A	-	A	A
2Q38_189	H	-	B	B
2Q38_190	-	-	B	B
2Q38_191	A	-	H	H
2Q38_192	B	-	-	H

El color groc fa referència a l'al·lel SC, el verd a PS, el lila VED i el blau a l'heterozigot. – indica resultat negatiu o desconegut.

Taula S3: Resultats del genotipat de 1Q6x1Q8

	QTL3_3'	QTL6_	QTL8_5'	QTL8_3'
Al·lel A	SC/VED	SC	VED	VED/SC
Al·lel B	PS	PS/VED	PS/SC	PS
Planta	QTL3_3'	QTL6_	QTL8_5'	QTL8_3'
2Q68_1	-	H	-	B
2Q68_2	-	B	-	B
2Q68_3	H	-	H	H
2Q68_4	B	B	A	A
2Q68_5	B	-	H	H
2Q68_6	H	H	H	-
2Q68_7	B	B	A	A
2Q68_8	B	B	B	B
2Q68_9	H	-	B	B
2Q68_10	H	H	H	H
2Q68_11	B	H	H	H
2Q68_12	H	H	H	H
2Q68_13	B	B	B	B
2Q68_14	B	A	-	H
2Q68_15	A	B	A	A
2Q68_16	A	A	A	A
2Q68_17	-	B	-	A
2Q68_18	H	H	B	B
2Q68_19	A	-	A	A
2Q68_20	H	B	-	B

2Q68_21	B	H	A	A
2Q68_22	B	-	H	H
2Q68_23	H	B	H	-
2Q68_24	-	-	H	-
2Q68_25	H	A	B	B
2Q68_26	H	B	A	A
2Q68_27	H	B	A	A
2Q68_28	H	A	B	B
2Q68_29	H	B	H	H
2Q68_30	H	A	B	B
2Q68_31	H	H	H	H
2Q68_32	-	A	-	-
2Q68_33	-	A	B	B
2Q68_34	B	H	B	B
2Q68_35	-	B	-	-
2Q68_36	H	H	H	H
2Q68_37	H	B	H	H
2Q68_38	H	A	H	H
2Q68_39	H	H	H	H
2Q68_40	H	B	A	A
2Q68_41	A	A	H	H
2Q68_42	H	H	A	A
2Q68_43	B	H	-	H
2Q68_44	-	A	-	A
2Q68_45	B	B	H	-
2Q68_46	H	H	H	H
2Q68_47	H	B	H	H
2Q68_48	A	-	-	B
2Q68_49	A	-	-	B
2Q68_50	B	A	A	A
2Q68_51	A	-	-	H
2Q68_52	B	H	H	H
2Q68_53	B	B	B	B

2Q68_54	B	H	B	B
2Q68_55	B	B	B	B
2Q68_56	B	H	A	A
2Q68_57	B	A	H	H
2Q68_58	B	H	B	B
2Q68_59	B	B	H	H
2Q68_60	B	A	H	A
2Q68_61	B	H	B	B
2Q68_62	-	A	H	H
2Q68_63	B	A	H	H
2Q68_64	B	A	-	-
2Q68_65	B	-	H	-
2Q68_66	B	H	B	B
2Q68_67	A	A	A	A
2Q68_68	B	H	B	B
2Q68_69	B	A	A	A
2Q68_70	B	H	B	B
2Q68_71	-	H	-	-
2Q68_72	-	B	-	-
2Q68_73	B	A	B	B
2Q68_74	B	H	B	B
2Q68_75	B	H	A	A
2Q68_76	B	B	H	H
2Q68_77	B	B	A	A
2Q68_78	B	H	H	H
2Q68_79	B	H	H	H
2Q68_80	B	B	B	B
2Q68_81	B	A	B	B
2Q68_82	B	A	B	B
2Q68_83	B	B	H	H
2Q68_84	-	-	-	B
2Q68_85	-	B	-	-
2Q68_86	B	H	H	H

2Q68_87	B	A	B	B
2Q68_88	-	H	-	-
2Q68_89	-	B	-	-
2Q68_90	B	A	B	B
2Q68_91	B	A	B	B
2Q68_92	B	A	B	B
2Q68_93	B	-	B	B
2Q68_94	-	B	-	H
2Q68_95	B	A	B	B
2Q68_96	-	B	-	B
2Q68_97	B	A	B	B
2Q68_98	B	A	B	B
2Q68_99	B	A	-	B
2Q68_100	-	A	B	B
2Q68_101	B	-	B	B
2Q68_102	-	B	-	-
2Q68_103	B	A	-	B
2Q68_104	B	-	B	B
2Q68_105	B	A	B	B
2Q68_106	B	A	B	B
2Q68_107	B	A	B	B
2Q68_108	B	A	B	B
2Q68_109	B	-	B	B
2Q68_110	B	A	B	B
2Q68_111	-	B	-	B
2Q68_112	B	A	-	B
2Q68_113	B	A	B	B
2Q68_114	B	A	B	B
2Q68_115	B	A	B	-
2Q68_116	B	A	B	B
2Q68_117	B	A	B	B
2Q68_118	B	A	B	B
2Q68_119	B	A	B	B

2Q68_120	B	A	B	B
2Q68_121	B	A	B	B
2Q68_122	H	H	-	B
2Q68_123	B	A	B	B
2Q68_124	B	H	B	B
2Q68_125	B	A	B	B
2Q68_126	B	-	B	B
2Q68_127	B	A	B	B
2Q68_128	B	-	-	B
2Q68_129	-	B	-	-
2Q68_130	B	A	B	B
2Q68_131	B	-	B	B
2Q68_132	B	A	B	B
2Q68_133	B	A	B	B
2Q68_134	B	A	B	B
2Q68_135	B	A	-	-
2Q68_136	B	A	B	B
2Q68_137	B	A	B	B
2Q68_138	B	A	B	B
2Q68_139	-	-	-	-
2Q68_140	B	-	B	B
2Q68_141	B	A	B	B
2Q68_142	B	A	B	B
2Q68_143	B	A	B	B
2Q68_144	B	A	-	B
2Q68_145	B	A	B	B
2Q68_146	-	B	-	-
2Q68_147	B	A	B	B
2Q68_148	B	A	B	B
2Q68_149	B	A	B	B
2Q68_150	B	A	B	B
2Q68_151	B	A	B	B
2Q68_152	B	A	B	B

2Q68_153	B	A	B	B
2Q68_154	B	A	B	B
2Q68_155	B	A	B	B
2Q68_156	B	A	B	B
2Q68_157	B	A	B	B
2Q68_158	B	A	B	B
2Q68_159	B	A	B	B
2Q68_160	B	-	B	-
2Q68_161	B	H	-	B
2Q68_162	B	A	B	B
2Q68_163	B	A	B	B
2Q68_164	B	A	B	B
2Q68_165	B	A	B	B
2Q68_166	B	A	B	B
2Q68_167	B	A	B	-
2Q68_168	B	A	B	-
2Q68_169	A	B	-	-
2Q68_170	A	B	-	-
2Q68_171	-	B	-	-
2Q68_172	B	H	-	A
2Q68_173	B	-	A	A
2Q68_174	B	A	B	B
2Q68_175	B	A	-	B
2Q68_176	B	A	B	-
2Q68_177	-	B	-	-
2Q68_178	B	A	H	H
2Q68_179	-	B	-	-
2Q68_180	B	B	B	B
2Q68_181	B	H	B	B
2Q68_182	B	-	H	-
2Q68_183	B	H	B	-
2Q68_184	B	-	H	-
2Q68_185	B	H	H	H

2Q68_186	B	H	H	-
2Q68_187	B	H	B	B
2Q68_188	B	B	A	A
2Q68_189	B	H	B	B
2Q68_190	B	A	B	-
2Q68_191	B	H	B	-
2Q68_192	B	H	A	A

El color groc fa referència a l'al·lel SC, el verd a PS, el lila VED i el blau a l'heterozigot. – indica resultat negatiu o desconegut.

Taula S4: Proporcions al·lèliques de cada marcador i els seus valors χ^2

Marcador		Al·lel A	H	Al·lel B	khi quadrat	valor crític (95 % confiança)
SC/VED				PS		
QTL3_3'	Freq. teòric	25.000	50.000	25.000		
	Freq real	11.765	33.824	54.412	46.843	5.991
SC/VED				PS		
QTL_6	Freq teòric	25.000	50.000	25.000		
	Freq real	27.536	39.130	33.333	5.398	5.991
VED				PS/SC		
QTL8_5'	Freq teòric	25.000	50.000	25.000		
	Freq real	25.000	45.313	29.688	1.318	5.991
VED/SC				PS		
QTL8_3'	Freq teòric	25.000	50.000	25.000		
	Freq real	27.536	37.681	34.783	7.120	5.991

*Indica els resultats amb una segregació significativament diferent ala 1:2:1.