

# Evaluación del tamaño del genoma y estudio de la ploidía en una colección de berenjenas cultivadas y especies silvestres relacionadas



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

INSTITUTO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA AGRODIVERSIDAD VALENCIANA

MÁSTER EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

Autor: D. Juan P. Bracho Gil

Tutor: Prof. Dr. Santiago Vilanova Navarro

Director experimental: D. Edgar García Fortea



El/los Doctor/es D./D<sup>a</sup>. Santiago Vilanova Navarro profesor/es del Master Oficial Interuniversitario en Mejora Genética Vegetal, en calidad de director/es del Trabajo de Fin de Máster, por la Presente,

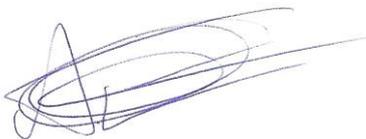
**RECONOCE/N**

Que el Trabajo Fin de Máster realizado por el/la alumno/a D./D<sup>a</sup>.: Juan Pablo Bracho Gil, con el título: "Evaluación del tamaño del genoma y estudio de la ploidía en una colección de berenjenas cultivadas y especies silvestres relacionadas" y realizado bajo mi/nuestra dirección, reúne las condiciones necesarias para completar la formación del alumno y por tanto,

**AUTORIZA/N**

La presentación del citado Trabajo Final de Máster para su defensa ante el correspondiente Tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos así lo firma/n,



Fdo: Santiago Vilanova Navarro

Máster Oficial en Mejora Genética Vegetal

Valencia, 01 de Julio de 2019

**Evaluación del tamaño del genoma y estudio de la ploidía en una colección de berenjenas cultivadas (*S. melongena*) y especies silvestres relacionadas.**

**Abstract:** Flow cytometry has allowed a highly accurate measurement of genome size before the sequencing era. Cytometry histograms permit the inference of genome size by comparing with an internal control with previously known genome size. This laboratory technique also allows the study of the level of ploidy in biological tissues. The distribution and ploidy of nuclear DNA in a cell population is obtained comparing the number of events among peaks.

On a worldwide level, eggplant (*Solanum melongena*) is among the main horticultural crops. Nevertheless, genome size variability inside the specie and among wild relatives has not been researched. Because of the aforementioned situation, this master's dissertation project focuses on evaluating several wild relatives and cultivar accessions.

On the other hand, there is great interest in seedless eggplants from an economic standpoint of view due to the reduction in bitterness, a smoother texture and a longer shelf-life. An efficient way of attaining this objective is through the production of triploid plants. To achieve them it is imperative to obtain tissues that have cells with different ploidy levels. It is necessary to evaluate possible ploidy changes in regenerated plants from *in vitro* explants (hypocotyl, cotyledon and true leaf) through organogenesis. Beforehand this situation is theoretically possible because there is factual proof that polysomaty exists in the plant kingdom.

In the aftermath, we humbly hope to acquire the knowledge to develop an efficient method of production for polyploid plants avoiding altogether antimitotic agents such as colchicine and oryzalin. This is possible if one properly harnesses the natural ploidy diversity found in cell populations located within plant tissues or artificially produced by means of *in vitro* culture.

**Resumen:** La citometría de flujo ha permitido estimar el tamaño de los genomas incluso antes de que estos fueran secuenciados. A partir de las lecturas obtenidas por citometría de flujo se puede inferir el tamaño de genoma utilizando un control interno donde se conozca la cantidad de DNA por núcleo. Otra aplicación de la citometría de flujo es la estimación del nivel de ploidía. La distribución y ploidía del DNA nuclear, dentro de una población celular, se obtiene comparando el número de eventos entre los diferentes picos o agrupaciones.

La berenjena (*Solanum melongena*) se encuentra entre las principales hortalizas producidas a nivel mundial, sin embargo, la variabilidad del tamaño de su genoma dentro de especie y entre sus especies silvestres relacionadas no ha sido estudiada todavía. Por ello en el presente trabajo se propone realizar esta evaluación utilizando diferentes accesiones de berenjena tanto cultivada como silvestres.

Por otra parte, la obtención de frutos sin semillas tiene un gran interés comercial debido a que sus frutos presentan una reducción del amargor, una textura más uniforme y una mayor vida post-cosecha. Una manera eficaz de conseguir este objetivo de mejora es mediante la obtención de plantas triploides. Para ello es imprescindible obtener células que presentan diferentes niveles de ploidía. Por ese motivo, un segundo objetivo del trabajo consistirá en la evaluación de los cambios en la ploidía de plantas regeneradas *in vitro* estudiando potenciales fenómenos de polisomatía a partir de distintos tejidos de plántulas de berenjena.

Mediante este conocimiento esperamos poder desarrollar un método de producción de poliploides, sin utilizar agentes antimitóticos como la colchicina o la orizalina bien explotando la diversidad encontrada en poblaciones naturales o la producida mediante el cultivo *in vitro*.

**Resum:** La citometria de flux ha permés estimar la grandària dels genomes inclús abans de que estos foren seqüenciats. A partir de les lectures obtingudes per citometria de flux es pot inferir la grandària de genoma utilitzat un control intern on es conega la quantitat de ADN per nucli. Una altra aplicació de la citometria de flux és l'estimació del nivell de ploidia. La distribució i ploidia del ADN nuclear, dins d'una població cel·lular, s'obté comparant el nombre d'esdeveniments entre els diferents pics o agrupacions. L'albergina (*Solanum melongena*) es troba entre les principals hortalisses produïdes a nivell mundial, no obstant això, la variabilitat de la grandària del seu genoma dins d'espècie i entre les seues espècies silvestres relacionades no ha sigut estudiada encara. Per això en el present treball es proposa realitzar esta avaluació utilitzant diferents accessions d'albergina tant cultivada com silvestres.

D'altra banda, l'obtenció de fruits sense llavors té un gran interès comercial pel fet que els seus fruits presenten una reducció de l'amargor, una textura més uniforme i una major vida post-collita. Una manera eficaç d'aconseguir este objectiu de millora és per mitjà de l'obtenció de plantes triploides. Per a això és imprescindible obtindre cèl·lules que presenten diferents nivells de ploidia. Per eixe motiu, un segon objectiu del treball consistirà en l'avaluació dels canvis en la ploidia de plantes regenerades *in vitro* estudiant potencials fenòmens de polisomatia a partir de distints teixits de plàntules d'albergina. Per mitjà d'este coneixement esperem poder desenrotllar un mètode de producció de poliploides, sense utilitzar agents antimitòtics com la colchicina o l'orizalina bé explotant la diversitat trobada en poblacions naturals o la produïda per mitjà del cultiu *in vitro*.

**Key words:** *Solanum melongena*, cytometry, ploidy, polysomaty, *in vitro*.

**Palabras claves:** *Solanum melongena*, citometría, plodía, polisomatía, tetraploides, *in vitro*.

**Paraules clau:** *Solanum melongena*, citometria, plodia, polisomatia, tetraploides, *in vitro*.

**Estudiant:** D. Juan P Bracho Gil

**Tutor acadèmic:** Prof. Dr. Santiago Vilanova Navarro

**Tutor experimental:** D. Edgar García Fortea

**FORMULARIO DEPÓSITO TRABAJO FINAL DE MÁSTER**

<b>AUTOR</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE
	Bracho	Gil	Juan Pablo	Y2001301-Q
<b>DIRECTOR/ES</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	
	Vilanova	Navarro	Santiago	
<b>UNIVERSIDAD</b>		<b>MÁSTER</b>		
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA		Mejora Genética Vegetal		
<b>TÍTULO DE LA TESIS</b>				
Evaluación del tamaño del genoma y estudio de la ploidía en una colección de berenjenas cultivadas y especies silvestres relacionadas				
<b>RESUMEN</b>	<p>La citometría de flujo ha permitido estimar el tamaño de los genomas incluso antes de que estos fueran secuenciados. A partir de las lecturas obtenidas por citometría de flujo se puede inferir el tamaño de genoma utilizado un control interno donde se conozca la cantidad de DNA por núcleo. Otra aplicación de la citometría de flujo es la estimación del nivel de ploidía. La distribución y ploidía del DNA nuclear, dentro de una población celular, se obtiene comparando el número de eventos entre los diferentes picos o agrupaciones.</p> <p>La berenjena (<i>Solanum melongena</i>) se encuentra entre las principales hortalizas producidas a nivel mundial, sin embargo, la variabilidad del tamaño de su genoma dentro de especie y entre sus especies silvestres relacionadas no ha sido estudiada todavía. Por ello en el presente trabajo se propone realizar esta evaluación utilizando diferentes accesiones de berenjena tanto cultivada como silvestres.</p> <p>Por otra parte, la obtención de frutos sin semillas tiene un gran interés comercial debido a que sus frutos presentan una reducción del amargor, una textura más uniforme y una mayor vida post-cosecha. Una manera eficaz de conseguir este objetivo de mejora es mediante la obtención de plantas triploides. Para ello es imprescindible obtener células que presentan diferentes niveles de ploidía. Por ese motivo, un segundo objetivo del trabajo consistirá en la evaluación de los cambios en la ploidía de plantas regeneradas in vitro estudiando potenciales fenómenos de polisomatía a partir de distintos tejidos de plántulas de berenjena.</p> <p>Mediante este conocimiento esperamos poder desarrollar un método de producción de poliploides, sin utilizar agentes antimitóticos como la colchicina o la orizalina bien explotando la diversidad encontrada en poblaciones naturales o la producida mediante el cultivo in vitro.</p> <p>(español)</p>			
	<p>Flow cytometry has allowed a highly accurate measurement of genome size before the sequencing era. Cytometry histograms permit the inference of genome size by comparing with an internal control with previously known genome size. This laboratory technique also allows the study of the level of ploidy in biological tissues. The distribution and ploidy of nuclear DNA in a cell population is obtained comparing the number of events among peaks.</p>			

	<p>On a worldwide level, eggplant (<i>Solanum melongena</i>) is among the main horticultural crops. Nevertheless, genome size variability inside the specie and among wild relatives has not been researched. Because of the aforementioned situation this master's dissertation project focuses on evaluating several wild relatives and cultivar accessions. On the other hand, there is great interest in seedless eggplants from an economic standpoint of view due to the reduction in bitterness, a smoother texture and a longer shelf-life. An efficient way of attaining this objective is through the production of triploid plants. To achieve them it is imperative to obtain tissues that have cells with different ploidy levels. It is necessary to evaluate possible ploidy changes in regenerated plants from in vitro explants (hypocotyl, cotyledon and true leaf) through organogenesis. Beforehand this situation is theoretically possible because there is factual proof that polysomaty exists in the plant kingdom.</p> <p>In the aftermath, we humbly hope to acquire the knowledge to develop an efficient method of production for polyploid plants avoiding altogether antimetabolic agents such as colchicine and oryzalin. This is possible if one properly harnesses the natural ploidy diversity found in cell populations located within plant tissues or artificially produced by means of in vitro culture.</p> <p>(inglés)</p>												
<b>PALABRAS CLAVE</b>	DESCRIPTORES EN ESPAÑOL												
	Solanum melongena ; citometría ; polisomatía (mínimo tres)												
	DESCRIPTORES EN INGLÉS												
	Solanum melongena ; cytometry ; polysomaty (mínimo tres)												
<b>CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO</b>	<p>Códigos UNESCO:  <a href="http://tecnura.udistrital.edu.co/downloads/formatos/Codigos_UNESCO.pdf">http://tecnura.udistrital.edu.co/downloads/formatos/Codigos_UNESCO.pdf</a></p> <table border="1" data-bbox="555 1245 1353 1417"> <thead> <tr> <th>CAMPO</th> <th>DISCIPLINA</th> <th>SUBDISCIPLINA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>24</td> <td>2409</td> <td>240992</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td>2417</td> <td>241714</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>(máximo tres áreas de conocimiento)</p>	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA	24	2409	240992	24	2417	241714			
CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA											
24	2409	240992											
24	2417	241714											

## Tabla de contenido

1.-Introducción.....	1
1.1.- La Berenjena .....	1
1.1.1.- Taxonomía.....	1
1.1.2.- Origen, domesticación y dispersión .....	1
1.1.3.- Caracterización botánica.....	4
1.1.4.- Importancia económica .....	5
1.2.- Producción de frutos sin semillas .....	7
1.2.1.- Tecnologías y aproximaciones para lograr el estatus “sin semillas” .....	7
1.2.1.1.- QTLs que controlan la partenocarpia.....	7
1.2.1.2.- Transgénesis.....	8
1.2.1.3.- Producción de triploides .....	10
1.2.2.- Cultivos con producción de frutos sin semilla en la actualidad .....	10
1.2.2.1.- Sandía.....	10
1.2.2.2.- Frutos cítricos.....	11
1.2.2.3.- Uvas.....	11
1.2.2.4.- Pepino .....	11
1.3.- Los poliploides.....	12
1.3.1.- La poliploidía y sus consecuencias en la evolución de los genomas.....	12
1.3.2.- Aspectos teóricos y técnicos de la ploidía y sus variaciones .....	15
1.3.3.- Los poliploides en la mejora genética.....	17
1.3.4.- Los poliploides y el cultivo <i>in vitro</i> .....	18
1.3.5.- Los poliploides en la mejora genética de la berenjena.....	20
1.3.5.1.- Naturales.....	20
1.3.5.2.- Inducidas.....	20
2.- Objetivos .....	22
3.- Materiales y métodos .....	23
3.1.- Material vegetal .....	23
3.2 Citometría de flujo: Preparación y análisis.....	29
3.2.1.- Análisis de muestras empleando tinción de Yoduro de propidio .....	29
3.2.2.- Análisis de muestras empleando tinción de DAPI .....	29
3.3.- Cultivo <i>in vitro</i> .....	30
3.3.1.- Medios empleados.....	30
3.3.2.- Metodología.....	30

4.- Resultado y discusión.....	32
4.1.- Análisis de ploidía de las entradas de berenjenas y especies silvestres relacionadas....	32
4.2.- Análisis de los efectos del cultivo in vitro en la variación de la ploidía de plantas regeneradas de distintos genotipos de berenjena ( <i>Solanum melongena</i> ).....	36
4.3.- Evaluación del nivel de ploidía de los explantes iniciales empleados en cultivo in vitro	38
5.- Conclusiones .....	40
Bibliografía .....	41

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Boceto chino más antiguo existente de la berenjena. Libro Yinshan Zhengyao de Hu Sihui.....	2
<b>Figura 2.</b> Producción en toneladas de cultivos hortícolas en el mundo. ....	5
<b>Figura 3.</b> Los 20 países más productivos para el cultivo de la berenjena. Producción expresada en toneladas.....	5
<b>Figura 4.</b> Países europeos más productivos para el cultivo de la berenjena. Producción expresada en toneladas. ....	6
<b>Figura 5.</b> Se puede visualizar varios caminos, la autoploidía (A), la alopoliploidía (B y C) y la anfiploidía (C). ....	13
<b>Figura 6.</b> Las relaciones genéticas y evolutivas entre el trigo panadero, trigo “durum” y los parientes silvestres diploides de las gramíneas (Shewry, 2009).....	14
<b>Figura 7.</b> Flores de <i>Phalaenopsis aphrodite</i> subsp. <i>formosana</i> tetraploide (izquierda) y diploide (derecha) regenerado de un explante de PLB. Las plantas tetraploides provinieron de secciones de protocormos regenerados por cultivo <i>in vitro</i> . (Chen, et al., 2009).....	19
<b>Figura 8.</b> Entradas de berenjena usadas en los experimentos de este estudio. Se puede apreciar la diversidad morfológica que existe entre ellas. MEL 1.1 (A); MEL 3.3 (B); IVIA371 (C); Black Beauty (D) MM1597 (E); <i>S. insanum</i> (INS1) (F).....	23
<b>Figura 9.</b> (A) Esterilización de semillas. Se empleó bolas para té o muselina para mantener separadas las semillas de cada entrada. Distintas fases del proceso de obtención de explantes para su cultivo <i>in vitro</i> . Germinación en placa Petri en oscuridad (B); Preparación de explantes de hipocótilo y cotiledón (C). Placas Petri con 5 explantes de hipocótilo (D) y cotiledón (E) ....	31
<b>Figura 10.</b> Tamaño inferido del genoma de diversas entradas del género <i>Solanum</i> evaluadas mediante citometría de flujo con tinción de IP.....	35
<b>Figura 11.</b> Histograma obtenido por citometría de flujo de explantes de hipocótilo y cotiledón. Histograma de citometría de flujo sobre los contenidos relativos de DNA nuclear en diferentes tejidos de la entrada IVIA371: cotiledón (azul), hipocótilo (verde) y hoja verdadera (rojo). El eje de las coordenadas representa el nivel de la intensidad de la fluorescencia relativa a la cantidad de DNA nuclear. Se observa claramente los perfiles polisomáticos presentes en los diferentes tejidos analizados. El pico ubicado en el valor 50 corresponde al núcleo diploide en fase G1. El eje de las ordenadas indica el número de núcleos analizados. ....	39

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Superficie y producción de cultivos. Hortalizas de fruto-Berenjena, 2016.....	6
<b>Tabla 2.</b> Producción de frutos sin semillas utilizando la ingeniería genética para modificar genes de fitohormonas. (Pandolfini, 2009).....	9
<b>Tabla 3.</b> Ejemplos de especies en donde la poliploidía mejoró la tolerancia a estreses abióticos (del Pozo & Ramirez-Parra, 2015) .....	17
<b>Tabla 4.</b> Entradas seleccionadas para el estudio .....	24
<b>Tabla 5.</b> Composición del tampón de lisis LB01 para citometría de flujo (pH 7.5) (Doležel et al., 1989) .....	30
<b>Tabla 6.</b> Composición del tampón de Yoduro de propidio .....	30
<b>Tabla 7.</b> Medio E0 .....	30
<b>Tabla 8.</b> Número de plantas aclimatadas por cada genotipo de berenjena utilizando el medio E6 en condiciones de luz para dos tipos de explantes iniciales, hipocótilo y cotiledón. Posteriormente se utilizó el medio R2 para la inducción de las raíces. el análisis de la ploidía de las plantas aclimatadas se muestra en las dos últimas columnas. Explantes iniciales usados (n=45). .....	37

## 1.-Introducción

### 1.1.- La Berenjena

#### 1.1.1.- Taxonomía

La berenjena (*Solanum melongena*) es una planta perteneciente a la familia *Solanaceae* oriunda del Viejo Mundo, concretamente la India, que produce frutos comestibles. Se trata de una planta tropical perenne que alcanza una altura de 40-150 cm. La berenjena pertenece a la siguiente clasificación científica (Marín, 2008):

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Dicotyledoneae</i>
<b>Subclase</b>	<i>Lamiidae</i>
<b>Superorden</b>	<i>Solananae</i>
<b>Orden</b>	<i>Solanales</i>
<b>Familia</b>	<i>Solanaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Solanoideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Solaneae</i>
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Leptostemonum</i>
<b>Sección</b>	<i>Melongena</i>
<b>Serie</b>	<i>Incaniformia</i>
<b>Especie</b>	<i>Solanum melongena</i> L

Dentro de la familia *Solanaceae*, el género *Solanum* es el más numeroso de todos. En él encontramos plantas herbáceas, arbustos, arbóreas y hasta con espinas. La especie *Solanum melongena* pertenece a uno de los grupos no tuberosos del género *Solanum*. Se trata de una especie diploide ( $2n=24$ ).

#### 1.1.2.- Origen, domesticación y dispersión

La berenjena fue domesticada en la región indo-birmana con evidencias de que era cultivada en la antigüedad (Vavilov, 1926). Varios documentos sánscritos, que datan de tan temprano como el año 300 AEA (Antes de la Era Actual), ya mencionan el cultivo de la berenjena. Posteriormente fue adoptada en China, esto se evidencia en tratados como el Atlas de Plantas en el Sur de China escrito durante la dinastía Jin Occidental (265-316 EA); el *Qimi Xiaoshu*, un manual práctico de agricultura escrito durante el tiempo de las dinastías sureñas y norteñas (420-581 EA) y en el *Ts'i Min Yao Shu*, un trabajo de la agricultura del siglo V. Posteriormente, la berenjena llegó a Japón alrededor del siglo VIII durante la dinastía Tang (Allard, 1996). La imagen china más antigua que se tiene sobre la berenjena es un boceto en blanco y negro de una planta pequeña dando dos frutos blancos globulares, esta imagen es parte de *Yinshan Zhengyao de Hu Sihui* (1330) (Figura 1), un tratado sobre los principios de las comidas sanas y seguras escrito por el emperador mongol. Shin Saimdang (1504-1551), madre de Lee Yul Gok, la ilustradora académica confuciana de la dinastía Joseon coreana, pintó

plantas de berenjenas en mamparas plegables. Por otro lado, también existe una ilustración japonesa de un campo de berenjenas con personas cosechando frutos oscuros globulares ubicada en un tratado de agricultura datado a principios del siglo XVIII (Doi, 1991).



**Figura 1.** Boceto chino más antiguo existente de la berenjena. Libro *Yinshan Zhengyao* de Hu Sihui.

La berenjena llegó a Persia muy temprano, sin embargo, se desconoce la fecha exacta (Enciclopedia Iránica, 1988). Ya existían cultivos de la berenjena púrpura evidenciado en el capítulo de enfermedades dentales en *Ketab al-hawi fi'l-teeb* por el escolástico persa Al Razi (865-925) también conocido como el descubridor del alcohol. Por otro lado, el filósofo Abu Ibn Sina (980-1037) y otros famosos escritores persas de la época medieval especializados en temas de medicina y botánica, que a menudo urgían cautela en el uso de la berenjena, fruto descrito como la causa de muchos efectos internos y externos perniciosos para la salud, tan diversos como granos, oftalmia, úlceras, impétigo, lepra, elefantiasis, estreñimiento y obstrucción intestinal, trombofilia, insomnio, epilepsia y exceso de bilis negra. Pero también mencionaron que se podría disfrutar de sus cualidades beneficiosas para la salud si se tomaban precauciones especiales como el salteado y remojo previo al consumo, para que la fruta pudiese ser utilizada para la neutralización de la bilis y para el tratamiento de patologías del sistema auditivo. En aquel entonces se creía que la berenjena era comestible sólo cuando estaba fisiológicamente madura y cocinada.

La berenjena era desconocida por los antiguos griegos y romanos, pero, aun así, se esparció a través de la cuenca del mediterráneo como consecuencia de la expansión musulmana en los siglos VII y VIII. Este cultivo alcanzó el este africano debido a los navegantes persas y árabes del siglo VIII en adelante, indicado por la presencia de muchos términos para referirse a la berenjena en Etiopía (Anon., 1988). El médico

andaluz-árabe Abū l-Walīd Muḥammad Ibn 'Aḥmad Ibn Rušd (1126-1198) se refiere a las berenjenas al igual que Ibn Al Awam (siglo XII) que describe detalles del cultivo en su libro de agricultura (*Kitab al-Felahah*, 2ª mitad s. XII). Ambos sugieren que la berenjena era un vegetal común ypreciado en el sur de España en su época. Ibn Al Awam menciona 4 tipos de berenjena cultivada: egipcio (fruto blanco y pétalos violeta), sirio (fruto violeta y pétalos azul celeste), local (fruto purpura oscuro con un cáliz estrecho y pétalos purpura) y el cordobés (fruto negro). Hay evidencias que apuntan que los mismos tipos de cultivos de berenjena también existieron en Israel durante el periodo Mamelouk (1250-1517) (Amar, 2000).

Posteriormente existen múltiples referencias y/o ilustraciones de la berenjena en documentos europeos que datan de la era medieval y del renacimiento. Albertus Magnus (1193-1280) mencionó la berenjena en su *De Vegetabilibus* (1256). La primera ilustración europea de la berenjena se puede encontrar en un herbolario italiano *De Herbis* (S. XIV, década de los 30). La berenjena también hace su aparición en el manuscrito *Theatrum sanitatis* (1380) y en *Manuel des vertus, végétaux, animaux* (1480) en donde indica un uso ornamental.

La berenjena fue uno de los cultivos vegetales llevados desde España hasta América en la era de la exploración (siglos XV-XVII) y existen referencias en Brasil que datan a mediados del siglo XVII (Hendrick, 1919).

En tratados botánicos del siglo XVI muchas xilografías derivan de una imagen en New Kreüterbuch (1543) de Leonhart Fuchs que consiste en una planta con frutos globulares. Por otro lado, otras ilustraciones hechas por Oellinger (1553) y Aldrovandi (S. XVI) muestran frutos globulares, ovalados y aperados; de color blanco, púrpura o amarillo. La primera aparición de frutos alargados ocurrió en una ilustración de Dalechamps (1586).

Los frescos pintados (1515-1518) por Giovanni da Udine que representan una riqueza de frutos y vegetales, incluyen 31 frutos de berenjena de un color púrpura claro o amarillo (Caneva, 1992). En 1563 Giuseppe Arcimboldo incluyó un fruto púrpura pequeño de berenjena en el retrato Verano, compuesto por un conglomerado de frutas. Por otro lado, también se puede encontrar frutos de berenjena de tamaño medio y con forma ovalada tallados en el marco de una de las puertas de la catedral de Pisa que data de 1601.

La popularidad creciente de la berenjena en la época post-renacentista está evidenciada por la presencia de la berenjena en el arte hasta el siglo XX. El gran periodo de ilustración botánica ocurrió durante el siglo XVIII y produjo muchas imágenes con gran nivel de detalle de plantas de berenjena. A partir de finales del siglo XVIII aparecieron nuevas pinturas sobre la berenjena, en ocasiones junto con los primeros catálogos de semillas como la edición *Vilmorin* de 1760. Los catálogos de semillas son una fuente única para tipificar cultivares vegetales de antaño. Por último, en la segunda mitad del siglo XX las fotografías reemplazaron las ilustraciones de la planta de berenjena y su fruto.

### 1.1.3.- Caracterización botánica

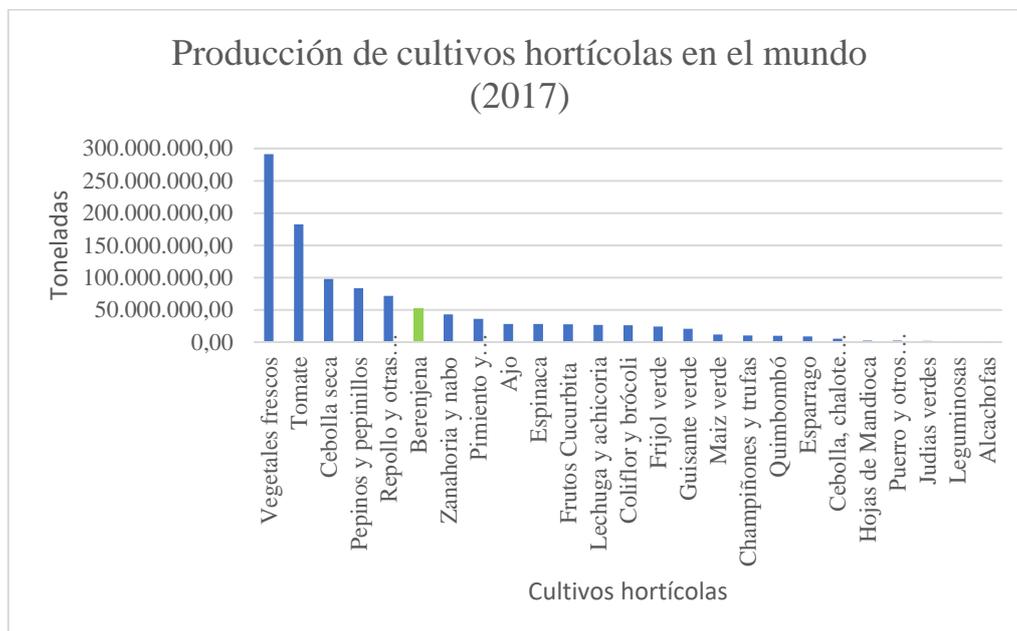
La berenjena (*Solanum melongena*) es una planta herbácea y perenne, emparentada con el tomate que también pertenece a la familia de las *Solanaceae* y es cultivada por su fruto comestible. Las plantas de berenjena tienen un tallo simple, alargado, plano y ramificado; unas hojas lobuladas y gruesas que son de color verde y una filotaxis alterna. Las hojas miden 10-20 cm de largo y 5-10 cm de ancho. La planta produce flores principalmente de color púrpura que tienen un diámetro de 3-5 cm. Produce un fruto carnoso, alargado y ovoide que puede llegar a alcanzar hasta 40 cm de largo, con una epidermis lisa que presenta en su interior una gran cantidad de semillas pequeñas. El color del fruto es variable dependiendo del tipo de madurez, fisiológico o comercial. Todos los frutos de la planta de berenjena presentan un color amarillo en su estado de madurez fisiológica. Sin embargo, es en el estado de madurez comercial en donde se aprecia una variedad de colores para el fruto como blanco, amarillo, púrpura o negro. La planta de berenjena puede llegar a alcanzar una altura de hasta 1,5 m y a pesar de ser plantas perennes se cultivan como plantas anuales (PennStateUniversity, 2019).

La berenjena es una planta de temperatura cálida que requiere de mucho tiempo para desarrollarse. Las condiciones óptimas de temperatura para el cultivo de la berenjena, durante el día, son de 26-32 °C y las temperaturas nocturnas son alrededor de 21 °C. Cabe destacar que la berenjena es una planta heliófila y por lo tanto debe ubicarse en lugares donde les dé directamente la luz solar. El pH ideal del suelo para el cultivo es entre 6,3 y 6,8. Las plantas deberían tener un suministro continuo de agua para tener un desarrollo óptimo del fruto y el sustrato alrededor de la planta no debería secarse, pero tampoco debería estar empozado. Cada planta puede producir varios frutos y debido a esta situación es ventajoso entutorarlas para proveerles más soporte antes de la cosecha (MissouriBotanicalGarden, 2019).

El cultivo de *S. melongena* está destinado completamente al consumo de su fruto. El fruto debe cosecharse cuando la carne todavía está firme y las semillas son muy pequeñas y ocupan poco volumen. La epidermis del fruto debe ser brillante y del color deseado. Frutos demasiados maduros contendrán semillas más oscuras y su sabor será consecuentemente más amargo (PennStateUniversity, 2019).

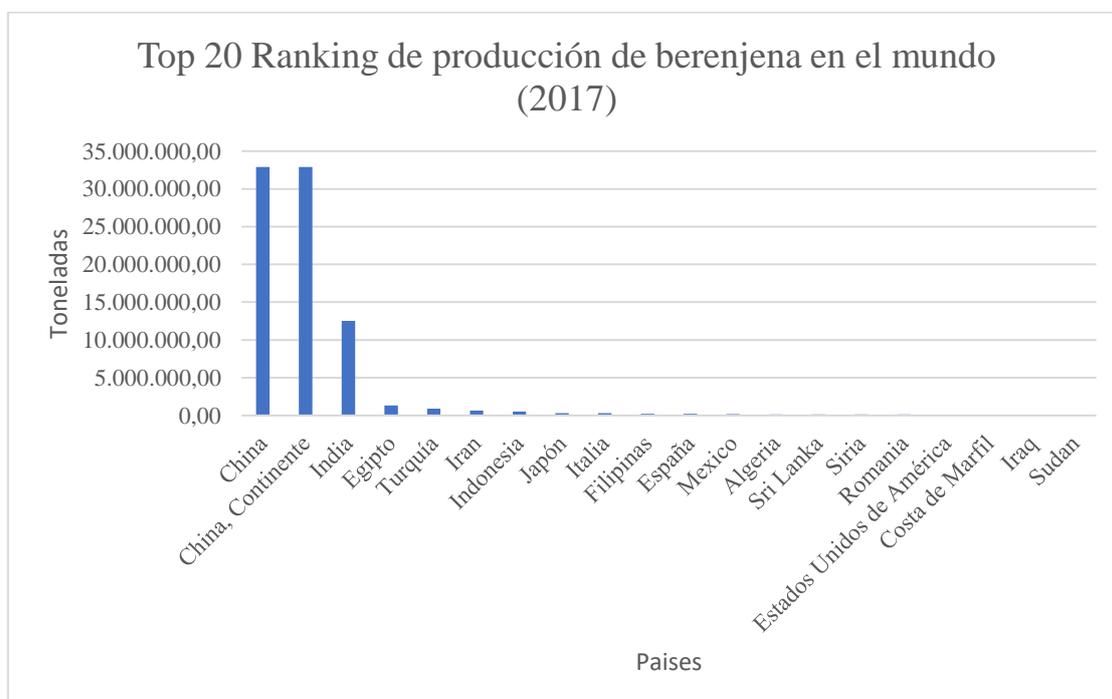
### 1.1.4.- Importancia económica

La berenjena es una de las hortalizas más importantes para la alimentación humana. Este cultivo ocupa el sexto lugar en el ranking del año 2017 (Figura 2) con una producción de 52.309.119 toneladas (FAO Stat, 2017).



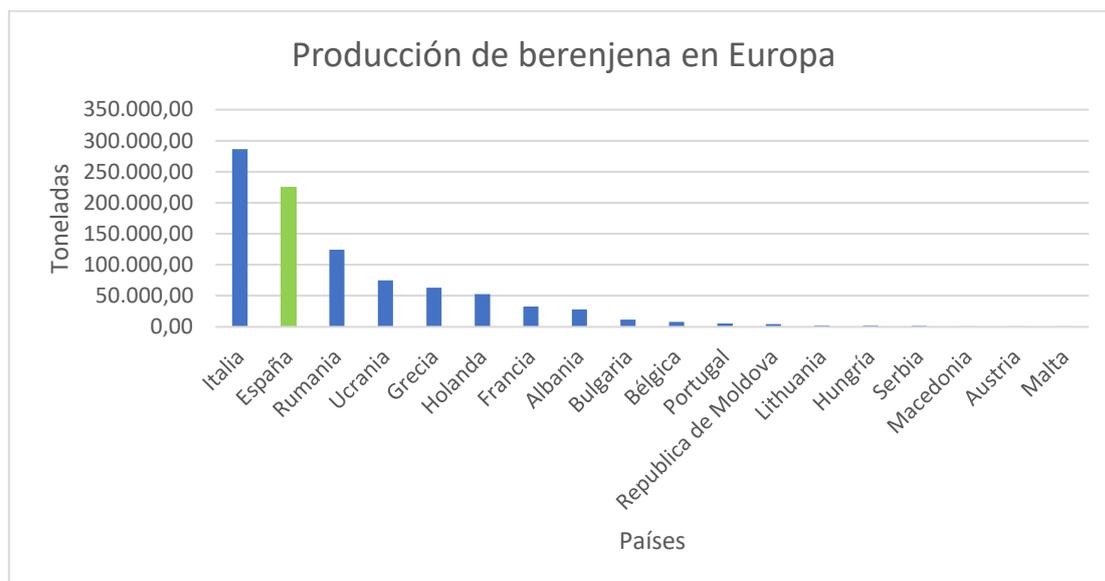
**Figura 2.** Producción en toneladas de cultivos hortícolas en el mundo.

Los principales productores de berenjena son China e India, juntos representan el 93% de la producción mundial de berenjena. España es el undécimo productor (Figura 3).



**Figura 3.** Los 20 países más productivos para el cultivo de la berenjena. Producción expresada en toneladas.

En Europa, la producción está liderada por Italia, siguiéndole España (Figura 4).



**Figura 4.** Países europeos más productivos para el cultivo de la berenjena. Producción expresada en toneladas.

En España la producción de este cultivo está principalmente ubicada en la comunidad autónoma de Andalucía (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación de España, 2016) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Superficie y producción de cultivos. Hortalizas de fruto-Berenjena, 2016

Comunidad autónoma	Superficie (Hectáreas)	Rendimiento (kg/ha)			Producción (Toneladas)
		Secano	Regadío - Aire Libre	Regadío - Protegido	
Galicia	1	0	61.030	0	61
P. de Asturias	2	10000	0	0	20
Cantabria	0	0	0	0	0
País Vasco	0	0	0	0	0
Navarra	123	0	56745	0	6980
La Rioja	7	0	45000	0	315
Aragón	30	0	10200	0	1935
Cataluña	174	0	23797	40426	4507
Baleares	35	0	19250	39000	871
Castilla y León	12	0	14500	0	174
Madrid	2	0	31000	0	62
Castilla-La Mancha	60	0	29575	0	1775
C. Valenciana	263	0	27800	52306	11551
R. de Murcia	55	0	33000	71500	2277
Extremadura	81	0	74815	0	6060
Andalucía	2833	0	27193	77654	202984
Canarias	75	6667	22792	62028	3071
<b>España (TOTAL)</b>	<b>3753</b>	<b>8000</b>	<b>33770</b>	<b>75389</b>	<b>242643</b>

La berenjena es un cultivo de gran importancia tanto a nivel mundial como a nivel nacional. Este genera grandes beneficios económicos, también tiene una gran importancia tanto en la alimentación como en la cultura de países del sudeste asiático. Por ello es un cultivo en el que aplicar procesos de mejora genética puede ser económicamente muy promisorio, siendo uno de los puntos de interés principales la producción de frutos sin semillas.

## 1.2.- Producción de frutos sin semillas

Los frutos sin semilla siempre han sido deseados tanto por consumidores como por productores debido a las ventajas que presentan. Los consumidores muestran preferencia por los frutos sin semilla debido a que este carácter hace que el proceso de ingesta del fruto sea más cómodo. Por otro lado, los productores también prefieren los frutos sin semillas debido a que su ausencia permite prolongar la vida post-cosecha y proporciona una textura más uniforme (Maestrelli et al., 2003; Pandolfini, 2009). En casos más concretos, como en la berenjena, la ausencia de semillas también permite conseguir una reducción del pardeamiento de la carne (Maestrelli, et al., 2003).

### 1.2.1.- Tecnologías y aproximaciones para lograr el estatus “sin semillas”

Las tecnologías que se han utilizado hasta hoy para lograr frutos sin semillas son las siguientes (Varoquaux, et al., 2000):

- QTLs que controlan la partenocarpia
- Transgénesis
  - Promueve la partenocarpia
  - Interfiere con el desarrollo de la semilla utilizando la tecnología Terminator.
- Producción de triploides

#### 1.2.1.1.- QTLs que controlan la partenocarpia

La partenocarpia es la capacidad que tienen ciertas plantas para desarrollar frutos, sin semillas sin necesitar los pasos previos de polinización y fertilización. Esta característica biológica puede ser **genética** o **artificial** (Gustafson, 1942). La partenocarpia genética o natural puede ser de carácter obligatorio o facultativo. La partenocarpia **genética** es consecuencia de la esterilidad genética. Esta se expresa sin ninguna estimulación ambiental o externa y debido a ello las plantas que presenten este tipo de partenocarpia requieren obligatoriamente el empleo de la propagación vegetativa para reproducir el material vegetal. Por otro lado, está la partenocarpia genética facultativa donde los procesos de polinización y consecuentemente fertilización, dependen de condiciones ambientales altamente específicas, es decir, si la temperatura, humedad u otros factores se desvían de lo óptimo no se da la polinización y la fertilización (Kalloo, 1991). Por último, está la partenocarpia artificial que puede tener como resultado frutos sin semillas si se aplican correctamente los estímulos ambientales o externos ya

investigados dando un resultado favorable. Este tipo de partenocarpia puede ser inducida tratando las flores con fitohormonas (Schwabe & Mills, 1981) o polinizando con polen incompatible (Tsao, 1980) o irradiado (Shozo & Keita, 1997).

En el siglo pasado se empezó por investigar la herencia genética de la partenocarpia. Por ejemplo, en pepino (De Ponti & Garretsen, 1976), en donde se encontró que la herencia de la partenocarpia depende de 3 genes principales independientes con acción aditiva. Por otro lado, en 1984 también se estudió la herencia genética en el cultivar Severiano de tomate. En esta investigación se llegó a la conclusión de que la partenocarpia era genética facultativa, controlada por un solo gen (*pat-2*) (Lin, et al., 1984). En 1998 Prohens et al. estudiaron la herencia genética de *Solanum muricatum* var. Aiton. La relación entre frutos que presentaron o no partenocarpia fue de 1:1 y 3:1 en las familias de retrocruzamiento y F2, respectivamente. Este resultado indica que, en ambas familias, la partenocarpia está controlada por un solo gen dominante (Prohens, et al., 1998). En el 2000, se postuló un modelo tentativo de herencia genética de la partenocarpia obligada principalmente en el género *Citrus*. La herencia se atribuye a tres genes dominantes complementarios (Vardi, et al., 2000).

En los últimos 18 años con los avances en el campo de la genética y bioquímica, la investigación tomó el rumbo hacia el estudio de los QTLs asociados a la partenocarpia. En el 2006, se identificaron y se realizó un análisis comparativo de QTLs asociados a la partenocarpia en pepino (*Cucumis sativus*). Se detectaron 10 QTLs asociados en 4 regiones genómicas que coinciden con 3 QTLs mapeados anteriormente (Sun, et al., 2006). En 2008, se mapearon y caracterizaron QTLs asociados a la partenocarpia en dos líneas, IL5-1 (línea de introgresión desarrollada por Finkers y colaboradores en el 2007) e IVT-línea 1 (Zijlstra, 1985). En la línea IL5-1 la partenocarpia está bajo el control de dos QTLs, *pat4.1* y *pat5.1*. Por otro lado, la partenocarpia en la línea IVT-línea 1 también está controlada por dos QTLs, *pat4.2* y *pat9.1* (Gorguet, et al., 2008). A pesar del volumen de estudios realizados sobre la partenocarpia genética en la práctica se emplea más la partenocarpia artificial. Es evidente que a pesar de que hay un componente genético los componentes ambientales ejercen una fuerte influencia en la partenocarpia.

Los QTLs que controlan la partenocarpia también han sido objeto de estudio en *S. melongena*. En 2012 se construyeron mapas de ligamiento empleando SSRs y SNPs codominantes en poblaciones F2 y descubrieron dos QTLs en los cromosomas 3 y 8 que bautizaron *Controlling parthenocarpy3.1* (*Cop3.1*) y *Cop8.1* (Miyatake, et al., 2012). Posteriormente, en el 2015 se descubrió que el factor transcripcional SmARF8 está involucrado en la partenocarpia en *S. melongena*. Se observó que la inhibición del factor transcripcional resultó en la manifestación de partenocarpia en berenjena (Du, et al., 2015).

#### **1.2.1.2.- Transgénesis**

Por otro lado, también se ha empleado la transgénesis para la producción de frutos sin semillas. En la siguiente tabla 2 se resume el uso de la transgénesis para este fin:

**Tabla 2.** Producción de frutos sin semillas utilizando la ingeniería genética para modificar genes de fitohormonas. (Pandolfini, 2009)

Gen	Función	Modificación genética	Especie	Fenotipo del fruto	Referencia
<i>DefH9-iaaM</i>	Síntesis de auxina	Expresión transgénica específica de ovulo	- <i>Nicotiana tabacum</i> - <i>Solanum melongena</i> - <i>Solanum lycopersicum</i> - <i>Rubus idaeus</i> - <i>Fragaria</i> - <i>Cucumis sativus</i>	Partenocarpia facultativa y obligada, sin semilla, crecimiento del fruto temprano, tamaño y forma normal.	(Rotino, et al., 1997) (Donzella, et al., 2000) (Pandolfini, et al., 2002) (Yin, et al., 2006) (Mezzetti, et al., 2004)
<i>rolB</i>	Respuesta de auxina	Expresión transgénica específica de ovario/fruto	- <i>Solanum lycopersicum</i>	Partenocarpia facultativa y obligada, sin semilla, tamaño y forma normal	(Carmi, et al., 2003)
<i>SIIAA9</i>	Señalización de auxina	Regulación negativa antisentido, promotor constitutivo	- <i>Solanum lycopersicum</i>	Partenocarpia, sin semilla, crecimiento del fruto temprano, tamaño y forma normal	(Wang, et al., 2005)
<i>AtARF8</i>	Señalización de auxina	Expresión del mutante del gen <i>AtARF8-4</i>	- <i>Solanum lycopersicum</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i>	Partenocarpia, sin semillas/pseudo-embriones, tamaño y forma similar a silvestre	(Goetz, et al., 2007)
<i>SIARF7</i>	Señalización de auxina	Silenciamiento mediado por iRNA, promotor constitutivo	- <i>Solanum lycopersicum</i>	Partenocarpia, sin semillas, forma alterada	(De Jong, et al., 2009)
<i>SIAUCS1A</i>	Respuesta de auxina	Silenciamiento mediado por iRNA, promotor específico de floema	- <i>Solanum lycopersicum</i>	Partenocarpia facultativa y obligada, sin semilla, tamaño reducido	(Molesini, et al., 2009)
<i>SIChs</i>	Biosíntesis de flavonoides	Silenciamiento mediado por iRNA, promotor constitutivo	- <i>Solanum lycopersicum</i>	Partenocarpia, sin semillas; tamaño, forma y color alterados	(Schijlen, et al., 2007)
<i>SIDELLA</i>	Señalización de giberelinas	Regulación negativa antisentido, promotor constitutivo	- <i>Solanum lycopersicum</i>	Partenocarpia facultativa, sin semillas, tamaño reducido, morfología alterada	(Marti, et al., 2007)
<i>SITPR1</i>	Señalización de Etileno	Sobreexpresión	- <i>Solanum lycopersicum</i>	Partenocarpia, sin semillas, morfología alterada	(Lin, et al., 2008)

### 1.2.1.3.- Producción de triploides

Otra manera de obtener frutos sin semillas es mediante la producción de plantas triploides (Wang, et al., 2016). Estas presentan órganos más grandes, más biomasa y mayor resistencia a estreses abióticos (Wang, et al., 2016). Sin embargo, es difícil encontrar plantas con esta ploidía en la naturaleza, debido a que las semillas son inviables y por lo tanto no hay descendencia. Los métodos para conseguir esta condición genética son los siguientes (Wang, et al., 2016):

- **Selección natural.** Triploides encontrados en la naturaleza. Son el producto de la unión de gametos no reducidos o de la hibridación entre parentales naturales tetraploides y diploides.
- **Hibridación sexual interploide ( $2n \times 4n$ ,  $4n \times 2n$ ,  $2n \times 3n$ ).** Consiste en la hibridación entre parentales que difieren entre ellos en cuanto a nivel de ploidía. Los parentales con una ploidía diferente a  $2n$  fueron creados artificialmente. La unión entre gametos de diferentes niveles de ploidía da como resultado un cigoto triploide.
- **Cultivo de endospermo.** Se realiza el cultivo *in vitro* del endospermo que es un tejido triploide. El objetivo es conseguir la regeneración de una planta a partir de este tejido.
- **Fusión de protoplastos.** Se realiza esta técnica para producir parentales alotetraploides que posteriormente serán utilizados en cruces para generar triploides sin semillas (Grosser & Gmitter Jr, 2011).

Como se ha presentado en este apartado (1.2.1) existen tres vías principales para la producción de plantas que produzcan frutos sin semillas. En este trabajo se abordará este objetivo mediante la vía de producción de triploides, debido a que:

1. Depende menos de las condiciones ambientales al contrario que en la partenocarpia
2. No implica el uso de tecnologías de edición genética ni transgénesis, lo cual ayuda a su comercialización en el mercado europeo

### 1.2.2.- Cultivos con producción de frutos sin semilla en la actualidad

En la actualidad ya se puede encontrar una gran variedad de frutas sin semillas. Entre ellas, las más famosas son la sandía, los frutos cítricos (naranja, mandarinas), las uvas y el pepino.

#### 1.2.2.1.- Sandía

La sandía sin semilla contiene semillas parcialmente desarrolladas y, por lo tanto, es un ejemplo de estenospermocarpia (Varoquaux, et al., 2000). La estenospermocarpia se refiere al hecho de que los frutos son fertilizados de manera natural y posteriormente presentan trazas de semillas debido al aborto de los embriones. Para obtener una planta de sandía que pueda dar frutos sin semillas es necesario hacer un cruce entre un tetraploide (funciona como parental femenino) y otra línea diploide (donante del polen, es decir, parental masculino). La descendencia de este cruce es triploide y,

consecuentemente, es estéril debido al desequilibrio cromosómico que existe durante meiosis (Ramsey & Schemske, 1998). Como último paso del proceso, es necesario emplear individuos diploides para que polinicen a la descendencia triploide y obtener sandías sin semillas (Kihara, 1951). La forma del fruto, el sabor y el rendimiento de las sandías sin semillas son equiparables a las líneas que sí producen semillas y, además, presentan una mayor vida post-cosecha (Pandolfini, 2009).

#### **1.2.2.2.- Frutos cítricos**

Los frutos cítricos que presenten menos de 5 semillas en total son considerados “sin semillas” (Varoquaux, et al., 2000). La partenocarpia se expresa a diferentes niveles, existiendo una variedad de mutantes para dicha situación (Gustafson, 1942; Kalloo, 1991; Janick, 1984). En algunos cultivares, la polinización no es un requerimiento para que se dé la formación y desarrollo del fruto, esto se debe al alto nivel de partenocarpia (Kalloo, 1991). Por otro lado, en algunas situaciones si se requiere un paso previo de polinización para iniciar la formación y desarrollo del fruto debido a un bajo nivel de partenocarpia.

Se intentó cumplir el estatus “sin semilla” vía producción de triploides. Sin embargo, este enfoque, para el género *Citrus*, es difícil porque hay pocas líneas parentales tetraploides para cruzar con diploides y además las líneas triploides resultantes de tal cruce o no desarrollaron frutos o estos fueron más pequeños que el promedio (Grosser, et al., 1998).

#### **1.2.2.3.- Uvas**

En la vid existen dos tipos de métodos para lograr el estatus “sin semilla” (Varoquaux, et al., 2000).

1. El primer método se observa en los cultivares corintos y se basa en la partenocarpia. Las uvas de este cultivar son muy pequeñas, esféricas y solamente son empleadas para hacer uvas pasas (Varoquaux, et al., 2000).
2. El segundo método se basa en la estenospermocarpia. En los cultivares Thompson se consiguió este método y se pudo apreciar trazas de semillas que no presentaron capa de lignina y por lo tanto no entorpecieron la ingesta del fruto. Sin embargo, en este segundo método fue necesaria la aplicación de ácido giberélico para obtener frutos bien desarrollados. Esta fitohormona hace que el racimo se alargue, incrementa el tamaño de cada uva y reduce a trazas las semillas. Este método para obtener frutos sin semillas es difícil, dependiente de las condiciones climáticas, caro y requiere de mucha mano de obra para realizarlo exitosamente (Weaver & McCune, 1959, 1961, 1962; Weaver & Pool, 1965). Además, no es aplicable en prácticas de cultivo ecológico.

#### **1.2.2.4.- Pepino**

El enfoque empleado en el pepino para conseguir frutos sin semillas es peculiar comparado con las estrategias de los cultivos anteriormente mencionados. En el pepino

existen plantas monoicas (flores masculinas y femeninas separadas físicamente dentro de una misma planta), androicas (flores masculinas exclusivamente), ginoicas (flores femeninas exclusivamente), andromonoicas (flores masculinas y hermafroditas en la misma planta) y dioicas (plantas que tienen o sólo flores masculinas o femeninas). Para la producción de pepino es necesario cultivar solo plantas monoicas y ginoicas, siendo estas últimas las que tienen el potencial más alto de rendimiento en producción. Sin embargo, surge un problema que radica en encontrar una tasa óptima de cultivo de plantas ginoicas y plantas monoicas (servirán de polinizadores para las plantas ginoicas). Esta situación es solventable si se introducen genes involucrados en la partenocarpia en plantas ginoicas, con esto se elimina el prerrequisito de polinización para que se dé el cuajado de los frutos. Ya en la actualidad existen algunos cultivares de pepino partenocárpico. En estos cultivares se tiene la ventaja de que el cuajado del fruto no depende de las condiciones climatológicas y ambientales, ni de la polinización artificial o mediada por vectores. (Varoquaux, et al., 2000).

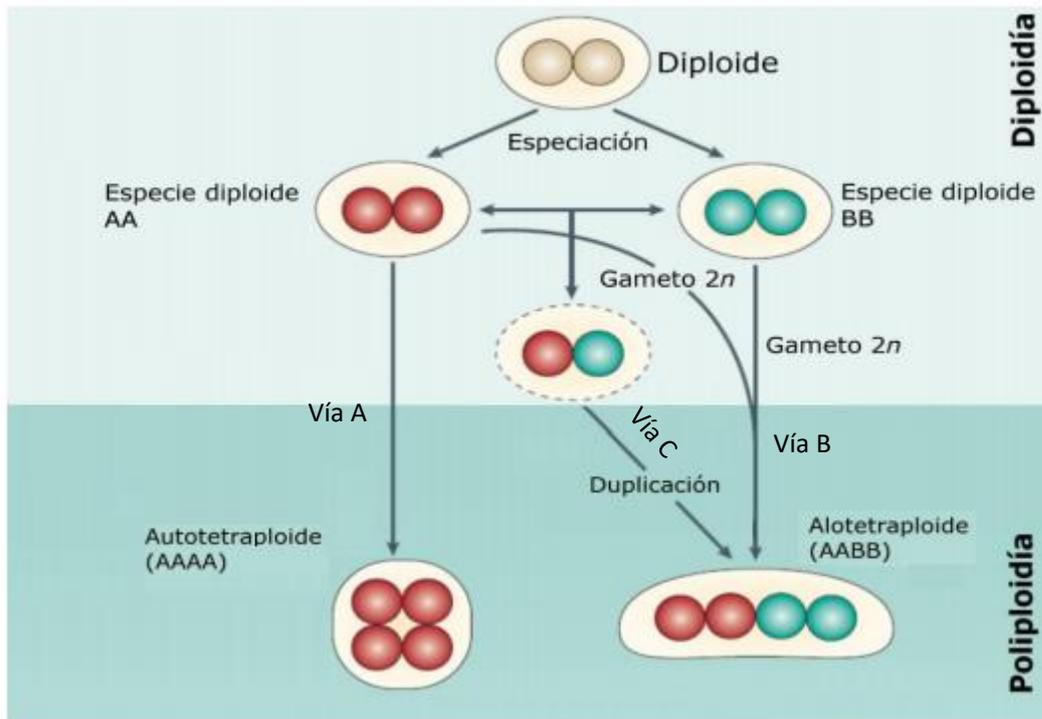
### 1.3.- Los poliploides

Como ya hemos adelantado en el apartado anterior trataremos de explotar la vía de la producción de plantas triploides para la obtención de frutos sin semilla. Para ello primero hemos de conseguir parentales tetraploides con los que poder generar la descendencia triploide. Será en este apartado en el que daremos una visión general a las peculiaridades de este tipo de organismos. Su importancia en la evolución en los genomas de las especies y cómo producirlos artificialmente.

#### 1.3.1.- La poliploidía y sus consecuencias en la evolución de los genomas

La poliploidía es un evento común en las plantas, que involucra la adición de otra serie completa de cromosomas. A menudo las especies de plantas, que naturalmente son poliploides, muestran una mejora en el vigor durante su crecimiento, desarrollo y una mejor adaptación a ambientes adversos. Estos rasgos son claras ventajas evolutivas que se han incorporado a lo largo de la historia en los programas de mejora genética vegetal en diversos cultivos.

Nuevas herramientas tecnológicas han permitido dilucidar que al menos un 70% de todas las angiospermas han sufrido, al menos, un evento de poliploidía (Masterson, 1994). Las especies con eventos recientes de poliploidía son clasificadas en dos categorías: autopoliploides y alopoliploides. Los autopoliploides son producto de eventos de duplicación completa de genoma dentro de una especie (Vía A, Figura 5) (Ramsey & Schemske, 2002). Por otro lado, los alopoliploides derivan de híbridos interespecíficos, en donde se mantiene las formas duplicadas de dos o más genomas de los parentales del híbrido (Vía B, Figura 5). En otras palabras, este alopoliploide es el producto de la mezcla de dos genomas completamente diferentes. La anfidiploidía es un poliploide formado por la unión de dos juegos cromosómicos distintos y posteriormente duplicados (Vía C, Figura 5), en otras palabras, la anfidiploidía es un tipo de alopoliploidía.



**Figura 5.** Se puede visualizar varios caminos, la autopoliploidía (A), la alopoliploidía (B y C) y la anfidiploidía (C).

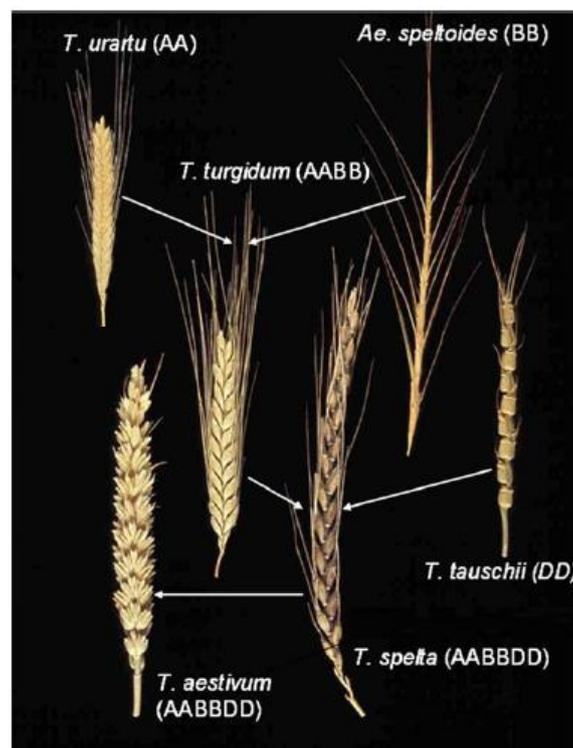
Los beneficios de la poliploidía, en la evolución del reino vegetal, se atribuyen a factores que aceleran la misma. Como por ejemplo los efectos amortiguadores frente a posibles mutaciones deletéreas, efectos de dosis génica, incremento de la diversidad alélica y de la heterociguidad, y la sub- o neofuncionalización de genes duplicados. Todo esto resulta en variación fenotípica (Te Beest, et al., 2012). A pesar de que los eventos de duplicación de genoma tienen claras ventajas, también presentan desventajas. La poliploidización trae consigo cambios importantes en la biología celular del organismo. Por ejemplo, el tamaño celular incrementa considerablemente haciendo que también se modifiquen relaciones de volumen celular con el contenido de ácido desoxirribonucleico (de ahora en adelante "DNA") y el número de copias de cromosomas homólogos que deben ser organizados durante la división celular (meiosis y mitosis).

La evolución de un genoma poliploide es un proceso altamente dinámico comparado con la de los diploides. Después del evento de poliploidización, el genoma sufre cambios considerables a nivel genético y epigenético. Algunas de las alteraciones genéticas que ocurren son la reestructuración genómica, incluyendo reorganizaciones cromosómicas, amplificación de secuencias repetitivas y la pérdida de secuencias de DNA (del Pozo & Ramirez-Parra, 2015). La poliploidización también conlleva cambios funcionales sin alteraciones en la secuencia nucleotídica, como modificaciones epigenéticas; más concretamente ocurre un cambio en el patrón de metilación y el remodelado de la cromatina (Comai, 2005). En conclusión, las alteraciones en el contenido cromosómico conllevan varios tipos de ajustes en el genoma y un mayor consumo de energía. Estos

factores usualmente afectan la viabilidad y fertilidad de la planta poliploide (Comai, 2005) . Sin embargo, los individuos poliploides nuevos se vuelven genéticamente estables una vez que hayan superado el cuello de botella representado por problemas como la esterilidad y la inestabilidad genómica (Wang, et al., 2006).

Un ejemplo de evolución de genomas poliploides es el trigo. Existen indicios del cultivo de trigo de hace 10.000 años. Este trigo cultivado era diploide (genoma AA, Einkorn) y tetraploide (genoma AABB, Emmer) y las relaciones genéticas apuntaron que ambos cultivos se originaron en el sureste de Turquía (Heun, et al., 1997; Nesbitt, 1998; Dubcovsky & Dvorak, 2007). Posteriormente, el cultivo se esparció al Este hace unos 9000 años, momento en donde apareció el trigo hexaploide por primera vez (Feldman, 2001).

El trigo panadero hexaploide (*Triticum aestivum*) es el producto de múltiples hibridaciones. La hipótesis más aceptada sugiere que primero hubo un cruce inicial entre *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan (AA) y *Aegilops speltoides* Tausch (BB). Este cruce tuvo como descendencia el híbrido tetraploide *Triticum turgidum* (AABB), también conocido como el trigo “durum” (Haider, 2013). Posteriormente, hubo varios eventos de hibridación entre el híbrido alotetraploide *T. turgidum* y *Triticum tauschii* Coss (DD) que finalmente produjo el trigo hexaploide panadero (AABBDD) (Figura 6). Debido a los caracteres exhibidos se usa el trigo panadero para hacer pan y el trigo “durum” para hacer pasta (Pauly, et al., 2013). Como se puede ver en este ejemplo los eventos de poliploidización se dan en la naturaleza con bastante eficiencia, aumentando la diversidad de los cultivos e incluso dando lugar a la aparición de nuevas especies.



**Figura 6.** Las relaciones genéticas y evolutivas entre el trigo panadero, trigo “durum” y los parientes silvestres diploides de las gramíneas (Shewry, 2009)

Todas las angiospermas con el genoma secuenciado han mostrado indicios de eventos antiguos de poliploidización (Soltis, et al., 2014). La secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* reveló varios genes duplicados, hecho que sugiere que esta especie sufrió al menos dos eventos de duplicación genómica en su pasado (Bomblies & Madlung, 2014). Los genes duplicados se pierden rápidamente o son parcialmente silenciados debido a que son funcionalmente redundantes. Otro camino que pueden tomar los genes duplicados es la sub- y neofuncionalización (Prince & Pickett, 2002; Blanc & Wolfe, 2004; Rastogi & Liberles, 2005; Conant & Wolfe, 2008). Ajeno a estos posibles caminos anteriormente mencionados están los genes sensibles a la dosis génica, como los factores de transcripción, que usualmente son conservados en los genomas duplicados (Edger & Pires, 2009).

Es importante mencionar que muchos eventos antiguos de poliploidización están relacionados con momentos claves de diversificación filogenética en la evolución de las angiospermas, como el origen de estas y la diversificación en eudicotiledóneas y monocotiledóneas. Desde un punto de vista más global en la ciencia, muchos eventos antiguos de poliploidización coinciden con un incremento de la diversidad filogenética (Soltis, et al., 2014).

Los análisis filogenéticos demuestran que, por ejemplo, en las Brassicas han ocurrido varios eventos de duplicación genómica agrupados en edad que coinciden con épocas de transición caracterizadas por condiciones climáticas inestables prolongadas. Esta diversificación sincronizada con los eventos de duplicación genómica sugiere que la inestabilidad ambiental-climática global y los estreses asociados con estas transiciones favorecen la aparición de eventos de poliploidía que consecuentemente conllevan consigo un incremento en la diversificación a nivel de especies (Kagale, et al., 2014).

### **1.3.2.- Aspectos teóricos y técnicos de la ploidía y sus variaciones**

Los procesos biológicos de polisomatía y endoreduplicación deben ser considerados en la determinación del nivel de ploidía de las muestras.

- La polisomatía acontece en el momento en el que las células, o los núcleos, en el tejido somático de una planta contienen múltiples juegos cromosómicos al mismo tiempo y diferentes unos de los otros. En otras palabras, hay una población de células en donde no todas, presentan la misma carga cromosómica (Langlet, 1927; Ervin, 1939; Ochatt, et al., 2011). La polisomatía puede ser generada por la endoreduplicación o por eventos de endomitosis. En las plantas, la polisomatía es un fenómeno importante que provee altas cantidades de DNA para compensar la carencia de este en especies que presentan un genoma pequeño y cubrir la alta demanda de síntesis de biomoléculas en algunos tipos de células dentro de la planta (Ochatt, et al., 2011).
- La endoreduplicación es un fenómeno frecuente durante el desarrollo de las plantas. Este proceso biológico prevé y suple la necesidad de generar suficiente DNA para un futuro evento de síntesis e incremento de masa biológica en la planta, por ejemplo, la elongación celular (Gendreau, et al., 1997, 1998; Ochatt, et al., 2011).

- La endomitosis es un fallo durante la mitosis. La célula es incapaz de experimentar la citocinesis dando lugar a una célula con el doble del contenido genético.

Como se ha visto puede existir diferentes niveles de ploidía en un mismo organismo. Para determinarlos la evaluación del nivel de ploidia en tejidos vegetales era bastante limitada. Usualmente se recurría al análisis de cariotipo contando el número de cromosomas metafásicos. Este método es laborioso y consume mucho tiempo, también requiere de personal altamente cualificado para llevarlo a cabo correctamente. También, era necesario disponer de tejido que contenga un número discreto de células en división celular, algo que no es frecuente. Todos estos factores contribuían a que se redujera la cantidad de muestra a analizar en cada ensayo. Sin embargo, en los últimos veinte años ha habido muchos avances tecnológicos que han permitido el desarrollo de otros métodos para la determinación del nivel de ploidia, como por ejemplo la citometría de flujo (Ochatt, et al., 2011). El fluorocromo más usado para determinar el nivel de ploidia por medio de esta técnica de laboratorio es el 4',6-diamidino-2-fenilindol (de ahora en adelante "DAPI"), este fluorocromo es específico de grupos adenina-timina. Por otro lado, otro fluorocromo comúnmente utilizado es el yoduro de propidio (PI), hay discrepancias ya que se cree que no tiene preferencia por ningún par de bases nucleotídicas concretas y por lo tanto se une sin discriminación alguna en el DNA. No obstante según Vinogradov este tiene cierta predilección por los pares guanina-citosina (Vinogradov, 1994). La elección correcta del fluoróforo es importante a la hora de determinar el tamaño de un genoma si no se quiere cometer errores de infra- o sobreestimación.

La distribución del contenido de DNA nuclear, dentro de una población celular, se obtiene comparando el número de eventos entre los diferentes picos o agrupaciones. Es importante incluir un control interno para analizar el nivel de ploidia. Los controles internos más comunes son los eritrocitos de pollo, bolas de teflon acopladas con fluoróforos con espectro de emisión en el rango UV, esperma de salmón o una suspensión de núcleos de un organismo modelo en donde se conozca la cantidad de DNA por núcleo, como por ejemplo el tomate, el cual está secuenciado y se sabe exactamente el tamaño de su genoma. Los picos del control interno jamás deben solapar con los de la muestra a analizar (Ochatt, et al., 2011).

### 1.3.3.- Los poliploides en la mejora genética

La poliploidía ha sido y seguirá siendo una herramienta importante en la agricultura (Lewis, 1980) que usualmente confiere ventaja frente a los diploides en cuanto a adaptabilidad y resistencia o tolerancia a estreses abióticos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Ejemplos de especies en donde la poliploidía mejoró la tolerancia a estreses abióticos (del Pozo & Ramírez-Parra, 2015)

Especie	Ploidía	Tolerancia	Referencia
<i>A. thaliana</i>	Autotetraploide	Deficiencia de Boro	(Kasajima, et al., 2010)
<i>A. thaliana</i>	Autotetraploide	Sequía, estrés salino	(del Pozo & Ramírez-Parra, 2014)
<i>A. thaliana</i>	Autotetraploide	Estrés salino	(Chao, et al., 2013)
<i>Brachypodium distachyon</i>	Autotetraploide	Sequía (aridez)	(Manzaneda, et al., 2012)
<i>Brassica rapa</i>	Autotetraploide	Estrés salino	(Meng, et al., 2011)
<i>Cenchrus</i>	Alotetraploide/ alohexaploide	Sequía	(Chandra & Dubey, 2010)
<i>Centaurea stoebe</i>	Autotetraploide	Sequía	(Mraz, et al., 2014)
<i>C. limonia</i>	Autotetraploide	Sequía, frío, déficit de nutrientes	(Allario, et al., 2013)
<i>C. limonia</i>	Autotetraploide	Estrés salino en sequía	(Allario, et al., 2011)
<i>Dendranthema nankingense</i>	Autotetraploide	Frío, sequía, estrés salino	(Liu, et al., 2011)
<i>D. zingiberensis</i>	Autotetraploide	Calor	(Zhang, et al., 2010)
<i>Hordeum vulgare</i>	Autotetraploide	Sequía	(Chen & Tang, 1945)
<i>N. benthamiana</i>	Octoploide	Sequía, frío, déficit de nutrientes	(Deng, et al., 2012)
<i>Poncirus trifoliata</i>	Autotetraploide	Estrés salino en sequía	(Saleh, et al., 2008)
<i>Triticum</i>	Alotetraploide/ alohexaploide	Estrés salino	(Prazak, 2001)

Los poliploides son empleados ampliamente en la industria ornamental por sus características mejoradas como flores más grandes y una tolerancia mayor al frío. En cuanto a su uso medicinal, los individuos poliploides usualmente presentan más biomasa o contenido de los compuestos con un principio activo (Gao, et al., 1996; Shao, et al., 2003).

Varias investigaciones científicas han concluido, en múltiples especies de cultivo a las que un aumento en la poliploidía confiere tolerancia al déficit hídrico, a la temperatura o contra estrés salino. Plantas del género *Citrus* autotetraploides, *Brassica rapa* y *Robinia pseudoacacia* exhiben una mejor adaptación al estrés salino que sus contrapartes diploides (Saleh, et al., 2008; Allario, et al., 2011; Meng, et al., 2011; Wang, et al., 2013). El uso de portainjertos de la variedad tetraploide estable Rangpur (*C. limonia*) para el cultivo de Valencia Delta (*Citrus sinensis*) resulta en una tolerancia mayor a sequias que su contraparte diploide (Allario, et al., 2013). *Nicotiana benthamiana* octoploide es más resistente a sequias, estrés por frío y al déficit nutritivo que las tetraploides (Deng, et al., 2012). Las plantas tetraploides de *Dioscorea zingiberensis* muestran una resiliencia mayor contra temperaturas altas que su versión diploide (Zhang, et al., 2010).

En conclusión, se ha empleado la poliploidía de una manera eficiente para mejorar la resistencia contra varios estreses ambientales a lo largo de la mejora de los cultivos agrícolas. Para ello se han empleado diferentes técnicas, la mayoría de ellas relacionadas con el cultivo *in vitro* como se mostrará en el siguiente apartado.

#### **1.3.4.- Los poliploides y el cultivo *in vitro***

Las principales vías para obtener nuevas líneas poliploides son realizando tratamientos con agentes antimitóticos (colchicina, orizalina, amiprofosmetil...). Los tratamientos pueden hacerse en condiciones *in vivo*, concretamente aplicando estos compuestos en los meristemos apicales de la planta o bien pueden hacerse en condiciones de cultivo *in vitro*. A continuación, se exponen varios ejemplos de investigaciones en donde se logró la obtención de poliploides a través del cultivo *in vitro*.

Por medio del cultivo *in vitro* se puede inducir eventos de poliploidización en haploides de cebolla (*Allium cepa*). Para inducir el evento se trataron explantes y plántulas en condiciones de cultivo *in vitro* con colchicina u orizalina. Ambos agentes antimitóticos probaron ser eficaces en la producción de diploides, siendo ligeramente mejor la colchicina. Sin embargo, con los tratamientos de orizalina se obtuvo plantas con una calidad vegetal superior, es decir, con un mejor aspecto físico. En conclusión, la inducción de un evento de duplicación génica en explantes durante el primer ciclo de micropropagación resulta ser una opción valiosa y eficiente en cuanto a tiempo para producir plantas dobles haploides (Geoffriau, et al., 1997).

En otro estudio sobre la granada (*Punica granatum*) se evaluó la posibilidad de inducción de tetraploides por medio del cultivo *in vitro*. Se realizó un tratamiento con colchicina en tejido vegetal y se obtuvo callo en donde, posteriormente, se micropropagaron los brotes resultantes. Estos se cultivaron produciéndose una tasa de tetraploides del 20%, resultado verificado mediante citometría de flujo. Durante la investigación se observó que las plantas tetraploides, en condiciones *in vitro*, presentaron raíces más cortas, hojas verdaderas más anchas y cortas que las plantas diploides. Posteriormente, estas presentaron un crecimiento y floración normal en invernadero, pero sus flores presentaron un mayor diámetro y una longitud menor que las plantas diploides. El número de granos de polen por antera fue mayor en los individuos tetraploides pero la viabilidad fue menor. La granada tetraploide es semi-fértil, por lo tanto, puede ser empleada en cruces para producir individuos triploides cuyos frutos podrían alcanzar el estatus "sin semilla" (Shao, et al., 2003).

Por otro lado, la polisomatía puede ser una posible fuente de variación en la ploidía. En un estudio del 2005 se evaluó la polisomatía en diferentes órganos de semillas y plántulas diploides, triploides y tetraploides en la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). El patrón de polisomatía fue dependiente del órgano y característico de la etapa del desarrollo de la plántula. La condición de polisomatía también se diferenció entre plantas de distintos niveles de ploidía, estando más presente en las plántulas diploides y menos presente en las tetraploides (Sliwinska & Lukaszewska, 2005). El fenómeno de polisomatía no ocurre solamente en la remolacha azucarera sino también en *Arabidopsis thaliana* (Galbraith, et al., 1991), *Cucumis sativus* (Gilissen, et al., 1993),

*Mesembryanthemum crystallinum* y otras 8 especies suculentas con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (De Rocher, et al., 1990) y en algunas especies del género *Brassica* (Kudo & Kimura, 2001a, 2001b).

La polisomatía también ha sido observada en los protocormos de ejemplares diploides de *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*. En el 2009 Chen et al. consiguieron la duplicación de la ploidía por medio de la regeneración *in vitro* de protocormos escindidos o PLBs (protocorm-like bodies, cuerpos pseudo-protocormos). Ellos observaron una variación en el contenido de DNA en los núcleos extraídos de protocormos de una planta diploide, en otras palabras, presencia de polisomatía. El tejido presentó un abanico de núcleos con diferentes ploidías que empezaban desde la diploidía y se extendía hasta la hexadecaploidía. Estas observaciones indicaron la existencia de células endopoliploides en los protocormos. Este estudio también llegó a la misma conclusión que otros anteriormente mencionados, las características de las flores fueron diferentes entre plantas diploides y tetraploides de la misma especie. El tallo floral en las plantas tetraploides fue más corto que en su contraparte diploide. Sin embargo, las flores y los tallos fueron más grandes en las plantas tetraploides (Figura 7).

En conclusión, la regeneración *in vitro* a partir de células endopoliploides ya existentes en el tejido de los protocormos en *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* permite obtener individuos tetraploides sin necesidad de un tratamiento químico (colchicina, orizalina, etc) (Chen, et al., 2009). Esto resulta muy interesante ya que evita la reversión en la ploidía hacia niveles más bajos dando lugar a regenerantes poliploides estables. Por ello será esta aproximación la que se aplicará en este trabajo cuando tratemos de generar poblaciones poliploides *in vitro*.



**Figura 7.** Flores de *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* tetraploide (izquierda) y diploide (derecha) regenerado de un explante de PLB. Las plantas tetraploides provinieron de secciones de protocormos regenerados por cultivo *in vitro*. (Chen, et al., 2009)

### 1.3.5.- Los poliploides en la mejora genética de la berenjena

Hasta ahora se ha visto que la obtención de organismos poliploides tiene un gran interés en la mejora genética vegetal. No es diferente en el caso de la berenjena, donde como veremos a continuación se ha trabajado bastante en este campo con un cierto grado de éxito. Algunas de las aproximaciones han sido las siguientes.

#### 1.3.5.1.- Naturales

Melo et al. realizaron en 2011 un análisis para las especies diploides y poliploides del género de *Solanum*. Se estudiaron 9 individuos de este género para localizar marcadores específicos de especie. Se emplearon métodos convencionales de tinción que permitieron una descripción de los parámetros citogenéticos más comunes para una caracterización de cariotipo, como el número, tamaño de juego cromosómico, morfología, tipo de núcleo interfásico y patrón de condensación de los cromosomas. Se llegó a la conclusión de que 6 especies fueron diploides ( $2n= 2x= 24$ ). Sin embargo, las tres especies restantes resultaron ser poliploides. La naturaleza diploide ( $x= 12$ ) es la normal en más de la mitad de las especies estudiadas dentro del género *Solanum* pero la condición de poliploidía es común dentro de varios subgéneros como *Solanum* (*Solanum* sect. *Solanum*) (Edmonds, 1977), *Potatoe* Dumort (*Solanum* sect. *Potatoe*) (Hawkes, 1990) y *Archeosolanum* (Randell & Symon, 1976). Al igual que este trabajo nosotros realizaremos una evaluación de la ploidía de diversas entradas del proyecto "Linking genetic resources, genomes and phenotypes of Solanaceous crops" (ahora en adelante "G2P-SOL") con el objetivo de saber si existe variabilidad en cuanto a ploidía dentro de la berenjena.

#### 1.3.5.2.- Inducidas

Ali et al. (1992) investigaron la relación entre la anfidiploidía y la resistencia a marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en *Solanum*. Para ello, cruzó *Solanum melongena* y *Solanum integrifolium*, pero los híbridos interespecíficos resultantes eran estériles. Para solventar la esterilidad se trató a los híbridos con colchicina y finalmente se obtuvo plantas anfidiploides. Estas últimas produjeron frutos viables mientras que los híbridos interespecíficos o no tuvieron una producción de frutos o lo hicieron en una cantidad muy baja. Las semillas provenientes de las plantas anfidiploides eran considerablemente más grandes que las producidas por los híbridos interespecíficos. Las plántulas obtenidas a partir de semillas de parentales anfidiploides fueron resistentes a las cepas más virulentas de la bacteria que causa la marchitez.

En otra investigación también se empleó el tratamiento de colchicina para inducir un evento de poliploidía. Otube et al. (2006) realizaron estudios citogenéticos en algunas especies de *Solanum* (Solanaceae) oriundas de Nigeria y llegaron a la conclusión de que se pueden obtener tetraploides por medio del tratamiento con colchicina. Sin embargo, en muchas ocasiones da lugar a una poliploidización parcial o aneuploidía que a la larga provoca una reversión hacia la dotación diploide normal del individuo.

Debido al potencial interés comercial que tiene la producción de berenjenas sin semillas y a la necesidad de un método eficiente para desarrollar líneas poliploides estables con

las que obtener individuos triploides, en el presente trabajo. nos centraremos en el estudio de la ploidía de la berenjena y en las posibles vías para explotar sus aplicaciones en la mejora genética vegetal.

## 2.- Objetivos

El objetivo principal es abrir una nueva vía encaminada hacia la producción de berenjenas sin semilla. Por ello, se hará una evaluación de entradas de berenjena del proyecto G2P-SOL para comprobar sus niveles de ploidía. También, se tratará de desarrollar un método de producción de poliploides *in vitro* aprovechando los potenciales fenómenos de polisomatía a partir de distintos tejidos de plántulas de berenjena. Para ello se optará por una vía de organogénesis inducida sin utilizar agentes antimitóticos como la colchicina o la orizalina. En concreto los objetivos del trabajo son:

- Realizar un análisis de la ploidía en un conjunto de variedades de berenjena (*Solanum melongena*) de diferentes partes del mundo, así como especies silvestres relacionadas, con la finalidad de estudiar las variaciones en el genoma dentro de esta especie mediante la citometría de flujo.
- Evaluar los efectos del cultivo *in vitro* en la variación de la ploidía de plantas regeneradas a partir de distintos explantes de las entradas Mel 1.1, Mel 3.3, IVIA371, Black Beauty (BB), MM1597, y *S. insanum* (INS1).
- Evaluar el nivel de ploidía de los explantes iniciales empleados en cultivo *in vitro* para comprobar si hay una relación directa entre el nivel de ploidía interno de los tejidos y el de las plantas regeneradas

### 3.- Materiales y métodos

En este trabajo se realizaron dos experimentos completamente independientes el uno del otro. En el primero se evaluó el nivel de ploidía de una colección de entradas de berenjena del G2P-SOL (a este experimento lo llamaremos experimento 1). Por otra parte, se realizó el experimento 2, en el cual evaluamos el patrón polisomático de seis variedades de berenjena y cultivamos *in vitro* explantes de cotiledón e hipocótilo. Posteriormente se evaluó el nivel de ploidía de las plantas regeneradas para ver si había alguna correlación con el nivel de polisomatía del tejido del cual provenían.

#### 3.1.- Material vegetal

La tabla 4 detalla las entradas empleadas en el estudio de citometría junto con su lugar de bioprospección, todas estas especies provienen del programa G2P-SOL (<http://www.g2p-sol.eu/>). Estas entradas son las que se utilizaron en el experimento 1. En este estudio de citometría se empleó tomate Heinz (The Tomato Genome Consortium, 2012) como control interno debido a que se conoce el tamaño exacto de su genoma y servirá para interpolar el tamaño del genoma de las accesiones analizadas.

Las accesiones de Mel 1.1 y Mel 3.3 proceden del banco de semillas del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Son dos variedades de origen africano. La variedad Mel 1.1 produce frutos blancos y los de Mel 3.3 son verde (Figura 8). Estas variedades se han utilizado ampliamente en el programa EGGPLANT pre-Breeding y serán empleadas en el experimento 2 junto con las accesiones IVIA371, Black Beauty (BB), MM1597, y *S. insanum* (INS1), el ancestro silvestre de la berenjena y la única especie silvestre en el acervo genético primario de la berenjena (Syfert, et al., 2016; Ranil, et al., 2017). Este material vegetal ha sido previamente sometido a caracterización genética y morfológica (Muñoz-Falcón, et al., 2009; Kaushik, et al., 2016; Portis, et al., 2017) y se encontró que exhibe un alto grado de variación genética para caracteres morfológicos y agronómicos.



**Figura 8.** Entradas de berenjena usadas en los experimentos de este estudio. Se puede apreciar la diversidad morfológica que existe entre ellas. MEL 1.1 (A); MEL 3.3 (B); IVIA371 (C); Black Beauty (D) MM1597 (E); *S. insanum* (INS1) (F).

**Tabla 4.** Entradas seleccionadas para el estudio

<b>Código numérico</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Nombre local</b>	<b>Lugar de colecta</b>	<b>País</b>
<b>11</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena del país	Pozohondo; Albacete	ESP
<b>18</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena bardina	Jaraíz de la Vera; Cáceres	ESP
<b>19</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena de borde blanco	Zalamea la Real; Huelva	ESP
<b>32</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena del terreno	Valdegovía, Gurendes; Álava	ESP
<b>38</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena del terreno	Cádiar; Granada	ESP
<b>44</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena de Almagro	Almagro; Ciudad Real	ESP
<b>50</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena basta	Noblejas; Toledo	ESP
<b>51</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena mallorquina	Inca; Baleares	ESP
<b>79</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena de Almagro	Talavera la Real; Badajoz	ESP
<b>80</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena redonda jaspeada	Alzira; Valencia	ESP
<b>87</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena redonda morada	San Fulgencio; Alicante	ESP
<b>90</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena rayada	Foios; Valencia	ESP
<b>95</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena	Mahón; Baleares	ESP
<b>118</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena	Torres de Albarracín; Teruel	ESP

<b>119</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena blanca	Artés; Barcelona	ESP
<b>120</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena de conserva	Aldea del Rey; Ciudad Real	ESP
<b>122</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena de metro		ESP
<b>123</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena verde clareta	L'Alcúdia de Crespins; Valencia	ESP
<b>125</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena rayada	Villarreal; Castellón	ESP
<b>128</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena larga negra	Lorca, La Hoya; Murcia	ESP
<b>131</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena larga roja	Xeraco; Valencia	ESP
<b>133</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena bola alistada de Gandia	Xeraco; Valencia	ESP
<b>135</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena llarga morada	Benimassot; Alicante	ESP
<b>136</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena rayada	Ontinyent; Valencia	ESP
<b>137</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena bola verde	Xeraco; Valencia	ESP
<b>139</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena globosa morada	L'Alcúdia de Crespins; Valencia	ESP
<b>140</b>	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena negra globosa	Ontinyent; Valencia	ESP

164	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>	Berenjena de rabo largo	Valdepeñas; Ciudad Real	ESP
172	<i>Solanum</i>				
187	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>			LKA
188	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>			LKA
189	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>			LKA
191	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>		Bondoukou; Gontougo	CIV
192	<i>Solanum</i>	<i>melongena</i>		Abengourou; Indénié-Djuablin	CIV
201	<i>Solanum</i>				
205	<i>Solanum</i>				
209	<i>Solanum</i>	<i>aethiopicum</i>		Tchologo; Ouangolodougou	CIV
214	<i>Solanum</i>	<i>aethiopicum-anguivi</i>		Tchologo; Ferkessedougou, Koumbala, Djeouara	CIV
222	<i>Solanum</i>	<i>aethiopicum</i>		Boukani; Bouna, Ansoum	CIV
239	<i>Solanum</i>	<i>aethiopicum</i>		Indénié-Djuablin; Abengourou, Abengourou	CIV
240	<i>Solanum</i>				
248	<i>Solanum</i>	<i>macrocarpon</i>		Agnéby-Tiassa; Tiassalé, Ndouci	CIV
249	<i>Solanum</i>				
250	<i>Solanum</i>	<i>aethiopicum</i>	Diakatou; berenjena escarlata	Zaragoza	ESP
251	<i>Solanum</i>	<i>aethiopicum</i>	Berenjena roja de Rotonda	Potenza; Rotonda, Valle del Mercure	ITA
252	<i>Solanum</i>	<i>linnaeanum</i>		Baleares; Alcúdia, Port d'Alcúdia, Paraje	ESP
ANG	<i>Solanum</i>	<i>anguivi</i>		Costa de Marfil	CIV
ANG13	<i>Solanum</i>	<i>anguivi</i>		Costa de Marfil	CIV

<b>BON</b>	<i>Solanum</i>			
<b>CAM5</b>	<i>Solanum</i>	<i>campylacanthum</i>	Ethiopia	ETH
<b>CAM6</b>	<i>Solanum</i>	<i>campylacanthum</i>	Zambia	ZMB
<b>CAM62</b>	<i>Solanum</i>	<i>campylacanthum</i>	Zambia	ZMB
<b>CAM8</b>	<i>Solanum</i>	<i>campylacanthum</i>	Tanzania	TZA
<b>CAM82</b>	<i>Solanum</i>	<i>campylacanthum</i>	Tanzania	TZA
<b>ECAVI</b>	<i>Solanum</i>	<i>elaeagnifolium</i>		
<b>ELE</b>	<i>Solanum</i>	<i>elaeagnifolium</i>	Grecia	GRC
<b>ELE22</b>	<i>Solanum</i>	<i>elaeagnifolium</i>	Grecia	GRC
<b>HTOR4N</b>	<i>Solanum</i>	<i>torvum</i>	Sri Lanka	LKA
<b>INC</b>	<i>Solanum</i>	<i>incanum</i>	Israel	ISR
<b>INC1</b>	<i>Solanum</i>	<i>incanum</i>	Israel	ISR
<b>INS1</b>	<i>Solanum</i>	<i>insanum</i>	Sri Lanka	LKA
<b>INS2</b>	<i>Solanum</i>	<i>insanum</i>	Sri Lanka	LKA
<b>LIC</b>	<i>Solanum</i>	<i>lichtensteinii</i>	Suráfrica	
<b>LIC1</b>	<i>Solanum</i>	<i>lichtensteinii</i>	Suráfrica	
<b>LIC13</b>	<i>Solanum</i>	<i>lichtensteinii</i>	Suráfrica	
<b>LIC2</b>	<i>Solanum</i>	<i>lichtensteinii</i>	Irán	IRN
<b>LIN1</b>	<i>Solanum</i>	<i>linnaeanum</i>	España	ESP
<b>LIN33</b>	<i>Solanum</i>	<i>linnaeanum</i>	Desconocido (Origen: Alemania)	DEU
<b>M128X TOR 33</b>	<i>Solanum</i>			
<b>M3</b>	<i>Solanum</i>		Costa de Marfil	CIV
<b>M3 4N</b>	<i>Solanum</i>		Costa de Marfil	CIV
<b>M3 X ELE 22</b>	<i>Solanum</i>			
<b>M3X VIO1</b>	<i>Solanum</i>			
<b>M5</b>	<i>Solanum</i>		Sri Lanka	LKA
<b>MEL1 4N</b>	<i>Solanum</i>		Costa de Marfil	CIV

<b>MEL12</b>	<i>Solanum</i>		Costa de Marfil	CIV
<b>MEL21</b>	<i>Solanum</i>		Costa de Marfil	CIV
<b>MEL43</b>	<i>Solanum</i>		Sri Lanka	LKA
<b>MEL53</b>	<i>Solanum</i>		Sri Lanka	LKA
<b>MEL64</b>	<i>Solanum</i>		Sri Lanka	LKA
<b>MM1597</b>	<i>Solanum</i>			
<b>MM577</b>	<i>Solanum</i>			
<b>PYR</b>	<i>Solanum</i>	<i>pyracanthum</i>	Desconocido (origen: EEUU)	USA
<b>PYR13</b>	<i>Solanum</i>	<i>pyracanthum</i>	Desconocido (origen: EEUU)	USA
<b>TOR3</b>	<i>Solanum</i>	<i>torvum</i>	Desconocido (origen: Alemania)	DEU
<b>VIO1</b>	<i>Solanum</i>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• El código numérico utilizado para encontrar las entradas en el banco de germoplasma del COMAV</li> <li>• ITA: Italia</li> </ul>				

## 3.2 Citometría de flujo: Preparación y análisis

### 3.2.1.- Análisis de muestras empleando tinción de Yoduro de propidio

En el experimento 1 se quería evaluar el tamaño exacto del genoma, para ello se acudió a las instalaciones del servicio de citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe y se empleó el citómetro CytoFLEX S (Beckman Coulter).

Se procesaron conjuntamente fragmentos de hoja verdadera (1,5 cm x 1,5 cm aproximadamente) tanto de cada una de las entradas de interés como de tomate Heinz. Se añadió 650  $\mu$ L de tampón de extracción de núcleos (tabla 5) y se procedió a cortar con una hoja de bisturí en una placa Petri. Se realizaron varios cortes longitudinales paralelos y luego se rotó la muestra 90° para repetir el proceso hasta que el tampón de extracción se tornara verde. Posteriormente, se pipeteó el volumen máximo posible de líquido resultante (~650  $\mu$ L) y se filtró en filtros Celltrics® (Disposable filters 30  $\mu$ m Ref: 04-0042-2316) en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Por último, se agregó 650  $\mu$ L de la tinción de yoduro de propidio (Tabla 6) a la solución filtrada anteriormente.

Las muestras se pasaron por el citómetro a razón de 10  $\mu$ L/s. Se decidió hacer a una velocidad baja para evitar el agregado de núcleos, evitando así una lectura errónea por parte del citómetro.

### 3.2.2.- Análisis de muestras empleando tinción de DAPI

Empleando esta tinción evaluamos el patrón polisomático de los tejidos empleados en cultivo *in vitro* durante el experimento 2. También analizamos aquellas plantas regeneradas a partir de los explantes cultivados. Para ello se empleó el citómetro Cyflow® ploidy analyser (Sysmex) en las instalaciones del COMAV.

Para ello se procesaron fragmentos de hipocótilo (1 cm de longitud), cotiledón (1 cm x 1 cm). Cada muestra se cortó con una hoja de bisturí en una placa Petri junto con 500  $\mu$ L de tampón de extracción de núcleos (tabla 5). Se realizaron varios cortes longitudinales paralelos y luego se rotó la muestra 90° para repetir el proceso hasta que el tampón de extracción se tornara verde. Posteriormente, se pipeteó el volumen máximo posible de líquido resultante y se filtró empleando filtros Celltrics® (Disposable filters 30  $\mu$ m Ref: 04-0042-2316) en un tubo Sarstedt (Röhren – Tubes 3,5 mL, 55x12 mm. No. /REF 55.484). Por último, se agregó 500  $\mu$ L de la tinción DAPI (Sysmex CyStain® UV ploidy Order number: 05-5001) a la solución filtrada anteriormente.

Las muestras se procesaron en el citómetro con una ganancia de 417 a razón de ~2  $\mu$ L/s durante unos 30 s. Se fijó el pico diploide del control (hoja verdadera) a un valor de fluorescencia arbitrario de 50 unidades en el eje de las X, consecuentemente, el pico correspondiente a la fase G2 se ubicó en el valor arbitrario de 100 unidades del mismo eje.

**Tabla 5.** Composición del tampón de lisis LB01 para citometría de flujo (pH 7,5) (Doležel et al., 1989)

Compuesto	Concentración	Para 200 ml
Tris base	15 mM	0,36 gr
Na <sub>2</sub> EDTA	2 mM	0,148 gr
Espermina	0,5 mM	0,02 gr
KCl	80 mM	1,192 gr
NaCl	20 mM	0,232
2-mercaptoetanol	15 mM	240 µl
Tritón X-100	0,1% (v/v)	200 µl

**Tabla 6.** Composición del tampón de Yoduro de propidio

Compuesto	Para 100 ml de agua bidestilada
Citrato trisódico.5H <sub>2</sub> O	100 mg
<b>Yoduro de propidio</b>	5 mg
RNasa A	10 mg
Tritón X-100	100 µl

### 3.3.- Cultivo *in vitro*

#### 3.3.1.- Medios empleados

Para las sesiones se empleó el medio control (E0) y el medio E6 que es el resultado de agregar 2 mg/L de ribosido de zeatina (ZR) al medio control (tabla 7). Posteriormente durante la etapa de enraizado de los brotes regenerados se empleó el medio R2 que es una variación del medio E0 al añadirle 1 mg/L de ácido indol butírico (IBA).

**Tabla 7.** Medio E0

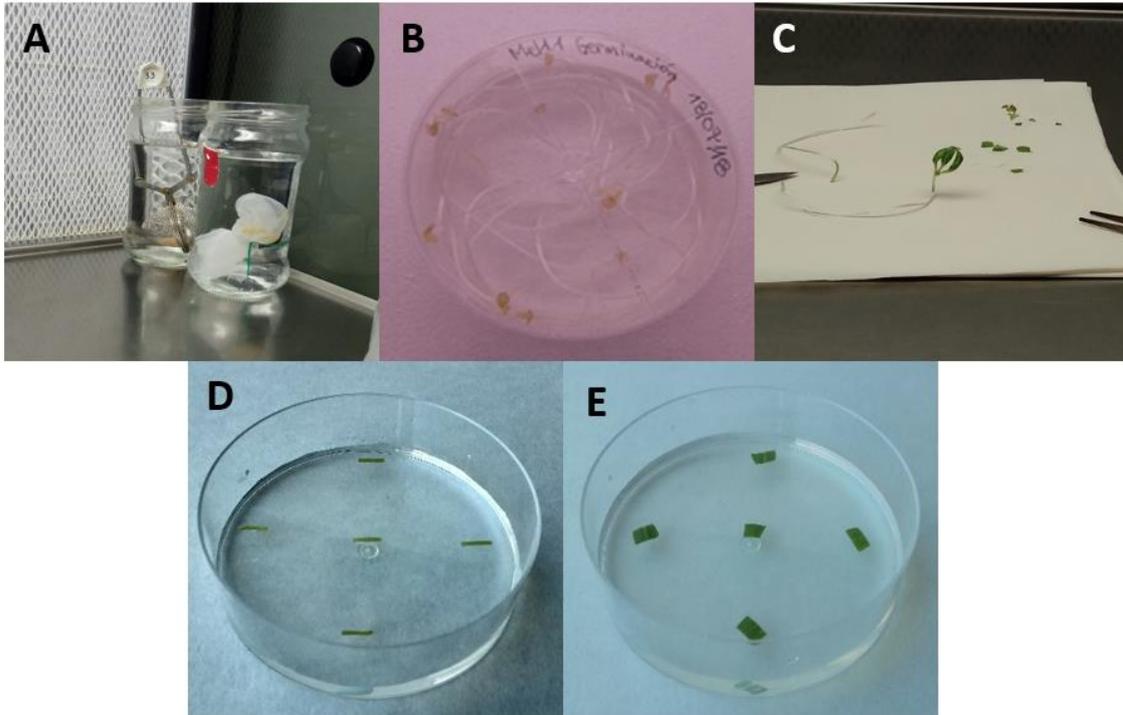
	Para germinación y regeneración pH 5,9	Para las sesiones pH 5,9
Reactivos	g/L	g/L
Sacarosa	15	30
Sales MS	2,63	4,4
Agar Gelrite	7	7

#### 3.3.2.- Metodología

Se esterilizaron las semillas empleando filtros de té o bolsitas de muselina (Figura 9). En la cabina de flujo laminar se procede a la esterilización de las semillas.

1. En primer lugar se realiza un lavado con etanol 70% durante 30 segundos.
2. En segundo lugar se realiza un lavado con lejía 20% durante 10 minutos.

- Finalmente se realizan 3 lavados de 2 minutos con agua destilada estéril. Se agita vigorosamente para lavar residuos de lejía que hubieran quedado en las semillas.



**Figura 9.** (A) Esterilización de semillas. Se empleó bolas para té o muselina para mantener separadas las semillas de cada entrada. Distintas fases del proceso de obtención de explantes para su cultivo in vitro. Germinación en placa Petri en oscuridad (B); Preparación de explantes de hipocótilo y cotiledón (C). Placas Petri con 5 explantes de hipocótilo (D) y cotiledón (E)

Posteriormente las semillas se germinaron en placas Petri con medio R2 las cuales se incubaron en oscuridad (Figura 9, B). Se esperó 1 mes, hasta que las plántulas presentaron hipocótilos largos y cotiledones desenrollados.

Alcanzado un tamaño lo suficientemente grande, se realizaron los medios de cultivo con 3-4 días de antelación a la sesión para descartar posibles eventos de contaminación. Se procedió a realizar las sesiones en cabina de flujo laminar. Las tres sesiones consistieron en el cultivo de explantes de todos los genotipos en el medio E6 (Figura 9, C).

Se colocaron 5 explantes, ya sean de hipocótilo o cotiledón por placa Petri en medio E6 para cada genotipo (Figura 9, D y E) y estas placas se incubaron en condiciones de luz durante un mes hasta la aparición de los primeros brotes. Se realizaron tres réplicas experimentales.

Transcurrido 1 mes desde el cultivo se procedió al subcultivo de brotes regenerados. Estos brotes se reubicaron en un medio de cultivo de enraizamiento R2 para obtener una planta completa. Por último, se pasó una muestra de cada planta regenerada por el citómetro para determinar su ploidía.

## 4.- Resultado y discusión

### 4.1.- Análisis de ploidía de las entradas de berenjenas y especies silvestres relacionadas.

En el experimento 1 se quería evaluar el tamaño exacto del genoma. Debido a que estas mediciones requerían mucha precisión se optó por la tinción de yoduro de propidio en vez de la de DAPI. Se hizo un cribado de las 86 entradas iniciales eliminando muestras con resultados no fiables, quedándonos con 69 entradas. Los resultados no fiables se deben a la existencia de picos extraños que imposibilitaron la identificación de los picos pertenecientes a la muestra y al tomate con un alto grado de certeza. En la gráfica (Figura 10) se puede apreciar la estimación del tamaño de genoma de las 69 entradas cribadas junto con el error estándar de los datos recogidos por cada entrada por parte del citómetro de flujo.

La técnica de la citometría de flujo nos permite obtener datos de miles de núcleos en cada medida, por ello el error estándar tiende a 0 y no se aprecia apenas las barras de error (Doležel & Bartoš, 2005; Doležel, et al., 2007). Se analizaron alrededor de 10.000 núcleos por entrada lo cual le da una robustez estadística muy elevada. Por ello la estimación del tamaño del genoma empleando la citometría de flujo es un método muy fiable siempre y cuando se tenga un control interno con tamaño relativamente similar a la colección de muestras problema y se realicen las réplicas necesarias (Ochatt, et al., 2011; Doležel & Bartoš, 2005). A pesar de ser una técnica fiable para la estimación del tamaño del genoma, varias investigaciones llegaron a una misma conclusión; el establecimiento de patrones o controles internos es necesario para la estimación del tamaño de genoma en plantas (Doležel, et al.; 1998, 2003, 2007; Doležel & Bartoš, 2005).

Se aprecia la diferencia de tamaño entre las plantas tetraploides (Mel1 4n, Mel3 4n, HTOR 4n) y el resto de las entradas utilizadas. Por otro lado, las entradas pertenecientes a *Solanum campylacanthum* también son diferentes. Esta diferencia puede deberse a que *S. campylacanthum* es un pariente silvestre oriundo de África (Samuels, 2012) en donde se ha documentado la variación del nivel de ploidía en la naturaleza. Investigaciones realizadas por Anaso & Uzo (1989, 1990) reportaron haber encontrado ejemplares tetraploides en Nigeria y se contrastaron con su contraparte diploide mediante estudios citológicos, fenotípicos, de segregación y cruzabilidad entre individuos diploides y tetraploides.

Por último, un grupo de entradas (E11, E32, E95, E133, E137, E139, E187, E188, E239, E251 y E252) también parecen ser diferente de las entradas restantes, el grupo presentó un tamaño de genoma ~33% mayor, aproximadamente. Esto podría deberse a que hay una gran variabilidad pangenómica presente en la colección del género *Solanum* del banco de germoplasma del COMAV (Prohens, et al., 2004). El pangenoma hace referencia al juego completo de genes complementarios pertenecientes a un clado biológico (especies) que puede ser descompuesto en genes base y genes prescindibles

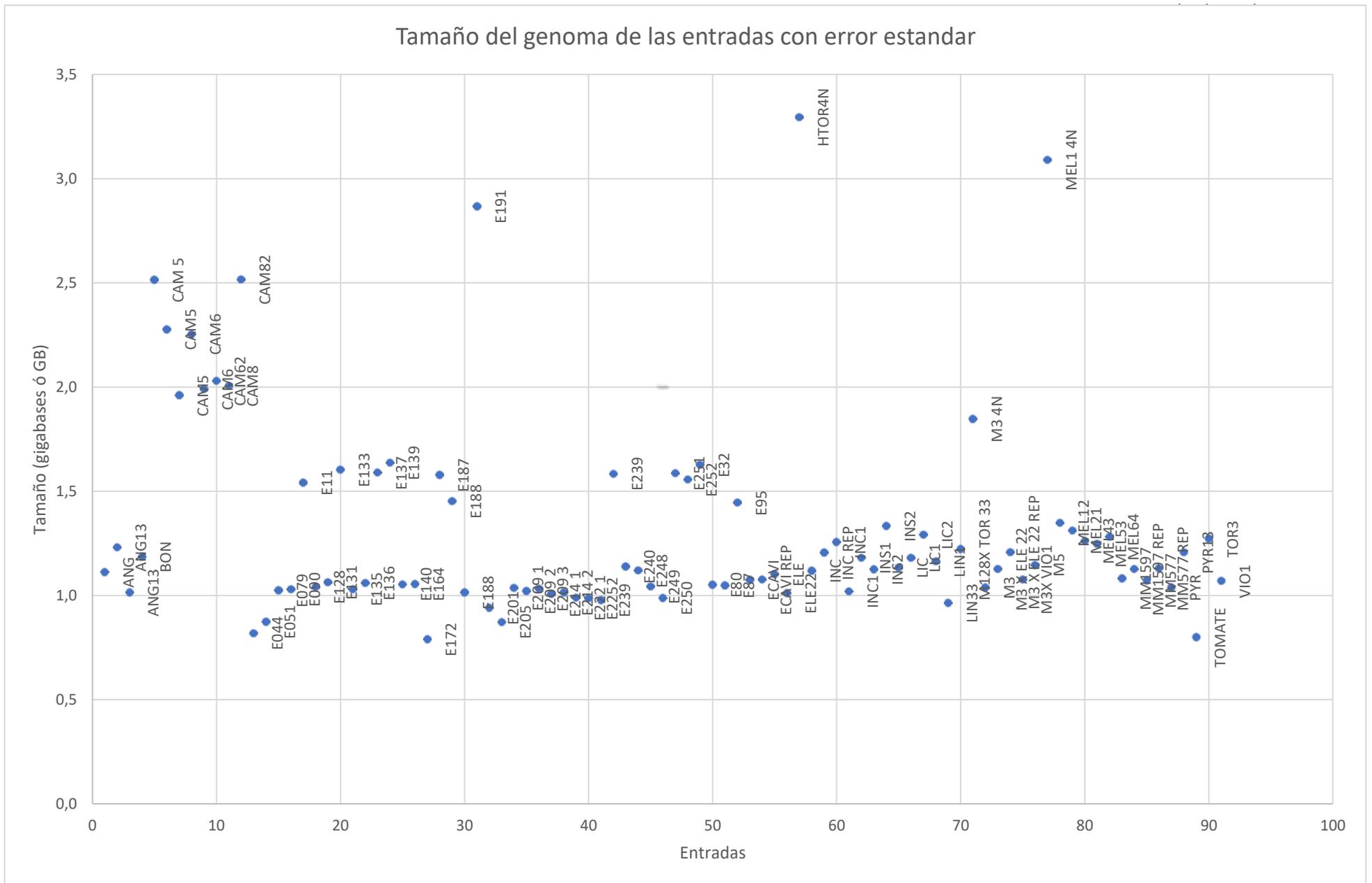
que están presentes en una porción del clado o son específicos de individuos (Tettelin, et al., 2005). El estudio de esta posible variabilidad pangenómica podría esclarecer el entendimiento sobre la diversidad genética del acervo genético de cultivos comestibles, por lo tanto, la pangenómica puede ser una herramienta útil y poderosa en programas de mejora genética vegetal. Esta herramienta cobra más importancia si se tiene en cuenta los problemas de actualidad a los que se enfrenta la humanidad, el vertiginoso crecimiento poblacional mundial y el cambio climático. Sin embargo, esta herramienta es de máxima utilidad cuando se complementa con estudios de QTLs y/o estudios de asociación del genoma completo (GWAS) (Tao, et al., 2019). En la próxima década se podrá empezar a emplear esta herramienta debido a que en 2019 se construyó el pangenoma del tomate cultivado y parientes cercanos que agregó una secuencia de 351 Mb y 4873 genes codificantes que se pasaron por alto en el genoma de referencia. Este pangenoma alberga variación genética útil que no ha estado disponible a investigadores ni mejoradores hasta la fecha. Esta nueva variación genética puede traducirse en nuevos fenotipos que sean de interés para programas de mejora genética (Gao, et al., 2019).

Sin embargo, este experimento forma parte de una puesta a punto de una técnica que hasta hoy no se había implementado en el laboratorio. Debido a esto, se sugiere realizar un experimento de seguimiento a este grupo de entradas con más réplicas técnicas y biológicas para indagar más y confirmar las diferencias encontradas.

A lo largo de la puesta a punto de la técnica de citometría de flujo encontramos varios puntos en el protocolo que condujeron a cometer errores y se tuvieron que modificar en lo que respecta al material vegetal:

1. La muestra debe tener a lo sumo 1 semana de preparación. Si se prolonga más tiempo sin analizar, su calidad desciende considerablemente, provocando histogramas con picos escarpados y anchos. Si las muestras no se analizarán inmediatamente después de su preparación lo recomendable es congelarlas a -70 °C. Wheelless et al. en su estudio de 1991 tuvieron un percance en donde se les descongelaron unas muestras y posteriormente reportaron que estas presentaban una calidad inferior comparado con las otras muestras en los análisis citométricos.
2. El estado fisiológico del tejido vegetal es de vital importancia. Se llegó a la conclusión de que es ideal el tejido vegetal joven para el análisis de la ploidía. Conforme el tejido envejece la calidad del análisis citométrico desciende dramáticamente (Pellicer & Leitch, 2014). Esta situación puede deberse a que puede existir interferencia por parte de compuestos citosólicos con el fluorocromo utilizado (Doležel, et al., 2007) debido a que la composición química del citoplasma cambia en la senescencia del tejido vegetal consecuentemente afectando la calidad de los análisis citométricos.
3. Por último, es fundamental la ausencia de plagas debido a que degenera la calidad de la muestra vegetal y contamina el histograma con picos extraños debidos probablemente a la degeneración de los núcleos o restos de tejido de las propias plagas. En el caso de esta investigación hubo temporalmente un

problema con mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Esta plaga tiene un tamaño de genoma de 1019 Mb (ejemplar masculino) y 2019 Mb (ejemplar femenino) (Brown, et al., 2005). El tamaño de genoma del ejemplar masculino de *B. tabaci* es bastante similar a los tamaños calculados para las entradas pertenecientes al género *Solanum* y podría inducir confusión y error por lo que estas muestras fueron descartadas del análisis.



**Figura 10.** Tamaño inferido del genoma de diversas entradas del género *Solanum* evaluadas mediante citometría de flujo con tinción de IP

#### 4.2.- Análisis de los efectos del cultivo *in vitro* en la variación de la ploidía de plantas regeneradas de distintos genotipos de berenjena (*Solanum melongena*)

Para el experimento 2 se empleó la tinción de DAPI debido a que es eficiente para evaluar cambios grandes en niveles de ploidía y a pesar de que ofrece menos resolución que el IP, el procesado y la toma de datos son más rápidos.

Los resultados del experimento 2 se presentan en la tabla 8. Estos datos se obtuvieron para todos los genotipos cultivados *in vitro* en el medio E6 y en el medio R2 para inducción de raíz en condiciones *in vitro*. Los genotipos Mel 1.1 y Mel 3.3 obtuvieron los rendimientos más bajos en cuanto a producción de brotes y también para plantas aclimatadas en ambos tipos de explantes (hipocótilo y cotiledón), esto fue debido a que los datos pertenecen a una sesión experimental diferente al resto del set de datos y en ellos los rendimientos rondaron en torno al 10%. El resto de los genotipos mostraron rendimientos muy altos con porcentajes de explantes con brotes rondando el 70% o incluso más. Sin embargo, el porcentaje de plantas aclimatadas por explante inicial no fue proporcional con respecto al porcentaje de explantes con brotes.

Se observa una variación considerable en los parámetros relacionados con la aclimatación de las plantas; porcentaje de explantes con brotes, plantas aclimatadas, porcentaje de plantas aclimatadas explantes iniciales. El número de plantas aclimatadas por explante fue muy bajo considerando que se lograron muchos brotes por explantes con este protocolo. Esto fue debido a la ausencia de un paso de elongación entre la etapa de formación de brotes y enraizado porque no todos los brotes tengan un tamaño suficientemente grande para ser subcultivados a medio enraizante (R2). Este paso puede mejorarse incorporando una etapa de elongación antes de subcultivar en medio R2. Para lograr esto los explantes con brotes pueden ser subcultivados a un medio libre de hormona (E0) (Franklin, et al., 2004; Sarker, et al., 2006), en un medio con una concentración de 1,5 mg/L de ácido giberélico (Rivas-Sendra, et al., 2015) o incubándolos en condiciones de oscuridad por dos semanas (observaciones personales).

Se apreció un porcentaje de alrededor del 30% de regenerantes tetraploides a partir de explante de cotiledón. En hipocótilo también sucedió lo mismo, el porcentaje de tetraploides regenerados fue alrededor del 25-30%. Estos resultados coinciden con lo observado en otras investigaciones que demuestran la existencia, de un patrón de polisomatía en otras especies (van den Bulk, et al., 1990; Sliwinska & Lukaszewska, 2005; Chen, et al., 2009).

La proporción de plantas poliploides regeneradas fue similar entre los dos tejidos a pesar de que el cotiledón presente un porcentaje menor de células poliploides comparado con el hipocótilo. Esto puede deberse a que el tejido de cotiledón tiene una mayor capacidad organogénica (Mohamed, et al., 2011). Se observó que una proporción importante de las plantas regeneradas fueron individuos tetraploides estables, resultado que indica que este es un método altamente eficiente para el desarrollo de líneas tetraploides estables sin el uso de agentes químicos antimitóticos (Tabla 8). El porcentaje de plantas

poliploides fue similar entre los genotipos, excepto en el caso de los cotiledones proveniente de IVIA371 en donde el 50% de las plantas regeneradas fueron tetraploides.

**Tabla 8.** Número de plantas aclimatadas por cada genotipo de berenjena utilizando el medio E6 en condiciones de luz para dos tipos de explantes iniciales, hipocótilo y cotiledón. Posteriormente se utilizó el medio R2 para la inducción de las raíces. El análisis de la ploidía de las plantas aclimatadas se muestra en las dos últimas columnas. Explantes iniciales usados (n=45).

Genotipo	Cotiledón				
	Explantes con brotes (%)	Plantas aclimatadas	Plantas aclimatadas/explantes iniciales (%)	% de regenerantes diploides	% de regenerantes tetraploides
MEL 1.1	7,50 ± 0,04	5	11,11 ± 0,04	75,00 ± 0,19	25,00 ± 0,19
MEL 3.3	15,00 ± 0,05	7	15,55 ± 0,05	69,23 ± 0,17	30,77 ± 0,17
IVIA371	96,66 ± 0,03	36	80,00 ± 0,06	50,00 ± 0,08	50,00 ± 0,08
Black Beauty (BB)	100,00 ± 0,00	15	33,33 ± 0,07	61,30 ± 0,13	38,70 ± 0,13
MM1597	69,23 ± 0,07	13	28,88 ± 0,06	64,71 ± 0,13	35,29 ± 0,13
<i>S. insanum</i> (INS1)	100,00 ± 0,00	24	53,33 ± 0,07	75,00 ± 0,09	25,00 ± 0,09
Genotipo	Hipocotilo				
	Explantes con brotes (%)	Plantas aclimatadas	Plantas aclimatadas/explantes iniciales (%)	% de regenerantes diploides	% de regenerantes tetraploides
MEL 1.1	20,00 ± 0,23	6	13,33 ± 0,05	77,78 ± 0,17	22,22 ± 0,17
MEL 3.3	10,00 ± 0,12	4	8,88 ± 0,04	90,48 ± 0,15	9,52 ± 0,15
IVIA371	86,66 ± 0,06	13	28,88 ± 0,06	65,00 ± 0,13	35,00 ± 0,13
Black Beauty (BB)	70,00 ± 0,08	21	46,76 ± 0,07	66,70 ± 0,10	33,30 ± 0,10
MM1597	86,66 ± 0,06	9	20,00 ± 0,06	76,92 ± 0,14	23,08 ± 0,14
<i>S. insanum</i> (INS1)	90,00 ± 0,05	17	37,77 ± 0,07	74,80 ± 0,11	25,20 ± 0,11

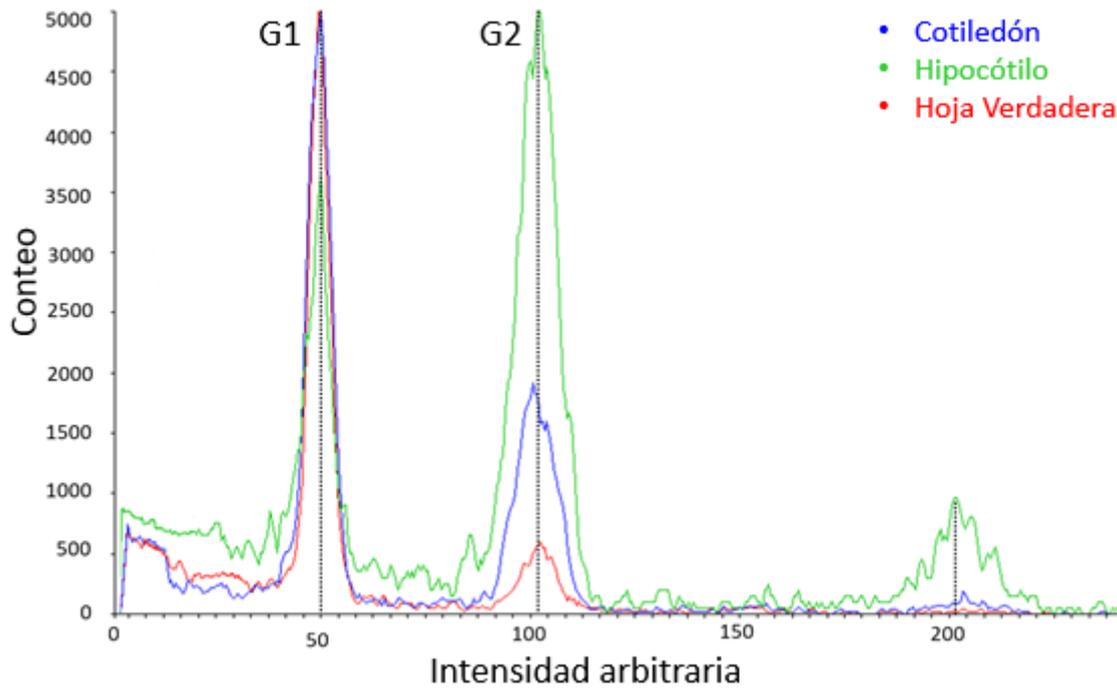
#### 4.3.- Evaluación del nivel de ploidía de los explantes iniciales empleados en cultivo *in vitro*

Se observó un patrón polisomático similar en todos los genotipos cuando se analizó la ploidía de los tejidos de hipocótilo, cotiledón y hoja verdadera (figura 11). El tejido de cotiledón tuvo entre 3 a 5 veces más células que el de hoja verdadera en el pico de fase G2. En el caso de hipocótilo, el número de células del pico G2 fue entre 7 a 9 veces mayor que el pico de la muestra de hoja verdadera. Tanto el tejido de hipocótilo como cotiledón mostraron un pico en el valor arbitrario de fluorescencia de 200, pico inexistente en el análisis de la hoja verdadera, como puede observarse en el histograma conjunto de la figura 11.

Estos resultados pueden ser debidos a un patrón polisomático generado por endorreduplicaciones. Otros autores ya observaron que las primeras endorreduplicaciones ocurren en el hipocótilo y cotiledón durante la germinación favoreciendo la elongación celular a un menor coste (Gilissen, et al., 1993; Smulders, et al., 1994). Este proceso biológico también ocurre en el tallo y las hojas durante el desarrollo (elongación y expansión celular). Por lo tanto, el desarrollo de la condición polisomática está regulado genéticamente. Este fenómeno, nos ha permitido en este trabajo obtener individuos poliploides a partir de aquellos tejidos con células poliploides endógenas.

Sin embargo, los patrones de polisomatía también están influenciados por las condiciones de cultivo de las plantas ya que se han observado diferencias en el patrón polisomático de los tejidos de cotiledón y hoja verdadera de plantas crecidas en condiciones *in vitro* y crecidas en invernadero (Smulders, et al., 1994). Esto es muy interesante ya que nos puede permitir en un futuro explotar, mediante esta aproximación, diferentes patrones polisomáticos de un mismo cultivo.

Smulders (1994) concluyó que, en tomate, el desarrollo de la condición de polisomatía es una parte fundamental en la diferenciación celular a lo largo del ciclo de vida vegetal. Esta conclusión también la comparte Barlow (1975), aportando que las endorreduplicaciones son parte de la diferenciación morfológica y bioquímica de las células de la caliptra en maíz. Este fenómeno biológico posteriormente se encontró en otras especies (Nagl, 1978). Estas afirmaciones ponen en valor todavía más la aplicación que se propone en este trabajo, ya que las diferencias en los patrones polisomáticos no sólo se dan en berenjena. Según estos autores es algo general en la mayoría de los cultivos y que está ligado a los mecanismos de desarrollo, por lo que si disponemos de protocolos de regeneración *in vitro* eficientes podemos generar poblaciones poliploides sin el uso de agentes antimitóticos. Es decir, tenemos a nuestra disposición una nueva metodología para generar plantas sin semillas.



**Figura 11.** Histograma obtenido por citometría de flujo de explantes de hipocótilo y cotiledón. Histograma de citometría de flujo sobre los contenidos relativos de DNA nuclear en diferentes tejidos de la entrada IVIA371: cotiledón (azul), hipocótilo (verde) y hoja verdadera (rojo). El eje de las coordenadas representa el nivel de la intensidad de la fluorescencia relativa a la cantidad de DNA nuclear. Se observa claramente los perfiles polisomáticos presentes en los diferentes tejidos analizados. El pico ubicado en el valor 50 corresponde al núcleo diploide en fase G1. El eje de las ordenadas indica el número de núcleos analizados.

## 5.- Conclusiones

1. La citometría es una técnica fundamental para la estimación precisa del tamaño de genoma en muestras biológicas. Nos da un alto nivel de robustez debido al gran número de muestras analizadas en muy poco tiempo. Además, es técnicamente muy simple de aplicar y teniendo en cuenta unas sencillas consideraciones nos proporciona unos resultados limpios y fácilmente interpretables a un precio muy económico.
2. Se han encontrado algunos individuos con variaciones en su tamaño dentro de la colección de entradas del G2PSOL. No obstante, deberían de hacerse más replicas técnicas y biológicas para confirmar estas variaciones ya que este trabajo se ha centrado en establecer las bases para la correcta aplicación de la técnica y por falta de tiempo no se han podido realizar más sesiones.
3. La variación de tamaño también allana el camino hacia futuras investigaciones, justificando el rumbo hacia estudios pangenómicos, herramienta que posiblemente será importante para hacer frente a la creciente población mundial y al cambio climático.
4. Existe un patrón de polisomático durante el crecimiento y desarrollo en la berenjena. Es posible aprovechar la polisomatía para obtener plantas poliploides estables sin emplear agentes antimitóticos
5. Tanto los cotiledones como los hipocótilos pueden ser utilizados como explantes de partida para la regeneración de plantas poliploides en condiciones de cultivo *in vitro*.
6. En este trabajo se han establecido las bases para continuar futuras investigaciones tanto en lo que concierne al estudio y evolución de los genomas de la berenjena y sus especies silvestres relacionadas, como para abrir nuevas vías que permitan la producción de frutos sin semillas en este cultivo.

## Bibliografía

- Ali, M., Okubo, H. & Fujieda, K., 1992. Production and characterization of *Solanum* amphidiploids and their resistance to bacterial wilt. *Scientia Horticulturae*, Issue 49, pp. 181-196.
- Allario, T. y otros, 2013. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant, Cell and Environment*, Issue 36, pp. 856-868.
- Allario, T. y otros, 2011. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany*, Issue 62, pp. 2507-2519.
- Amar, Z., 2000. *Giddule Erez-Yisra'el bime habenayim [Agricultural produce in the Land of Israel in the Middle Ages]*. Jerusalem: Yad Izhak Benzvi.
- Anaso, H. U. & Uzo, J. O., 1989. Allotetraploid wild *Solanum incanum*. *Nucleus (Calcutta)*, Issue 32, pp. 4-7.
- Anaso, H. U. & Uzo, J. O., 1990. Relationship and classification among *Solanum incanum* complex. *Cytologia*, Issue 55, pp. 1-14.
- Anon., 1988. Badenjan, eggplant, aubergine. Vol. III.4.. En: *Encyclopedia Iranica*. Londres: Routledge & Kegan Paul, pp. 366-367.
- Barlow, P. W., 1975. *The Development and Function of Roots*. J.G. Torrey and D.T. Clarkson ed. New York: Academic Press.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J. & Johnston, S., 2003. Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany*, Issue 91, pp. 547-557.
- Blanc, G. & Wolfe, K. H., 2004. Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during *Arabidopsis* Evolution. *The Plant Cell*, Issue 16, pp. 1679-1691.
- Bomblies, K. & Madlung, A., 2014. Polyploidy in the *Arabidopsis* genus. *Chromosome Research*, Issue 22, pp. 117-134.
- Brown, J. K. y otros, 2005. Nuclear DNA content of the whitefly *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae: Hemiptera) estimated by flow cytometry. *Bulletin of Entomological Research*, Issue 95, pp. 309-312.
- Cansian Sattler, M., Carvalho, C. R. & Clarindo, W. R., 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta - Springer*, 243(2), pp. 281-296.
- Carmi, N. y otros, 2003. Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rolB gene in the ovary. *Planta*, Issue 217, pp. 726-735.
- Chandra, A. & Dubey, A., 2010. Effect of ploidy levels on the activities of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase, superoxide dismutase and peroxidase in *Cenchrus* species grown under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, Issue 48, pp. 27-34.

- Chao, D. Y. y otros, 2013. Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science*, Issue 341, pp. 658-659.
- Chen, S. & Tang, P., 1945. Studies on colchicine-induced autotetraploid barley. III. Physiological studies.. *American Journal of Botany*, Issue 32, pp. 177-179.
- Chen, W. H., Tang, C. Y. & Kao, Y. L., 2009. Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Issue 98, pp. 229-238.
- Comai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, Issue 6, pp. 836-846.
- Conant, G. C. & Wolfe, K. H., 2008. Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Review Genetics*, Volumen 9, pp. 938-950.
- De Jong, M. y otros, 2009. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *The Plant Journal*, Issue 5, pp. 160-170.
- De Ponti, O. M. B. & Garretsen, F., 1976. Inheritance of parthenocarpy in pickling cucumbers (*Cucumis sativus* L.) and linkage with other characters. *Euphytica*, Issue 25, pp. 633-642.
- De Rocher, E. J., Harkins, K. R., Galbraith, D. W. & Bohnert, H. J., 1990. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. *Science*, Issue 250, pp. 99-101.
- del Pozo, J. C. & Ramirez-Parra, E., 2014. Deciphering the molecular bases for drought tolerance in *Arabidopsis* autotetraploids. *Plant Cell and Environment*, Issue 37, pp. 2722-2737.
- del Pozo, J. C. & Ramirez-Parra, E., 2015. Whole genome duplication in plants: an overview from *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 22(66), pp. 6991-7003.
- Deng, B. y otros, 2012. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids?. *Journal of Plant Growth Regulation*, Issue 66, pp. 1-37.
- Deng, B. y otros, 2012. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids?. *Journal of Plant Growth Regulation*, Issue 66, pp. 1-37.
- Doi, M., 1991. *Nôgyô zu'e*. In: *Nôsan bunka kyôkai (ed.), Nihon nôsho zenshû vol. 26, Tokyo. [A Japanese illustrated agriculture treatise of the beginning of the 18th century]*. s.l.:s.n.
- Doležel, J. & Bartoš, J., 2005. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, Issue 95, pp. 99-110.
- Doležel, J. y otros, 1998. Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Annals of Botany*, Issue 82, pp. 17-26.
- Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda, J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *NATURE PROTOCOLS*, 2(9), pp. 2233-2244.
- Donzella, G., Spena, A. & Rotino, G. L., 2000. Transgenic parthenocarpic eggplants: superior germplasm for increased winter production. *Molecular Breeding*, 6(1), pp. 79-86.

- Dubcovsky, J. & Dvorak, J., 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploidy wheat under domestication. *Science*, Issue 316, pp. 1862-1866.
- Du, L. y otros, 2015. SmARF8, a transcription factor involved in parthenocarpy in eggplant. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(1), pp. 93-105.
- Edger, P. P. & Pires, J. C., 2009. Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Research*, Issue 17, pp. 699-717.
- Edmonds, J. M., 1977. Taxonomic studies on Solanum L. section Solanum (Maurella). *Botanical Journal of the Linnean Society*, Issue 75, pp. 141-178.
- Ervin, C. D., 1939. Polysomaty in Cucumis melo. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, Issue 25, pp. 335-338.
- Feldman, M., 2001. Origin of cultivated wheat. En: *The world wheat book: a history of wheat breeding*. Paris, France: Lavoisier, pp. 3-56.
- Finkers, R. y otros, 2007. The construction of a Solanum habrochaites LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to Botrytis cinera. *Theoretical and Applied Genetics*, Issue 114, pp. 1071-1080.
- Franklin, G., Sheeba, C. J. & Lakshmi Sita, G., 2004. Regeneration of Eggplant (Solanum melongena L.) from Root Explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(2), pp. 188-191.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R. & Knapp, S., 1991. Systemic endopolyploidy in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, Issue 96, pp. 985-989.
- Gao, L. y otros, 2019. The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature Genetics*, Volumen 51, pp. 1044-1051.
- Gao, S. L., Zhu, D. N., Cai, Z. H. & Xu, D. R., 1996. Autotetraploid plants from colchicine treated bud culture of Salvia miltiorrhiza Bge. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Issue 47, pp. 73-77.
- Geitler, L., 1939. Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. *Chromosoma*, Issue 1, pp. 1-22.
- Geitler, L., 1953. *Protoplasmatologia-Handbuch der Protoplasmaforschung*. Wien: Springer.
- Gendreau, E. y otros, 1998. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the Arabidopsis thaliana hypocotyls. *The Plant Journal*, Issue 13, pp. 221-230.
- Gendreau, E. y otros, 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, Issue 114, pp. 295-305.
- Geoffriau, E., Kahane, R., Bellamy, C. & Rancillac, M., 1997. Ploidy stability and in vitro chromosome doubling in gynogenic clones of onion (Allium cepa L.). *Plance Science*, Issue 122, pp. 201-208.
- Gilissen, L. J. W., van Staveren, M. J., Creemers-Molenaar, J. & Verhoeven, H. A., 1993. Development of polysomaty in seedlings and plants of Cucumis sativus L.. *Plant Science*, Issue 91, pp. 171-179.
- Goetz, M. y otros, 2007. Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiology*, Issue 145, pp. 351-366.

- Gorguet, B. y otros, 2008. Mapping and characterization of novel parthenocarpy QTLs in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, Issue 116, pp. 755-767.
- Grosser, J. W. & Gmitter Jr, F. G., 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Issue 104, pp. 343-357.
- Grosser, J. W. y otros, 1998. Somatic Hybridization, an Integral Component of Citrus Cultivar Improvement: I. Scion Improvement. *Horticultural Science*, 6(33), pp. 1057-1059.
- Gustafson, F. G., 1942. Parthenocarpy: natural and artificial. *The Botanical Review*, Issue 8, pp. 599-654.
- Haider, N., 2013. The origin of the B-genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Russian Journal of Genetics*, Issue 49, pp. 263-274.
- Hawkes, J. G., 1990. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources.
- Hendrick, U. P., 1919. *Sturtevant's Notes on Edible Plants*, New York: s.n.
- Heun, M. y otros, 1997. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, Issue 278, pp. 1312-1314.
- Janick, J., 1984. *Horticultural Reviews, Volume 6*, Wesport, Connecticut: The AVI Publishing Company.
- Kagale, S., Robinson, S. J. & Nixon, J., 2014. Polyploid evolution of the Brassicaceae during the Cenozoic era. *The Plant Cell*, Issue 26, pp. 2777-2791.
- Kalloo, G., 1991. *Genetic Improvement of Tomato*. s.l.:Springer-Verlag.
- Kasajima, I., Ide, Y., Yokota, H. M. & Fujiwara, T., 2010. WRKY6 is involved in the response to boron deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, Issue 139, pp. 80-92.
- Kaushik, P. y otros, 2016. Phenotyping of Eggplant Wild Relatives and Interspecific Hybrids with Conventional and Phenomics Descriptors Provides Insight for Their Potential Utilization in Breeding. *Frontiers in plant science*, Volumen 7.
- Kihara, H., 1951. Triploid water melons. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Issue 58, pp. 217-230.
- Knapp, S., Vorontsova, M. S. & Prohens, J., 2013. Wild relatives of the eggplant (*Solanum melongena* L.: Solanaceae): New understanding of species names in complex group. *PLoS ONE*, 8(2), p. e57039.
- Kudo, N. & Kimura, Y., 2001a. Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some Brassica species. *Theoretical and Applied Genetics*, Issue 102, pp. 104-110.
- Kudo, N. & Kimura, Y., 2001b. Patterns of endopolyploidy during seedling development in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Annals of Botany*, Issue 87, pp. 275-281.
- Langlet, O., 1927. Zur Kenntnis der polysomatischen Zellkernen in Wurzelmeristem. *Svensk Botanisk Tidskrift (The Swedish Botanical Society)*, Issue 21, pp. 169-184.
- Lewis, W. H., 1980. *Ploidy: Biological Relevance*. New York: Plenum Press.

- Lin, S., George, W. L. & Splittstoesser, W. E., 1984. Expression and inheritance of parthenocarpy in 'Severianin' tomato. *The Journal of Heredity*, Issue 75, pp. 62-66.
- Lin, Z. F. y otros, 2008. SITPR1, a tomato tetratricopeptide repeat protein, interacts with the ethylene receptors NR and LeETR1, modulating ethylene and auxin responses and development. *Journal of Experimental Botany*, Issue 59, pp. 4271-4287.
- Liu, S. y otros, 2011. In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Txvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. *Scientia Horticulture*, Issue 127, pp. 411-419.
- Maestrelli, A. y otros, 2003. Freezing effecto on some quality parameters of transgenic parthenocarpic eggplants. *Journal of Food Engineering*, Issue 56, pp. 285-287.
- Manzaneda, A. J. y otros, 2012. Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *New Phytologist*, Issue 193, pp. 797-805.
- Marín, J., 2008. Portagrano. En: *Vademécum de variedades hortícolas*. El Ejido (Almería): Escobar Impresores S.L., p. 455.
- Marti, C. y otros, 2007. Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *The Plant Journal*, Issue 52, pp. 865-876.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, Issue 264, pp. 421-424.
- Melo, C. A. y otros, 2011. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L.. *Plant Systematics and Evolution*, Issue 293, pp. 227-235.
- Meng, H.-b.y otros, 2011. Comparison between a tetraploid turnip and its diploid progenitor (*Brassica rapa* L.): the adaptation to salinity stress. *Agricultural Sciences in China*, Issue 10, pp. 363-375.
- Meng, H., Jiang, S. S. & Hua, S. J., 2011. Comparison between a tetraploid turnip and its diploid progenitor (*Brassica rapa* L.): the adaptation to salinity stress. *Agricultural Sciences in China*, Issue 10, pp. 363-375.
- Mezzetti, B., Landi, L., Paldolini, T. & Spena, A., 2004. The DefH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnology*, Issue 4, pp. 1-10.
- MissouriBotanicalGarden, 2019. [En línea]  
Available at:  
<http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=287158&isprofile=0&chr=19>
- Miyatake, K. y otros, 2012. Development of selective markers linked to a major QTL for parthenocarpy in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Issue 124, pp. 1403-1413.
- Mohamed, A. N., Ismail, M. R., Kadir, M. A. & Saud, H. M., 2011. In vitro performances of hypocotyl and cotyledon explants of tomato cultivars under sodium chloride stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), pp. 8757-8764.

- Molesini, B. y otros, 2009. Aucsia gene silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Physiology*, Issue 149, pp. 534-548.
- Mraz, P., Tarbush, E. & Muller-Scharer, H., 2014. Drought tolerance and plasticity in the invasive knapweed *Centaurea stoebe* s.l. (Asteraceae): effect of populations stronger than those of cytotype and range. *Annals of Botany*, Issue 114, pp. 289-299.
- Muñoz-Falcón, J. E., Prohens, J., Vilanova, S. & Nuez, F., 2009. Diversity in commercial varieties and landraces of black eggplants and implications for broadening the breeder's gene pool. *Annals of Applied Biology*, 154(3), pp. 453-465.
- Muñoz-Falcón, J. E. y otros, 2009. Distinguishing a protected geographical indication vegetable (Almagro eggplant) from closely related varieties with selected morphological traits and molecular markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(2), pp. 320-328.
- Nagl, W., 1978. *Endopolyploidy and Polyteny in Differentiation and Evolution*. North-Holland(Amsterdam): s.n.
- Nesbitt, M., 1998. Where was einkorn wheat domesticated?. *Trends in Plant Science*, Issue 3, pp. 1360-1385.
- Obute, G. C., Ndukwu, B. C. & Okoli, B. E., 2006. Cytogenetic studies on some Nigerian species of *Solanum* L. (Solanaceae). *African Journal of Biotechnology*, 5(13), pp. 1196-1199.
- Ochatt, S. J., Patat-Ochatt, E. M. & Moessner, A., 2011. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Issue 104, pp. 329-341.
- Pandolfini, T., 2009. Seedless Fruit Production by Hormonal Regulation of Fruit Set. *Nutrients*, Issue 1, pp. 168-177.
- Pandolfini, T. y otros, 2002. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnology*, Issue 2, pp. 1-11.
- Pauly, A., Pareyt, B., Fierens, E. & Delcour, J. A., 2013. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) kernel hardness: II. Implications for end-product quality and role of puroindolines therein. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Issue 12, pp. 427-438.
- Pellicer, J. & Leitch, I. J., 2014. Chapter 14 - The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. En: P. Besse, ed. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Science+Business Media, pp. 279-307.
- PennStateUniversity, 2019. *Plant Village*. [En línea]  
Available at: <https://plantvillage.psu.edu/topics/eggplant/infos>  
[Último acceso: 6 Febrero 2019].
- Pike, L. M. & Peterson, C. E., 1969. Inheritance of parthenocarpy in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, Issue 18, pp. 101-105.
- Portis, E., Acquadro, A., Barchi, L. & Lanteri, S., 2017. *A genome-wide survey of the microsatellite content of the eggplant (Solanum melongena L.) genome and the development of a web-based database*. Napier (New Zealand), International Society for Horticultural Science (ISHS) and Plant & Food Research.

- Prazak, R., 2001. Salt tolerance of *Triticum monococcum* L., *T. dicoccum* (Schrank) Schubl., *T. durum* Desf. and *T. aestivum* L. seedlings. *Journal of Applied Genetics*, Issue 42, pp. 289-292.
- Prince, V. E. & Pickett, B., 2002. Splitting Pairs: The Diverging Fates of Duplicated Genes. *Nature Reviews Genetics*, Volumen 3, pp. 827-837.
- Prohens, J., Blanca, J. M., Rodríguez-Burruezo, A. & Nuez, F., 2004. *Spanish traditional varieties of eggplant: diversity and interest for plant breeding*. Noordwijkerhout, The Netherlands, Plantum NL.
- Prohens, J., Ruiz, J. J. & Nuez, F., 1998. The Inheritance of Parthenocarpy and associated traits in Pepino. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 3(123), pp. 376-380.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W., 1998. Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, pp. 467-501.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W., 2002. Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Issue 33, pp. 589-639.
- Randell, B. R. & Symon, D. E., 1976. Chromosome numbers in Australian *Solanum* species. *Australian Journal of Botany*, Issue 24, pp. 369-379.
- Ranil, R. H. G. y otros, 2017. *Solanum insanum* L. (subgenus *Leptostemonum* Bitter, Solanaceae), the neglected wild progenitor of eggplant (*S. melongena* L.): a review of taxonomy, characteristics and uses aimed at its enhancement for improved eggplant breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(7), pp. 1707-1722.
- Rastogi, S. & Liberles, D. A., 2005. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evolutionary Biology*, 5(28).
- Rivas-Sendra, A., Corral-Martínez, P., Camacho-Fernández, C. & Seguí-Simarro, J. M., 2015. Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) - Journal of Plant Biotechnology*, 122(3), pp. 759-765.
- Rotino, G. L. y otros, 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology*, Issue 15, pp. 1398-1401.
- Saleh, B. y otros, 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus Biologies*, Issue 331, pp. 703-710.
- Samuels, J., 2012. *Solanum incanum* s.l. (Solanaceae): taxonomic relationships between *S. incanum*, *S. campylacanthum*, *S. panduriforme* and *S. lichtensteinii*. *Kew Bulletin*, Volumen 67, pp. 401-411.
- Sarker, R. H., Yesmin, S. & Hoque, M. I., 2006. Multiple Shoot Formation in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 16(1), pp. 53-61.
- Schijlen, E. G. W. M. y otros, 2007. RNA Interference Silencing of Chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology*, Issue 144, pp. 1520-1530.
- Schwabe, W. W. & Mills, J. J., 1981. Hormones and parthenocarpic fruit set: A literature survey. *Horticultural Science Abstracts*, Issue 51, pp. 661-698.

- Shao, J., Chen, C. & Deng, X., 2003. In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Issue 75, pp. 241-246.
- Shewry, P. R., 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), pp. 1537-1553.
- Shozo, M. & Keita, S., 1997. *Creation of seedless fruit*. Japón, Patente nº Nº JP19970279331; PN: JP11103705.
- Sliwinska, E. & Lukaszewska, E., 2005. Polysomaty in growing in vitro sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. *Plant Science*, Issue 168, pp. 1067-1074.
- Smulders, M. J. M., Rus-Kortekaas, W. & Gilissen, L. J. W., 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science*, 97(1), pp. 53-60.
- Soltis, D. E., Visger, C. J. & Soltis, P. S., 2014. The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*, 1057-1078(101).
- Sun, Z., Staub, J. E., Chung, S. M. & Lower, R. L., 2006. Identification and comparative analysis of quantitative trait loci associated with parthenocarpy in processing cucumber. *Plant Breeding*, Issue 125, pp. 281-287.
- Syfert, M. M. y otros, 2016. Crop wild relatives of the brinjal eggplant (*solanum melongena*): poorly represented in genebanks and many species at risk of extinction. *American Journal of Botany*, Issue 103, pp. 635-651.
- Tao, Y. y otros, 2019. Exploring and Exploiting Pan-genomics for Crop Improvement. *Molecular Plant*, 12(2), pp. 156-169.
- Te Beest, M. y otros, 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*, Issue 109, pp. 19-45.
- Tettelin, H. y otros, 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial 'pangenome'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), pp. 13950-13955.
- The Tomato Genome Consortium, 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, Volumen 485, pp. 635-641.
- Tsao, T., 1980. Growth substances: Role in fertilization and sex expression. *Plant Growth Substances*, pp. 345-348.
- van den Bulk, R. W., Löffler, H. J. M., Lindhout, W. H. & Koornneef, M., 1990. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theoretical and applied Genetics*, Volumen 80, pp. 817-825.
- Vardi, A. y otros, 2000. Tentative model on the inheritance of juvenility, self-incompatibility and parthenocarpy. *Acta Horticulturae*, Issue 535, pp. 199-205.
- Varoquaux, F., Blanvillain, R., Delseny, M. & Gallois, P., 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends in biotechnology*, 18(6), pp. 233-242.
- Vavilov, N. I., 1926. Centers of origins of cultivated plants. *Trudy po Prikladnoj Botanike Gen. Sel.*, pp. 139-248.

- Vinogradov, A. E., 1994. Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry*, Issue 16, pp. 34-40.
- Wang, H. y otros, 2005. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell*, Issue 17, pp. 2676-2692.
- Wang, J., Tian, L. & Lee, H. S., 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in Arabidopsis allotetraploids. *Genetics*, Issue 167, pp. 1961-1973.
- Wang, X., Cheng, Z.-M., Zhi, S. & Xu, F., 2016. Breeding Triploid Plants: A Review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, Issue 52, pp. 41-54.
- Wang, Z., Wang, M., Liu, L. & Meng, F., 2013. Physiological and proteomic responses of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) subjected to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, Issue 14, pp. 20299-20325.
- Weaver, R. J. & McCune, S. B., 1959. Effect of gibberellin on seedless *Vitis vinifera*. *Hilgardia*, 6(29), pp. 247-275.
- Weaver, R. J. & McCune, S. B., 1961. Effect of gibberellin on vine behavior and crop production in seeded and seedless *Vitis vinifera*. *Hilgardia*, 15(30), pp. 425-444.
- Weaver, R. J. & McCune, S. B., 1962. Studies on pre-bloom sprays of gibberellin to elongate and loosen clusters of Thompson Seedless grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1(13), pp. 15-19.
- Weaver, R. J. & Pool, R. M., 1965. Bloom spraying with gibberellin loosens clusters of Thompson Seedless grapes. *California Agriculture*, Issue 11, pp. 14-15.
- Wheless, L. L. y otros, 1991. Precision of DNA Flow Cytometry in Inter-Institutional Analyses. *Cytometry*, 5(12), pp. 405-412.
- Yin, Z. y otros, 2006. The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cell & Molecular Biology Letters*, Issue 11, pp. 279-290.
- Zhang, X. Y., Hu, C. G. & Yao, J. L., 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal Plant Physiology*, Issue 167, pp. 88-94.
- Zhang, X. Y., Hu, C. G. & Yao, J. L., 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal Plant Physiology*, Issue 167, pp. 88-94.
- Zijlstra, S., 1985. Parthenocarpy in tomaat; twee nieuwe lijnen uit soortkruising. *Zaadbelangen*, Volumen 4, pp. 92-94.