

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)

Grado en Biotecnología

Respuestas fisiológicas y bioquímicas a la sequía de genotipos de berenjena (*Solanum* spp.)



Trabajo Final de Grado

Elvira Ribera García



Tutora: Ana María Fita Fernández

Cotutor: Óscar Vicente Meana

Curso 2018 – 2019

Valencia, 8 de julio de 2019



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Respuestas fisiológicas y bioquímicas a la sequía de genotipos de berenjena (*Solanum* spp.)

Alumna: Dña. Elvira Ribera García

Valencia, julio de 2019

Tutora: Prof. Dña. Ana María Fita Fernández

Cotutor: Prof. D. Óscar Vicente Meana

Resumen: Como consecuencia del cambio climático, la sequía y la salinidad del suelo están aumentando. Estos factores son responsables de pérdidas muy importantes en la producción agrícola mundial, por lo que el aumento de la tolerancia a sequía y salinidad en nuestros cultivos se ha convertido en una necesidad urgente.

Aunque los principales cultivos utilizados sean relativamente sensibles al estrés hídrico y salino, existe una enorme variabilidad genética en las especies silvestres que puede ser utilizada para mejorar dichos cultivos. En este estudio en concreto, se ha analizado la respuesta a la sequía de nueve genotipos de *Solanum* spp., con el fin de evaluar su potencial para mejorar la tolerancia al estrés hídrico de la berenjena cultivada (*Solanum melongena*). Los genotipos que evaluar son una serie de parientes silvestres de la berenjena (*S. insanum*, *S. incanum*, *S. linnaeanum* y *S. dasyphyllum*). También se ha analizado la respuesta de algunos híbridos de *S. melongena* con *S. insanum* y *S. incanum*.

Con este objetivo, se han realizado dos tratamientos; sequía, que consistió en la eliminación total de riego, y un tratamiento control. La evolución del crecimiento de las plantas ha sido analizada mediante diferentes parámetros morfológicos. Además, se han evaluado algunos mecanismos de tolerancia mediante el análisis de marcadores bioquímicos asociados al estrés abiótico: prolina, flavonoides y compuestos fenólicos totales. También se ha estimado el nivel de estrés oxidativo cuantificando el contenido en malondialdehído (MDA).

Como resultado, el tratamiento de sequía tuvo un gran efecto sobre el crecimiento de las plantas y el contenido en agua de los tejidos. Generalmente, el estrés aumentó significativamente el contenido en MDA, prolina, flavonoides y compuestos fenólicos totales, aunque se han observado diferencias cuantitativas entre especies. Concretamente, *S. dasyphyllum* y una de las accesiones de *S. insanum* mostraron una mayor tolerancia a la sequía: INS1 destaca por ser la accesión con menor pérdida de agua y DAS1 por la mayor capacidad de generación de biomasa en condiciones de sequía. El híbrido INC1 x MEL1 se constituyó también como buen candidato para la introgresión de genes en *S. melongena*, al obtener mejor respuesta a la sequía que los otros híbridos evaluados y que sus propios parentales. Los resultados aquí obtenidos respecto a la tolerancia de las especies pueden ser de utilidad para diseñar futuros proyectos que aborden la mejora genética de la berenjena cultivada.

Palabras clave: *Solanum* spp., berenjena, sequía, tolerancia, estrés oxidativo, híbridos interespecíficos, biomarcadores

Physiological and biochemical responses to drought in eggplant (*Solanum* spp.) genotype

Elvira Ribera García

Valencia, julio de 2019

Tutora: Prof. Ana María Fita Fernández

Cotutor: Prof. Óscar Vicente Meana

Abstract: As a result of climate change, drought and salinity are increasing in the soil. These factors are the origin of the major decrease regarding the agricultural yield. For this reason, plants tolerance to drought and salinity must be urgently improved.

Although main crops are relatively sensitive to water stress and salt stress, there is high genetic diversity in wild plants that can be used for the improvement of our crops. In this study, the response to drought of nine accessions of *Solanum* spp. was assessed with the aim of finding interesting features for the improvement of eggplant tolerance to water stress. The genotypes are a set of wild plants related to the eggplant (*S. insanum*, *S. incanum*, *S. linnaeanum* y *S. dasyphyllum*). Interspecific hybrids of *S. melongena* with these species. Interspecific hybrids between *S. melongena* and *S. insanum* y *S. incanum* were also assessed.

The plants were subjected to two treatments: control and drought, and during this process, morphological attributes were evaluated. Furthermore, the physiological and biochemical response will be analyzed by using stress biomarkers as proline, flavonoids and total phenolic compounds. Oxidative stress was quantified by measuring malondialdehyde (MDA) content.

In consequence of the drastic treatment, plant development and tissue water content were seriously affected. Generally, water deficit also caused significant increases in MDA, proline, flavonoids and total phenolics compounds. Our results show a better response to drought in the case of *S. dasyphyllum* and one of the accessions of *S. insanum*. *S. dasyphyllum* is capable of generating biomass properly despite the water deficit. *S. insanum* presents the smaller water loss. The hybrid between *S. melongena* and *S. incanum* showed a better response than the other hybrids and even than its parents.

The results obtained here might be useful for future eggplant breeding programmes with the aim of drought tolerance improvement.

Keywords: *Solanum* spp., eggplant, drought, tolerance, oxidative stress, interspecific hybrids, biomarkers

Agradecimientos:

A mi tutora y cotutor por ofrecerme participar en un proyecto gratificante y por ayudarme a que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

A mis compañeras de laboratorio Sara y Carla por su paciencia y por enseñarme el camino a seguir.

A mi familia por el apoyo que me han dado para que estos años fueran posibles.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CAMBIO CLIMÁTICO Y EL RENDIMIENTO AGRÍCOLA.....	1
1.2. MEJORA DE LA TOLERANCIA A LA SEQUÍA Y SALINIDAD	1
1.3. LA BERENJENA CULTIVADA (<i>SOLANUM MELONGENA</i>).....	2
1.4. LAS ESPECIES SILVESTRES COMO RECURSOS GENÉTICOS	3
1.5. LA RESPUESTA AL ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS	4
1.5.1. <i>Los flavonoides y otros compuestos fenólicos como antioxidantes</i>	4
1.5.2. <i>Peroxidación de lípidos de membrana</i>	4
1.5.3. <i>Acumulación de prolina</i>	5
1.5.4. <i>Otros mecanismos que actúan ante el estrés abiótico</i>	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1. MATERIAL VEGETAL	6
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	8
3.3. MEDICIÓN DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.....	8
3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MALONDIALDEHÍDO	9
3.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROLINA	9
3.6. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	10
3.7. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES	10
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	11
3.8.1. <i>Análisis de la varianza (ANOVA)</i>	11
3.8.2. <i>Correlación múltiple de Pearson</i>	11
3.8.3. <i>Análisis de componentes principales (ACP)</i>	11
4. RESULTADOS	11
4.1. EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS Y VERIFICACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO.	11
4.1.1. <i>Progresión de la humedad del sustrato durante el tratamiento</i>	11
4.1.2. <i>Crecimiento de las plantas control durante el tratamiento</i>	12
4.2. LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE SEQUÍA.....	13
4.2.1. <i>Comparación de la respuesta a la sequía de <i>S. melongena</i> y su pool genético</i>	13
4.2.2. <i>Comparación de la respuesta de los híbridos respecto a sus parentales</i>	16
4.2.3. <i>Criterios de evaluación de la tolerancia de las plantas</i>	18
4.2.4. <i>Análisis de componentes principales (ACP) y correlaciones</i>	19
5. DISCUSIÓN	21
5.1. RELEVANCIA DEL PROYECTO	21
5.2. EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS Y VERIFICACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO.	21
5.3. LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE SEQUÍA.....	21
5.3.1. <i>Evaluación de los parámetros de crecimiento y de humedad de <i>S. melongena</i> y su pool genético</i>	21
5.3.2. <i>Estimación del estrés oxidativo mediante la medición de MDA</i>	23
5.3.3. <i>Efecto de la acumulación de prolina</i>	24
5.3.4. <i>Efecto de la acumulación de flavonoides y otros compuestos fenólicos.</i>	25
5.3.5. <i>Evaluación de la respuesta de los híbridos</i>	25
5.3.6. <i>Análisis de componentes principales.</i>	26
5.4. PERSPECTIVAS FUTURAS	27
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29
8. ANEXOS	

Índice de tablas

Tabla 1. Información sobre las especies del género *Solanum* utilizadas.

Tabla 2. Análisis de la varianza para parámetros de crecimiento y humedad de la planta entre t_0 (día de inicio de los tratamientos) y t_1 (día final de tratamiento), correspondiente a las plantas no sometidas a estrés (control).

Tabla 3. Análisis de la varianza para parámetros de crecimiento y humedad de la planta entre las plantas control (no sometidas a estrés) y las plantas sometidas al tratamiento de sequía.

Tabla 4. Análisis de la varianza de los ensayos bioquímicos.

Tabla 5. Análisis de los híbridos utilizando sus parentales medios.

Índice de figuras

Figura 1. Tierras secas del mundo y sus subtipos

Figura 2. Fotografías de los genotipos utilizados realizadas en el primer día del tratamiento.

Figura 3. Formación del aducto MDA-TBA.

Figura 4. Evolución de la humedad relativa promedio del sustrato en los tratamientos de control y sequía.

Figura 5. Variaciones en la humedad de la parte aérea (A), humedad de la raíz (B), peso seco de las hojas (C), peso seco de la raíz (D), área foliar (E) y altura del tallo (F), entre el control y el tratamiento de sequía después de 18 días de tratamiento.

Figura 6. Variaciones en el contenido de MDA (A), prolina (B), compuestos fenólicos totales (C) y flavonoides (D) después de 18 días de tratamiento de sequía.

Figura 7. Porcentaje de reducción del peso fresco (A), porcentaje de reducción de humedad de la planta (B), porcentaje de reducción de biomasa seca (C) y porcentaje de aumento de la eficiencia del uso del agua (D) de las en las plantas sometidas a sequía respecto a sus respectivas plantas control.

Figura 8. *Score plot* (A) y *biplot* del ACP (*score plot* + *loading plot*) (B).

Simbología y abreviaturas

A: absorbancia
ACP: análisis de componentes principales
AF: área foliar en cm²
Al: Altura de la planta
C: control
CFT: Compuestos fenólicos totales
eq.: equivalentes
ES: error estándar
FT: flavonoides totales
F1: valor del híbrido
GA: ácido gálico
H: humedad
IL: línea de introgresión
L: longitud
MDA: malondialdehído
N: número
PC: componente principal
PM: parental medio
PF: peso fresco
PS: peso seco
QTL: *quantitative trait loci*
S: sequía, plantas sometidas a estrés hídrico
T: total
t: tiempo
TBA: ácido tiobarbitúrico
TCA: ácido tricloroacético
TR: tras riego

SUBÍNDICES

0: cero, inicial
1: final, corresponde con el tratamiento control
ho: hojas
p: planta
pa: parte aérea
r: raíz
s: suelo
ta: tallo

SÍMBOLOS

∅: diámetro
ε: coeficiente de extinción molar

1. Introducción

1.1. El cambio climático y el rendimiento agrícola

Al ritmo actual de crecimiento poblacional se prevé que en 2050 la población mundial sea de aproximadamente diez mil millones de personas (Naciones Unidas, 2017). Esto nos plantea varias problemáticas, siendo una de las más alarmantes la imposibilidad de abastecimiento de alimentos a toda la población. En este contexto, es necesario un aumento de la producción agrícola, mientras que la superficie cultivable resulta ser un factor limitante (Ray *et al.*, 2013). La mejora del rendimiento de los cultivos debe ser pues, un objetivo a lograr.

Un cultivo usualmente obtiene sólo una proporción del rendimiento que podría lograr en las condiciones óptimas. En gran medida esto es debido a los factores abióticos a los que se ve sometida una planta en el ambiente en el que está cultivada, pues su efecto reduce el crecimiento (Boyer, 1982). En concreto, se estima que la sequía y la salinidad son los factores abióticos que más pérdidas en producción provocan. Sus efectos pueden reducir el rendimiento de los cultivos mayoritarios más de un 50% (Bray *et al.*, 2000; Bartels y Sunkar, 2005).

Además, en el siglo XXI nos enfrentamos a otro reto: el cambio climático, que también va a causar estragos en la agricultura. Algunos modelos prevén que por cada grado centígrado que suba la temperatura media de la temporada de cultivo, los rendimientos bajarán entre 6-10% (Dempewolf *et al.*, 2014). Las zonas áridas y semiáridas serán las más afectadas por los efectos del cambio climático a corto plazo: los periodos de sequía serán aún más frecuentes e intensos (Figura 1) (IPCC, 2014).

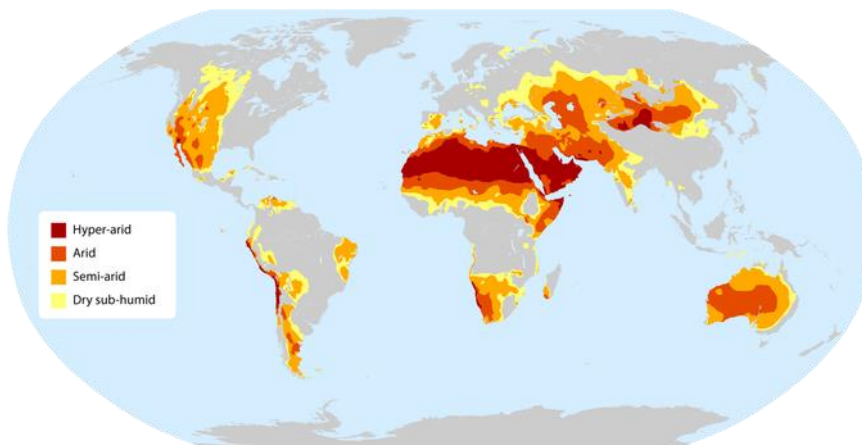


Figura 1. Tierras secas del mundo y sus subtipos (2007). Recuperado de: <http://www.fao.org/dryland-forestry/background/what-are-drylands/es/>

El cambio climático no tiene efecto únicamente sobre el crecimiento de las plantas, sino que la subida de temperatura podrían afectar a otros aspectos como a la fertilidad o a la senescencia de los cultivos (Dempewolf *et al.*, 2014; Lobell *et al.*, 2012). Dada esta tesitura, la adaptación de la agricultura a estas nuevas condiciones ambientales puede ser crucial.

1.2. Mejora de la tolerancia a la sequía y salinidad

Debido a la cada vez más frecuente desertificación y salinización del suelo, es necesario el aumento de la tolerancia de nuestros cultivos. Las estrategias para abordar esto son variadas, y

van desde el uso de la biotecnología más clásica con la transferencia de genes mediante cruces a las modernas técnicas de transgénesis (Cattivelli *et al.*, 2008; Roxas *et al.*, 1997).

Algunas plantas han evolucionado en ambientes más secos y/o salinos de forma que son capaces de crecer en estas condiciones. Dichas adaptaciones vienen dadas por la adecuación de sus mecanismos de respuesta a estrés (Munns y Termaat, 1986; Bartels y Sunkar, 2005).

La mejora para la tolerancia a estreses abióticos no es tan sencilla como para otro tipo de factores (i.e. con control monogénico). Los procesos de tolerancia vienen controlados por numerosos genes conocidos como QTLs o 'quantitative trait loci', responsables de los caracteres cuantificables y que varían de manera continua. Para identificar los QTLs y seleccionar a su favor, se puede recurrir a la selección asistida por marcadores (Collins *et al.*, 2008).

Otra desventaja es que los efectos de los QTLs dependen del fondo genético y del ambiente, y pueden estar ligados a otras características que son indeseables (Podlich *et al.*, 2004). Además, el éxito también viene dado por la capacidad de encontrar una especie donante de genes interesante. Pese a las limitaciones, utilizando estos procesos en proyectos de mejora se han conseguido avances en la tolerancia a la sequía en algunos cultivos (Ashraf, 2010).

Con estos cultivos más tolerantes a los estreses abióticos como la sequía y la salinidad, se podría hacer frente a los retos que nos impone el incipiente cambio climático. A esto se le suma la ventaja de que no competirían con los cultivos habituales, puesto que podrían utilizarse superficies para cultivarlos que se consideren inaprovechables (i.e. terreno afectado por salinidad secundaria).

1.3. La berenjena cultivada (*Solanum melongena*)

La berenjena cultivada (*Solanum melongena*) pertenece al subgénero *Leptostemonum*, conocido por agrupar a especies *Solanum* espinosas (Weese y Bohs, 2007). Se trata de un cultivo muy extendido sobre todo en áreas tropicales y subtropicales. Su consumo es beneficioso por su contenido en fibra, micronutrientes y compuestos bioactivos (Mennella *et al.*, 2012). Concretamente destaca por su alto contenido en compuestos fenólicos, lo que le confiere una interesante capacidad antioxidante (Cao *et al.*, 1996).

La berenjena es uno de los cultivos cuya producción mundial ha incrementado más en la última década, con un aumento del 39% (de $37,6 \cdot 10^6$ t en 2007 a $52,3 \cdot 10^6$ t en 2017). España se encuentra en segunda posición entre los productores europeos, por detrás de Italia (FAO, 2017). Además, está previsto que su demanda continúe aumentado debido a sus compuestos bioactivos (Dranca y Oroian, 2017). Pese a la importancia económica, los intentos de mejora genética de este cultivo son escasos (Hurtado *et al.*, 2012).

La berenjena posee una gran diversidad morfológica. Sin embargo, como ocurre con otras especies domesticadas, su fondo genético es estrecho, en especial los cultivares F₁ actuales (Muñoz-Falcón *et al.* 2009). Esto es debido al cuello de botella que supone el proceso de domesticación, en este caso situado en el sudeste asiático (Meyer *et al.*, 2012).

La berenjena posee algunos rasgos que hacen que no sea un cultivo especialmente sensible al estrés hídrico: su morfología foliar, el buen control de los estomas y su capacidad de mantener la fotosíntesis bajo condiciones de estrés (Fu *et al.*, 2013). No obstante, el déficit hídrico puede provocar graves pérdidas en la producción y afectar a la calidad del fruto (Kirnak *et al.*, 2002 ; Lovelli *et al.*, 2007). Por ello, un aumento de su tolerancia a la sequía puede ser fundamental.

1.4. Las especies silvestres como recursos genéticos

Las especies cultivadas suelen contener solo una parte de la diversidad genética que podemos encontrar en sus parientes silvestres (Guarino y Lobell, 2011). Entre especies silvestres y las especies cultivadas siempre ha habido un flujo de genes en los lugares en los que han coexistido, sin embargo con el desarrollo de la agricultura esa diversidad genética se ha ido perdiendo (Guarino y Lobell, 2011).

Las especies silvestres representan una fuente de variabilidad de la que se pueden obtener características de interés para la mejora genética de un cultivo (Mutegi *et al.*, 2015; Vorontsova *et al.*, 2013). De acuerdo con esto, algunas especies tienen un alto potencial para mejorar y ampliar el fondo genético de la berenjena (Davidar *et al.*, 2015; Plazas *et al.*, 2016).

Pese a las ventajas que ofrece, la hibridación interespecífica como método de mejora en berenjena no es muy habitual. Por el momento no se conocen cultivares comerciales que contengan introgresiones de especies silvestres (Kaushik *et al.*, 2016). Estos recursos sí que han sido aprovechados en el caso de otros cultivos como el tomate o el trigo (Hajjar y Hodgkin, 2007).

Dependiendo de la cruzabilidad y las relaciones filogenéticas con un cultivar, se pueden clasificar las especies respecto a otra en diferentes acervos génicos o “gene pools” (Harlan y de Wet, 1971). El “pool” o acervo génico primario de la berenjena estaría constituido por la especie *Solanum insanum* (Knapp *et al.*, 2013; Davidar *et al.*, 2015), pues la hibridación con la berenjena proporciona híbridos fértiles muy eficientemente. *S. insanum* es la especie silvestre más cercana a la berenjena y numerosos hallazgos apuntan a que es el ancestro de la berenjena cultivada (Weese y Bohs, 2010). Se puede encontrar de forma natural en el sudeste asiático, Madagascar y Mauricio (Knapp *et al.*, 2013 ; Vorontsova *et al.*, 2013). Se ha observado que obtiene un buen comportamiento bajo condiciones de sequía, lo que sugiere que esta especie es interesante para desarrollar nuevas variedades de berenjena o portainjertos con mayor tolerancia a la sequía (Rahma, 2016).

El “pool” secundario está constituido por unas 50 especies procedentes de África y el sureste de Asia (Weese y Bohs, 2010; Syfert *et al.*, 2016) cuyo éxito en la hibridación con la berenjena depende de la especie y la dirección del cruce (Plazas *et al.*, 2016). En nuestro trabajo se van a analizar 3 de ellas: *Solanum incanum*, *Solanum dasyphyllum* y *Solanum linnaeanum*. *S. incanum* es de especial interés en este estudio por crecer en ambientes desérticos, concretamente en el norte de África y Oriente Medio (Meyer *et al.*, 2012). *S. dasyphyllum* es el ancestro silvestre de la berenjena africana Gboma (*S. macrocarpon*) (Plazas *et al.*, 2014a). *S. linnaeanum* probablemente es nativa del sur de África y se expandió a zonas mediterráneas (Knapp *et al.*, 2013). Esta especie también es una buena candidata para generar líneas valiosas de introgresión en berenjena. Weese y Bohs (2010) reportaron la tolerancia a la salinidad de esta planta.

Y finalmente, el “pool” terciario está compuesto por especies con las que se podrían obtener híbridos estériles o con baja fertilidad al aplicar métodos como el rescate embrionario o la hibridación somática (Harlan y de Wet, 1971). *S. elaeagnifolium* es una especie a destacar en este pool debido a su alta tolerancia al estrés hídrico (Christodoulakis *et al.*, 2009). No obstante, hay otras que destacan por su resistencia a factores bióticos, por ejemplo, a enfermedades bacterianas y fúngicas en el caso de *S. torvum* (Gousset *et al.*, 2005).

En todo caso, la obtención de cultivares tolerantes a la sequía depende de: i) la identificación de germoplasma de interés y ii) la introgresión de los genes relevantes a la berenjena. Los dos pasos requieren métodos relativamente rápidos y baratos, pero efectivos (Cattivelli *et al.*, 2008; Fita

et al., 2015). Con el desarrollo de nuevas generaciones de cultivares con genes introgresados que aporten tolerancia, se podría obtener en última instancia un mayor rendimiento ante los efectos del cambio climático.

1.5. La respuesta al estrés abiótico en plantas

Independientemente de su capacidad de tolerancia a los estreses abióticos, todas las plantas poseen mecanismos para responder a sus efectos. De hecho, que una planta no sea sensible no viene dado por unos mecanismos diferentes a los habituales, sino que es más una cuestión de eficiencia en su activación o desarrollo (Wang *et al.*, 2003).

Una planta que está sometida a estos estreses tiene que redirigir el consumo de sus recursos (energía y precursores metabólicos) a la activación de los mecanismos de defensa. A consecuencia de esto, el crecimiento se puede ver reducido drásticamente (Munns y Termaat, 1986).

1.5.1. Los flavonoides y otros compuestos fenólicos como antioxidantes

Las condiciones ambientales adversas suelen causar estrés oxidativo en las plantas, tanto como efecto directo o secundario. Es por ello por lo que la planta activa sus sistemas antioxidantes, que pueden ser enzimáticos y no enzimáticos (Mittler, 2002).

Los compuestos fenólicos son responsables de funciones muy diversas dentro de la planta, como pueden ser funciones estructurales (lignina) u hormonales (Gould y Lister, 2005; Boerjan *et al.*, 2003; Ylstra *et al.*, 1992). Muchos compuestos fenólicos como los flavonoides pueden neutralizar el efecto de las especies reactivas del oxígeno (en inglés, '*reactive oxygen species*' o 'ROS'). Los "ROS" son compuestos químicos formados por radicales libres como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxilo (OH^{\cdot}) y perhidroxilo (O_2H^{\cdot}) y otras moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el ozono (O_3) (Apel y Hirt, 2004; Takahashi y Asada, 1988). Actúan en procesos metabólicos como moléculas señalizadoras estando presentes a baja concentración. Sin embargo, bajo condiciones de estrés su concentración en la célula aumenta, lo que conlleva efectos nocivos para la célula. Los ROS afectan a la estabilidad y la permeabilidad de las membranas de las células provocando el fenómeno de peroxidación lipídica (de la cual hablaremos en el siguiente apartado). También oxidan los residuos de los aminoácidos, lo que puede afectar a la actividad de las proteínas y pueden producir mutaciones en el ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas causando daño celular (Halliwell, 2006).

Hay evidencia de que los flavonoides están involucrados en muchas respuestas de tolerancia a estreses abióticos además de sequía y salinidad como la radiación UV, temperaturas extremas, la exposición a ozono y a metales pesados (Winkel-Shirley, 2002 ; Treutter, 2005; Pollastri y Tattini, 2011). Es la presencia de múltiples grupos hidroxilo en su estructura lo que les da a los flavonoides y otros compuestos fenólicos esa capacidad reductora.

Los flavonoides parecen actuar cuando la actuación de la primera línea de defensa; las enzimas antioxidantes, no es suficiente. De esta forma, su biosíntesis se dispara especialmente cuando la condición de estrés es de gravedad (Fini *et al.*, 2011; Bautista *et al.*, 2016)

1.5.2. Peroxidación de lípidos de membrana

El malondialdehído, también conocido por sus siglas "MDA", es un biomarcador fiable del estrés oxidativo (Del Rio *et al.*, 2005). El MDA es un aldehído reactivo producto de la peroxidación de lípidos de membrana.

El MDA se forma a partir de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las células, proceso conocido como peroxidación lipídica. Esta oxidación es debida a los radicales libres formados por el estrés oxidativo. El resultado de este fenómeno es la pérdida de la fluidez de la membrana, alteración del potencial de membrana, aumento de la permeabilidad a H⁺ y otros iones y, finalmente, rotura celular (Gutteridge, 1995). De esta forma, la cuantificación del malondialdehído se puede utilizar para estimar el daño realizado a la célula (Heath y Packer, 1968).

1.5.3. Acumulación de prolina

Se considera que este aminoácido está involucrado en el ajuste osmótico, la neutralización de ROS y la protección de la estabilidad de la membrana (Heuer, 2010). También se ha visto que puede actuar como chaperona de bajo peso molecular estabilizando la estructura de las proteínas y participar en la transducción de señales en las rutas de respuestas a estrés (Hayat *et al.*, 2012).

La prolina se acumula como mecanismo de respuesta a la sequía y a la salinidad normalmente en el citosol, donde contribuye al ajuste osmótico (Leigh *et al.*, 1981; Ketchum *et al.*, 1991).

La acumulación de este osmolito en plantas sometidas a estrés hídrico y salino es un fenómeno visto ampliamente. No obstante, no es extrapolable a todos los casos; es decir, podría ser una respuesta específica de especie (Ashraf y Foolad, 2007). En la mayoría de estudios la acumulación de prolina se ha correlacionado de forma positiva con su tolerancia a la sequía (Jiménez *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2006). Sin embargo, en otros estudios no se ha podido correlacionar (Bhaskaran *et al.*, 1985) o incluso, se observó el aumento de prolina en las plantas susceptibles (Silvente *et al.*, 2012).

1.5.4. Otros mecanismos que actúan ante el estrés abiótico

Aunque el objeto de nuestro estudio sea evaluar esos mecanismos, en las plantas sometidas a estreses abióticos se observan otros procesos.

En la mayoría de los casos se inhibe la fotosíntesis por degradación de los pigmentos fotosintéticos y otras reacciones que liberan energía, y por tanto, disminuye el crecimiento de la planta (Zhu, 2016). Entre las respuestas también podemos encontrar la activación de la expresión de genes que codifican proteínas como las de choque térmico, proteínas LEA (*late embryogenesis-abundant*) y osmotina (Apel y Hirt, 2004)

Aparte de prolina, se acumulan otros compuestos de bajo peso molecular que usualmente no son tóxicos a altas concentraciones. Colaboran en la protección de la planta frente al estrés al contribuir al ajuste osmótico. Entre ellos podemos encontrar osmolitos como la sacarosa, la trehalosa y glicina betaína (Hayat *et al.*, 2012).

Como hemos dicho anteriormente, la planta posee sistemas antioxidantes de naturaleza enzimática. Bajo condiciones de estrés oxidativo se activan enzimas con función antioxidante como la superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, peroxidasa y glutatión reductasa (Alscher *et al.*, 2002; Saed-Moucheshi *et al.*, 2014). Y otros compuestos también actúan como antioxidantes además de los compuestos fenólicos: vitamina C y E, carotenoides y glutatión, manteniendo el equilibrio redox de la célula (Miller *et al.*, 2008).

Así pues, nuestra hipótesis es que la sequía en *S. melongena* y las especies silvestres relacionadas tendrá efectos como la biosíntesis de osmolitos y la activación de mecanismos antioxidantes.

Para comprobarla, se eliminó totalmente el riego de las plantas y se analizaron tanto en las plantas control como en las plantas sometidas a sequía, diferentes parámetros: (a) parámetros de crecimiento; (b) estimación del nivel de estrés oxidativo por cuantificación de malondialdehído; (c) contenido en prolina, (d) contenido en compuestos fenólicos totales y (e) contenido en flavonoides. Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permitirán observar parte de la variedad de mecanismos empleados por las especies para tolerar el déficit hídrico. Además, los resultados pueden ser de utilidad para diseñar futuros programas de mejora genética de la berenjena.

2. Objetivos

- Evaluar la tolerancia relativa a la sequía de la berenjena cultivada (*S. melongena*), sus parientes silvestres (*S. insanum*, *S. incanum*, *S. dasyphyllum* y *S. linnaeanum*) y de los híbridos de *S. melongena* con *S. insanum* y *S. incanum*.
- Analizar algunas de las respuestas bioquímicas a la sequía de estas especies e híbridos.
- Identificar biomarcadores que se asocien al estrés hídrico para usarlos posteriormente en una rápida evaluación de la tolerancia a la sequía.
- Evaluar la aptitud de las especies silvestres para la mejora de la tolerancia a la sequía de la berenjena cultivada.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

El material vegetal empleado incluye en total 9 genotipos de especies *Solanum*: una accesión de berenjena cultivada, 5 accesiones de un total de 4 especies silvestres y 3 híbridos interespecíficos entre la accesión de berenjena con 2 especies silvestres (Tabla 1). Las semillas utilizadas están depositadas en el banco de germoplasma localizado en el Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV).

Tabla 1. Información sobre las especies del género *Solanum* utilizadas.

Especie	Accesión	Código de la accesión en el banco de germoplasma	País de origen	Acervo génico	Híbridos interespecíficos con MEL1
<i>S. melongena</i>	MEL1	BBS-118/B	Costa de marfil		
<i>S. insanum</i>	INS1	SLKINS-1	Sri Lanka	Primario	MEL1 x INS1
<i>S. insanum</i>	INS2	SLKINS-2	Sri Lanka	Primario	MEL1 x INS2
<i>S. incanum</i>	INC1	MM664	Israel	Secundario	INC1 x MEL1
<i>S. linnaeanum</i>	LIN1	JPT0028	España	Secundario	-
<i>S. dasyphyllum</i>	DAS1	MM1153	Uganda	Secundario	-

La accesión de berenjena cultivada (MEL1) es originaria de Costa de Marfil. En comparación con otras accesiones de *S. melongena* del banco de germoplasma, se ha visto que MEL1 es capaz producir muchas flores, lo que resulta de interés para obtener híbridos interespecíficos y frutos. Esto también sugiere que podría ser un buen parental recurrente para obtener líneas de introgresión (Plazas *et al.*, 2016). En estudios posteriores se observó que los cruces de especies silvestres con esta variedad eran en su mayoría exitosos en comparación con otras variedades (Kouassi *et al.*, 2016).

Las accesiones de especies silvestres son un conjunto perteneciente al acervo genético primario y secundario de la berenjena. En concreto, dos de estas accesiones corresponden a *S. insanum* (*pool* primario) y proceden de Sri Lanka (INS1 e INS2). Las especies del *pool* secundario son *S. incanum* de Israel (INC1), *S. linnaeanum* de España (LIN1) y *S. dasyphyllum* de Uganda (DAS1).

Los 3 híbridos interespecíficos se obtuvieron en trabajos anteriores realizando cruces recíprocos entre la berenjena cultivada y las especies silvestres utilizando la emasculación (Plazas *et al.*, 2016). Estos híbridos son: MEL1 x INS1 (cruce de *S. melongena* con un genotipo de *S. insanum*), MEL1 x INS2 (cruce de *S. melongena* con otro genotipo de *S. insanum*) e INC1 x MEL1 (cruce de un genotipo de *S. incanum* con *S. melongena*). La nomenclatura del híbrido viene dada por el genotipo de la madre en primer lugar y el genotipo del padre en segundo lugar.

Para la germinación de todas las semillas se utilizó el protocolo optimizado por Ranil *et al.* (2015). En primer lugar, se dejaron en remojo durante 24 h en agua y seguidamente otras 24 h en remojo en una solución de AG₃ a 500 ppm. Luego se trasladaron a placas Petri y se usó como humectante una solución de KNO₃ a 1000 ppm. Entonces se realizó un choque térmico durante 24 h a 37°C. La germinación tuvo lugar en una cámara de cultivo en condiciones controladas de 16 h luz / 8 h oscuridad a una temperatura de 25°C.

Una vez germinadas, se sembraron en semilleros y se mantuvieron en las mismas condiciones en el cuarto de crecimiento durante aproximadamente dos semanas. Posteriormente, se seleccionaron las plántulas con un tamaño homogéneo para trasplantarlas a macetas. Cuando estuvieron lo suficientemente crecidas, se trasladaron a macetas de 1,3 litros con 500 g de sustrato comercial Huminsubstrate N3 (Klasmann-Deilmann, Alemania).

El ensayo tuvo lugar en un invernadero libre de polinizadores en Valencia (39°29'00.4"N 0°20'27.1"W). Allí, las plantas se aclimataron durante 20 días en el invernadero, antes de empezar con los tratamientos del ensayo. El ensayo se inició cuando las plantas tuvieron 6-8 hojas expandidas (Figura 2). Se utilizaron tratamientos fitosanitarios contra arañas cuando fue necesario.

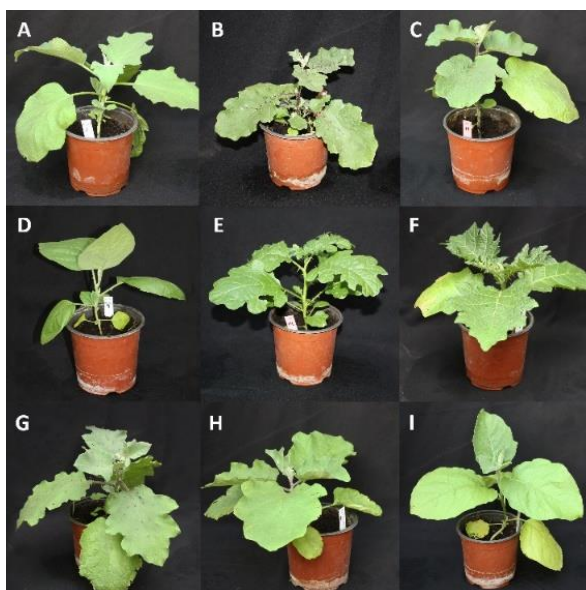


Figura 2. Fotografías de los genotipos utilizados realizadas en el primer día del tratamiento. A, MEL1; B, INS1; C, INS2; D, INC1; E, LIN1; F, DAS1; G, MEL1 x INS1; H, MEL1 x INS2; I, INC1 x MEL1.

3.2. Diseño experimental y condiciones de crecimiento

Antes de iniciar los tratamientos se descartaron las plantas que presentaban un crecimiento mayor o menor que la mayoría seleccionando para el experimento las que tenían un aspecto homogéneo. La asignación de las plantas a cada tratamiento se realizó de forma aleatoria. Para cada tratamiento y por cada accesión se realizaron 5 réplicas biológicas.

El día que se inició el tratamiento se analizó un subconjunto de plantas para conocer el estado de crecimiento y fisiológico al inicio del experimento, a partir de aquí se les denominará plantas a tiempo 0 o t_0 , los parámetros medidos se explican posteriormente. El tratamiento de sequía consistió en la eliminación de la irrigación por completo durante los 18 días. Mientras duró el tratamiento de sequía, las plantas control se irrigaron mediante el suministro de 4 riegos de 250 ml en intervalos de aproximadamente 4 días. Periódicamente se rotaban las bandejas en las que estaban situadas las macetas para que todas las plantas recibieran la misma cantidad de luz solar.

Durante el experimento, se hizo un seguimiento de forma periódica de contenido en agua del sustrato utilizando la sonda WET-2 (Delta-T Devices, Reino Unido). Este medidor permite una determinación directa e *in situ* de la humedad de forma no destructiva. Cada valor considerado es la media de tres mediciones realizadas en diferentes posiciones en la maceta.

3.3. Medición de parámetros de crecimiento

La inhibición del crecimiento causada por el estrés fue estimada a través de la medición de varios parámetros.

Durante la duración del ensayo se hizo un seguimiento del desarrollo de la planta midiendo diversos parámetros morfológicos. Se tomaron medidas de altura del tallo (Al_{ta}). También del número de hojas (N_{ho}), considerando solo aquellas que tuvieran más de 1 cm de longitud. También se midió el diámetro del tallo (\emptyset) con un pie de rey.

Los días del muestreo se realizaron, además, otras mediciones. Con la ayuda de las tijeras se separó cada parte de la planta: consiguiendo así material de raíz, tallo y hojas. La raíz de cada planta se limpió cuidadosamente utilizando un pincel para eliminar el sustrato. Se determinó entonces, el peso fresco de la parte aérea de la planta (tallo y hojas) y de la raíz utilizando una balanza de precisión, registrados como PF_{pa} y PF_r respectivamente. Se pudo determinar también la longitud máxima de la raíz (L_r) utilizando una regla. Además, se determinó el área de la hoja más grande de cada planta (AF) en cm^2 utilizando el programa ImageJ desarrollado por el National Institutes of Health.

Una vez medido el peso fresco de las partes de la planta, se sometió a un proceso de secado a $65^\circ C$ durante 4-5 días, hasta que se alcanzó un peso constante, y se volvió a medir el peso. La humedad o contenido en agua de cada parte de la planta (H) se determinó utilizando la siguiente ecuación donde PF es el peso fresco y PS el peso seco.

$$H\% = [(PF - PS) / PF] \times 100$$

Con los valores de peso seco se pudo calcular también la eficiencia en el uso del agua. Ésta se calculó como el incremento de biomasa seca generado durante el tratamiento por los litros de agua aportados. Este cálculo fue realizado tanto para las plantas sometidas a sequía como para las plantas control restando la biomasa seca de las plantas tiempo 0.

Con el fin de evaluar si los híbridos eran heteróticos o no, se hizo uso del cálculo del parental medio o media de los parentales. Dividiendo el valor obtenido por el híbrido en cada parámetro por el valor del parental medio se obtuvo un ratio cuyo valor puede ser utilizado para comprobar la existencia de heterosis.

Para realizar los ensayos bioquímicos se utilizó tanto material fresco como material seco proveniente de las hojas. El material fresco correspondía a una mezcla de porciones de las hojas que se ultracongelaron utilizando N₂ líquido y se almacenaron en un congelador a -75°C. El material seco también procedía de hoja y se almacenó a temperatura ambiente en tubos bien cerrados.

3.4. Determinación del contenido de malondialdehído

El contenido de malondialdehído (MDA) en los extractos se determinó usando el método descrito previamente por Hodges *et al.* (1999). Se determinó utilizando un extracto metanólico empleando una cantidad aproximada de 0,15 g de material fresco y 2 ml de metanol al 80%. El proceso de extracción se realizó en un agitador rotativo durante 48 h, se centrifugó y se recogió el sobrenadante.

De cada muestra se añadió 400 µl del extracto diluido con 200 µl de metanol al 80%. Este volumen hizo reaccionar con 600 µl de una mezcla de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% (p/v) con ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v) incubando a 95°C durante 20 minutos. Entonces las muestras se enfriaron y centrifugaron. La absorbancia se midió entonces utilizando un espectrofotómetro a dos longitudes de onda; 532 nm y 600 nm. La concentración de MDA se pudo determinar mediante la siguiente relación:

$$\text{Concentración de MDA (mM)} = (A_{532} - A_{600}) / \epsilon$$

Donde A es el valor de absorbancia a 532 nm y 600 nm y ϵ es corresponde al valor del coeficiente de extinción molar del aducto MDA-TBA y es 155 mM⁻¹ cm⁻¹. La reacción de formación del aducto MDA-TBA se muestra en la Figura 3. La condensación de estas moléculas da lugar a un cromóforo.

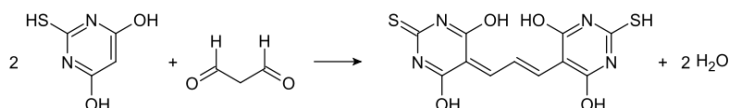


Figura 3. Formación del aducto MDA-TBA.

La concentración de MDA se expresó en nanomoles por gramo de material fresco (nmol g⁻¹ PF).

3.5. Determinación del contenido de prolina

El contenido de prolina se determinó utilizando material seco de hojas siguiendo el método dado por Bates *et al.* (1973).

El extracto se preparó utilizando una cantidad de 0,05-0,1 g de material de hoja triturado y 2 ml de ácido sulfosalicílico al 3% (p/v). La muestra se hizo reaccionar con una mezcla de ninhidrina, ácido ortofosfórico y ácido acético glacial que se agitó hasta la completa disolución. Se conservó la relación de 1,25 g de ninhidrina, 30 ml de ácido acético glacial y 20 ml de ácido ortofosfórico de concentración 6M. Concretamente, en cada muestra se hizo reaccionar 0,1 ml del extracto previamente centrifugado diluyendo con 0,4 ml de sulfosalicílico. A este tubo se le añadió 0,5 ml de la mezcla de ácido con ninhidrina y 0,5 ml de ácido acético glacial. Cada tubo se incubó a

95°C durante 1h y luego se hizo parar la reacción enfriando en hielo durante 10 min. Posteriormente se añadió tolueno para extraer la prolina. Al añadir tolueno y mezclar en agitador tipo vórtex se forman dos fases, donde la prolina y el tolueno se encuentran en la fase orgánica.

La concentración de prolina se determinó a partir del valor de la densidad óptica a 520 nm utilizando como blanco tolueno y como referencia una curva patrón procesada como el resto de los tubos del ensayo, pero utilizando prolina en una concentración conocida. Dicha longitud de onda nos permite detectar la prolina que ha reaccionado con la ninhidrina. La cantidad de prolina se expresó en micromoles por gramo de material seco ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS).

3.6. Determinación de compuestos fenólicos totales

Se determinaron a partir del mismo extracto usado en el ensayo de cuantificación de MDA. Se utilizó la reacción basada en el reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) según lo indicado por (Plazas *et al.*, 2014b).

Se hizo reaccionar 65 μl del extracto con 500 μl de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1/10. Se incubó durante 5 minutos en oscuridad y entonces se añadieron 500 μl con una solución de carbonato sódico al 6% (p/v). Después de una incubación de 90 min en oscuridad, de cada muestra se midieron 200 μl en un lector de microplacas. La absorbancia fue medida a 750 nm.

El resultado se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de material seco (mg eq. GA g^{-1} PS) utilizando una curva patrón de ácido gálico.

3.7. Determinación de flavonoides

El contenido de flavonoides (FT) se determinó utilizando el mismo extracto que en el caso del MDA. Se cuantificaron mediante el método previamente descrito por Zhishen *et al.* (1999) usando catequina como estándar.

Se hizo reaccionar 30 μl de extracto con 30 μl de NaNO_2 al 5% (p/v), añadiendo también 470 μl de agua Milli-Q y mezclando con un agitador tipo vórtex. Pasados 5 minutos de reacción, se añadieron 30 μl AlCl_3 al 10% (p/v) y se volvió a mezclar. Pasados 6 minutos de reacción, se añadieron 200 μl de NaOH 1 M y 240 μl de agua Milli-Q. La absorbancia fue medida frente al blanco (metanol al 80%) a 510 nm.

La cantidad flavonoides totales se determinó interpolando el valor de absorbancia obtenido a 510 nm en la recta patrón realizada con catequina de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en H_2O . De esta forma, los resultados de este ensayo vienen dados en miligramos equivalentes de catequina por gramo de material fresco (mg eq. CA g^{-1} PF).

Sin embargo, estrictamente hablando, mediante este método no se detectan únicamente los flavonoides presentes. La reacción está basada en la nitración de los anillos aromáticos que contienen un grupo catecol. Así pues, se detectan diversos compuestos químicos: varios subgrupos de flavonoides como los flavonoles y los flavanoles, pero también algunos monofenoles como el ácido cafeico y derivados (Pękal y Pyszynska, 2014). Pese a ello, todos los compuestos fenólicos detectados mediante esta reacción son fuertemente antioxidantes, por lo que son de interés en este estudio al poder correlacionar su cantidad con la actividad antioxidante de las muestras. Para simplificar la nomenclatura durante este trabajo, se utilizará flavonoides totales o FT para hablar de todos aquellos metabolitos que reaccionen con AlCl_3 .

3.8. Análisis estadístico

3.8.1. Análisis de la varianza (ANOVA)

El análisis estadístico de los datos experimentales fue realizado mediante el programa Statgraphics Centurion XVII (*Statpoint Technologies, Inc.; Warrenton, EE. UU.*).

Los datos fueron primeramente procesados mediante un ANOVA multifactorial, donde los parámetros genotipo y tratamiento se trataron como efectos fijados. Se recogió el cuadrado medio del efecto del genotipo, tratamiento, la interacción entre el genotipo y el tratamiento y de los efectos residuales. La significación estadística se evaluó mediante el valor-P de la prueba F.

Las diferencias estadísticas entre las accesiones sometidas al mismo tratamiento fueron analizadas mediante el ANOVA Simple utilizando la Prueba de Múltiples Rangos. Para discriminar entre las medias y evaluar qué medias son estadísticamente diferentes entre ellas se utilizó el procedimiento de Student-Newman-Keuls. También se analizó la significación estadística de las diferencias entre los dos tratamientos dentro de cada especie mediante el valor-P de la prueba-F del ANOVA.

Para cada parámetro medido se obtuvieron las medias a partir de las réplicas. El error estándar de la media fue calculado y todas las gráficas de barras del trabajo lo contienen.

3.8.2. Correlación múltiple de Pearson

Los datos escalados mediante una transformación logarítmica se sometieron a un análisis multivariado de correlaciones utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII. Los coeficientes de correlación entre cada par de variables se recogieron en una tabla, considerando también el resultado del valor-P.

3.8.3. Análisis de componentes principales (ACP)

Las medias de los parámetros más informativos se escalaron mediante una transformación logarítmica y se sometieron a un Análisis de Componentes Principales o ACP (ampliamente conocido sus siglas en inglés; PCA). Se utilizó el software libre PAST3.25. Se obtuvo una interpretación como un gráfico en 2D utilizando las dos componentes principales que explicaban el mayor porcentaje de la variación observada.

4. Resultados

4.1. Evolución del crecimiento de las plantas y verificación de la efectividad del tratamiento.

4.1.1. Progresión de la humedad del sustrato durante el tratamiento

Al inicio de los tratamientos (t_0) las plantas en promedio tenían una altura media de 13,9 cm, un diámetro de tallo de 0,49 cm y 6-8 hojas expandidas. En los 18 días que duró el tratamiento, las plantas control fueron regadas regularmente haciendo que la humedad se mantuviera en un rango de aproximadamente 60-80% (Figura 4). Utilizando la sonda se realizaron mediciones de humedad antes del riego y tras riego (TR). En el tratamiento de sequía las plantas no recibieron riego, por lo tanto, la humedad disminuyó de forma progresiva hasta el 6%. La evolución de la humedad de cada accesión sometida a tratamiento de sequía desde el tiempo inicial se puede consultar en la Figura 1 del Anexo.

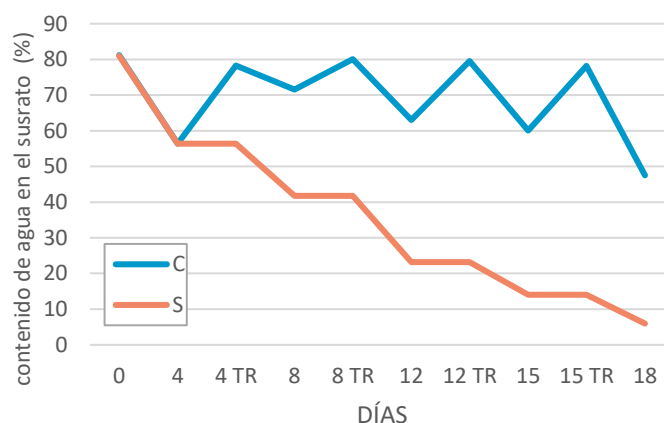


Figura 4. Evolución de la humedad relativa promedio del sustrato en los tratamientos de control y sequía. La humedad del sustrato de cada planta se analizó utilizando la sonda WET-2 (Delta-T Devices, Reino Unido). Cada valor graficado es la media de las 5 réplicas biológicas en cada una de las cuales se hicieron hasta 3 medidas para obtener un resultado más exacto. Los días en los que se regaron las plantas control la humedad se tomó antes y tras el riego (TR)

4.1.2. Crecimiento de las plantas control durante el tratamiento

Para verificar que las plantas control del experimento crecieron correctamente durante la duración del ensayo, se realizó un análisis de la varianza comparando los valores de los parámetros de crecimiento entre t_0 (inicio del tratamiento) y t_1 (final del tratamiento). Se observó que hubo diferencias para todos los parámetros excepto en el diámetro del tallo y el área foliar (Tabla 2). El aumento de parámetros como peso fresco total (PF_T), peso seco total (PS_T), altura (AI) y número de hojas (N_{ho}) indicaron que las plantas crecieron correctamente. Las plantas control en promedio crecieron un 32,8% en peso fresco con respecto al t_0 . Las medias de los parámetros que aparecen en el ANOVA y la de otros parámetros junto a su error estándar se pueden encontrar en la Tabla 1 del Anexo.

Tabla 2. Análisis de la varianza para parámetros de crecimiento y humedad de la planta entre t_0 (día de inicio de los tratamientos) y t_1 (día final de tratamiento), correspondiente a las plantas no sometidas a estrés (control). Las columnas muestran el resultado del análisis para el peso fresco de toda la planta (PF_T), el peso seco total (PS_T), la altura de la planta (AI), el diámetro del tallo (\emptyset), el número de hojas (N_{ho}), el área foliar (AF), la longitud máxima de la raíz (L_r) y la humedad de la planta (H_p).

CM ¹									
Efectos	gl ²	PF _T	PS _T	AI	\emptyset	N _{ho}	AF	L _r	H _p
PRINCIPALES									
A: Genotipo	8	379 ***	10 ***	41 ***	0,03 ***	11 ***	6913 ***	310 ***	42 ***
B: Tiempo	1	1133 ***	111 ***	74 ***	0,02 NS	44 ***	2302 NS	138 *	406 ***
INTERACCIONES									
AB	8	14 NS	1 NS	7 NS	0,005 NS	5 *	836 NS	14 NS	9 **
RESIDUOS	69	29	1	5	0,004	3	1045	22	3

¹cuadrado medio, ²grados de libertad, NS, *, ** y *** indican no significativo para un valor-P > 0.05 y significativo para p < 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

4.2. La respuesta al tratamiento de sequía

4.2.1. Comparación de la respuesta a la sequía de *S. melongena* y su pool genético

4.2.1.1. Parámetros morfométricos y de humedad

A efectos expositivos y de claridad los resultados se han agrupado en dos secciones. En primer lugar, se analizará la respuesta de las 5 accesiones de las especies silvestres y de *S. melongena*, y posteriormente, se evaluará la respuesta de los híbridos interespecíficos respecto a sus parentales.

El tratamiento de sequía indujo cambios significativos en los parámetros morfométricos y de humedad evaluados (Tabla 3). El efecto de la sequía fue muy importante para el peso fresco (PF_T), la altura de la planta (AI), el diámetro del tallo, el número de hojas (N_{ho}), el área foliar (AF), la humedad de la parte aérea (H_{pa}) y la humedad de la raíz (H_r). Curiosamente, tuvo poco efecto sobre el peso seco de la planta y ninguno sobre la longitud de la raíz. En los 6 genotipos evaluados se observó una reducción media del 47% del peso fresco respecto al control, una reducción media del 15% de la biomasa seca, una reducción media del 14% de la altura de la planta y una del 43% en el área foliar. El ANOVA multifactorial también reveló las diferencias entre los genotipos para dichos parámetros y la ausencia de interacción entre el genotipo y el tratamiento, excepto para los parámetros de humedad donde existió interacción. Todo esto indica que tras los 18 días sin riego las plantas del tratamiento de sequía se veían afectadas por dicho tratamiento.

Tabla 3. Análisis de la varianza para parámetros de crecimiento y humedad de la planta entre las plantas control (no sometidas a estrés) y las plantas sometidas al tratamiento de sequía. Las columnas muestran el resultado del análisis para el peso fresco de toda la planta (PF_T), el peso seco total (PS_T), la altura de la planta (AI), el diámetro del tallo (\emptyset), el número de hojas (N_{ho}), el área foliar (AF), la longitud máxima de la raíz (L_r), la humedad de la parte aérea (H_{pa}) y la humedad de la raíz (H_r).

CM ¹										
Efectos	gl ²	PF_T	PS_T	AI	\emptyset	N_{ho}	AF	L_r	H_{pa}	H_r
PRINCIPALES										
A: Genotipo	5	216***	14***	53***	0,01**	18***	3653***	437***	15 ^{NS}	66**
B: Tratamiento	1	2971***	9*	79***	0,03**	45***	48735***	0,8 ^{NS}	2124***	2917***
INTERACCIONES										
AB	5	36 ^{NS}	0,4 ^{NS}	3 ^{NS}	0,004 ^{NS}	1 ^{NS}	834 ^{NS}	15 ^{NS}	47*	163***
RESIDUOS	46	26	1	4	0,002	2	546	29	12	14

¹cuadrado medio, ²grados de libertad, ^{NS}, *, ** y *** indican no significativo para un valor- $P > 0.05$ y significativo para $p < 0.05$, 0.01 y 0.001, respectivamente.

El déficit hídrico causó un descenso del contenido de agua significativo en todas las poblaciones, aunque la reducción no fue uniforme (Figura 5). Es destacable que las accesiones INS1 y DAS1 obtuvieron una menor reducción del contenido de agua que el resto, tanto en parte aérea como en la raíz. Las diferencias entre tratamientos dentro de cada genotipo son significativas en su mayoría. Una excepción es INS1, donde no se observan diferencias significativas en la humedad de la raíz. También se puede observar cómo la humedad de la parte aérea en todas las plantas sometidas a sequía tenía un valor similar.

Si se evalúa la humedad de la planta en su totalidad (parte aérea y raíz), se observa que INS1 obtuvo una reducción del contenido de agua del 5,6% y DAS1 una reducción del 14,5% (Anexo Tabla 2). Por tanto, INS1 pareció ser la más resistente a la deshidratación, seguida de DAS1. Las

mayores diferencias se observaron en LIN1 con un 23,4%, mostrando una sensibilidad relativa a la deshidratación.

La repercusión del tratamiento sobre el crecimiento se puede estimar mediante la diferencia de los pesos secos de las diferentes partes de la planta, pues informa sobre la generación de biomasa. En el caso del peso seco de las hojas, se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y sometidas a estrés hídrico exceptuando en INS1 y DAS1, cuyos valores de peso seco se mantuvieron similares pese al efecto de la sequía. La diferencia mayor se observó en INC1, en la que el peso se redujo un 39,8%. Al contrario, las diferencias observadas en el peso seco de la raíz no fueron estadísticamente significativas, pero se puede apreciar que DAS1 presentaba un sistema radicular más desarrollado que el resto de los genotipos tanto en sequía como en las condiciones control.

Se evaluaron también los cambios en el área foliar. En todos los genotipos se manifestó un descenso del área de las hojas significativo. En cuanto a la altura del tallo, la duración del tratamiento no permitió observar cambios significativos, a excepción de en INC1. Otros parámetros como el diámetro del tallo o la longitud de la raíz no diferían significativamente en el tratamiento de sequía. Además de estos, otros parámetros fueron medidos (i.e. número de hojas) y se pueden consultar en la Tabla 2 del Anexo, donde también se recoge el resultado del análisis estadístico dentro de cada genotipo y entre genotipos sometidos al mismo tratamiento.

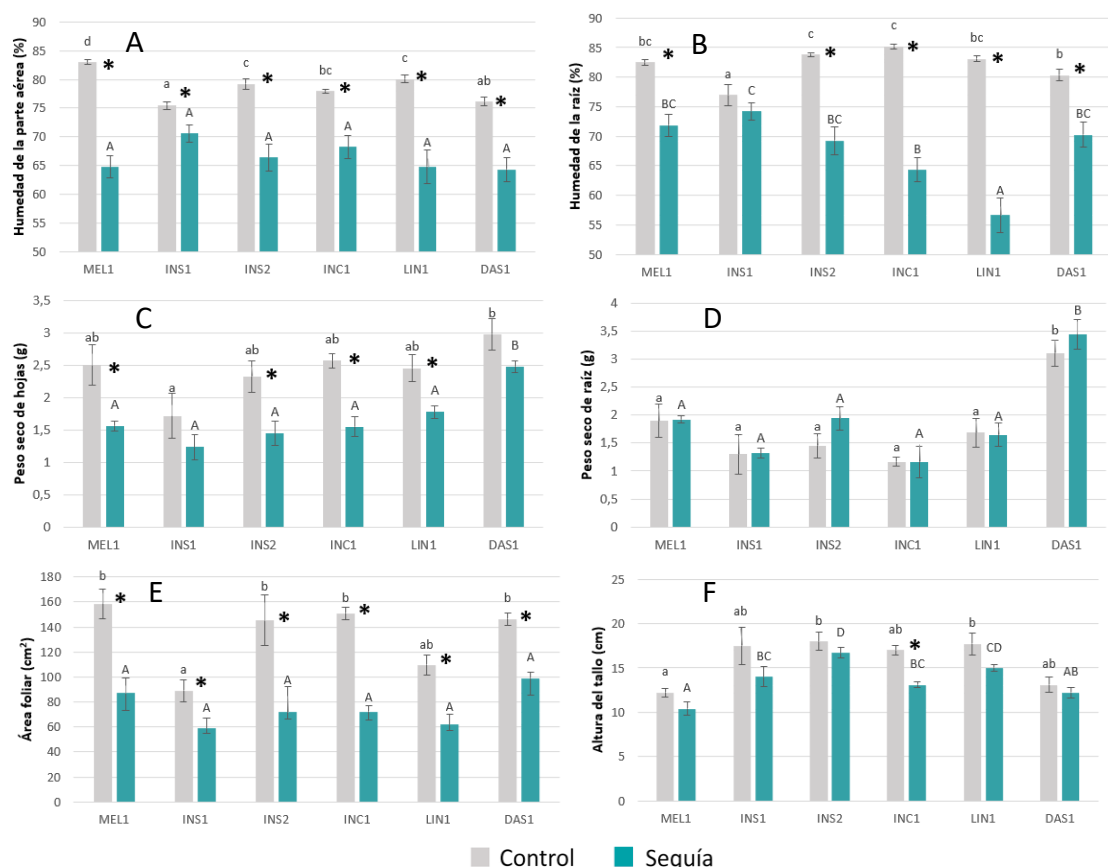


Figura 5. Variaciones en la humedad de la parte aérea (A), humedad de la raíz (B), peso seco de las hojas (C), peso seco de la raíz (D), área foliar (E) y altura del tallo (F), entre el control y el tratamiento de sequía después de 18 días de tratamiento. La denominación de las accesiones se define en la Tabla 1. Las barras representan las medias (n=5) con los errores estándar. Las diferentes letras (minúsculas para las plantas control y mayúsculas para las plantas sometidas a estrés hídrico) indican diferencias significativas entre los genotipos, de acuerdo con el test de múltiples rangos con el método Student-Newman-Keuls a un p-valor < 0,05. El asterisco indica diferencias significativas entre el tratamiento control y el de sequía de acuerdo al valor-P de la prueba-F del ANOVA.

4.2.1.2. Parámetros bioquímicos

El análisis de todos los parámetros bioquímicos mediante el ANOVA multifactorial (Tabla 4) mostró la existencia de diferencias altamente significativas tanto por el efecto del genotipo como por el tratamiento, además existió interacción genotipo por tiempo para los parámetros MDA y FT. Todas las especies evaluadas mostraron un aumento de los compuestos bioquímicos analizados en condiciones de sequía con respecto al control, aunque con diferencias cuantitativas. Debido al severo tratamiento de sequía, en promedio el contenido de MDA aumentó 1,6 veces respecto al control. Además, se detectó un aumento medio de prolina en el tratamiento de sequía de 6,2 veces. Los compuestos fenólicos también aumentaron 1,3 veces, y en concreto, en el análisis de los flavonoides se observó un contenido 1,6 veces más alto que en el control.

Tabla 4. Análisis de la varianza de los ensayos bioquímicos. Las columnas muestran el resultado del análisis para contenido de MDA, prolina (PRO), compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides (FT).

CM ¹					
Efectos	gl ²	MDA	PRO	CFT	FT
PRINCIPALES					
A: Genotipo	5	7199***	7286*	435***	45,11***
B: Tratamiento	1	13001***	261924***	231***	92***
INTERACCIONES					
AB	5	611*	3067 ^{NS}	10 ^{NS}	4*
RESIDUOS	42	229	2553	5	2

¹cuadrado medio, ²grados de libertad, ^{NS}, *, ** y *** indican no significativo para un valor-P > 0.05 y significativo para p < 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

En concreto, el contenido de MDA varió significativamente solo en la mitad de los genotipos evaluados (Figura 6). La especie en la que se observa el mayor contenido de MDA es INS2, con un valor de 134,6 nmol g⁻¹ de peso fresco, mostrando así un mayor nivel de estrés oxidativo. Sin embargo, el mayor aumento respecto al control se observa en la especie LIN1 con un 94,23% de aumento. El análisis también ha mostrado que en las accesiones MEL1, INS1 y DAS1 no hay diferencias significativas entre tratamientos. Cabe destacar que, en condiciones control, en MEL1 e INS2 se aprecia un contenido relativamente alto de MDA.

El contenido en el osmolito prolina (PRO) en las plantas control varió entre especies en un rango de 10-38 μmol g⁻¹ PS (Figura 6). Según el análisis de la varianza, las concentraciones de las plantas control eran bastante similares y aumentaron en todos los casos en respuesta al tratamiento de estrés en un rango de 81-208 μmol g⁻¹ PS. La desviación estándar de los datos fue muy elevada, no pudiéndose detectar así diferencias significativas entre los genotipos en el caso de las plantas en condiciones de sequía. El mayor aumento respecto al control se observa en la especie DAS1, mostrando 6,7 veces más prolina que en su respectivo control.

En el análisis de los compuestos fenólicos (CFT) y de los flavonoides totales (FT) se observa un patrón similar, hecho esperable dado que los flavonoides son un grupo muy numeroso dentro de los compuestos fenólicos (Figura 6). En este caso se observan concentraciones bastante dispares entre las accesiones incluso en las condiciones de las plantas control. En la mayoría de los genotipos evaluados se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Aunque no se observan diferencias significativas en CFT y FT entre los tratamientos en la accesión INS1

y tampoco en el contenido de flavonoides de INC1. El mayor aumento en el contenido de compuestos fenólicos totales se vuelve a observar en la especie LIN1 con un 52,9%. Y en el análisis de flavonoides totales, el mayor aumento se observa en el caso de las especies MEL1 Y LIN1 con un 81,80% y 80,91% respectivamente. También es destacable que el mayor valor, significativamente distinto a los demás tanto en control como en sequía, del contenido en compuestos fenólicos y de flavonoides se observó en INS2.

Para ver toda la información que concierne al porcentaje de aumento de todos los compuestos en cada genotipo en condiciones de sequía respecto al control se puede consultar el Anexo en la Tabla 3.

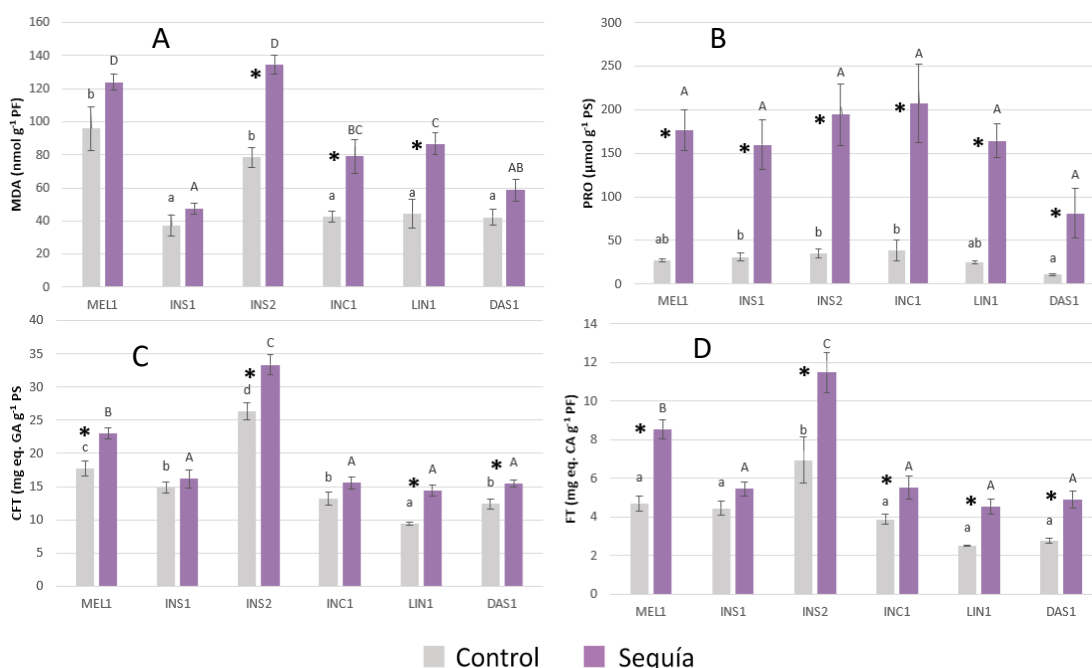


Figura 6. Variaciones en el contenido de MDA (A), prolina (B), compuestos fenólicos totales (C) y flavonoides (D) después de 18 días de tratamiento de sequía. La denominación de las accesiones se define en la Tabla 1. Las barras representan las medias (n=5) con los errores estándar. Las diferentes letras (minúsculas para las plantas control y mayúsculas para las plantas sometidas a estrés hídrico) indican diferencias significativas entre los genotipos, de acuerdo con la prueba de rangos múltiples con el método Student-Newman-Keuls a un valor-P<0,05. El asterisco indica diferencias significativas entre el tratamiento control y el de sequía de acuerdo al valor-P de la prueba-F del ANOVA.

4.2.2. Comparación de la respuesta de los híbridos respecto a sus parentales

Los 3 híbridos evaluados también se vieron afectados por el estrés causado por la sequía. Para comparar su comportamiento, se utilizó el cálculo de los parentales medios (Pm), que corresponde a la media de los valores de los dos parentales. Utilizando el valor observado en el híbrido (F1), calculado como la media de las réplicas, y el valor del parental medio se puede calcular un ratio que desvela si hay diferencias respecto a los parentales (Tabla 5). En dicha tabla se encuentran recogidos los resultados de los parámetros más relevantes de crecimiento y de los análisis bioquímicos.

El híbrido MEL1 x INS1 se desvió del valor predicho del parental medio para la mayoría de los parámetros (Tabla 5). Este híbrido fue heterótico para los parámetros de peso tanto de raíz como de parte aérea y para la altura. También fue heterótico para la acumulación de prolina,

mostrando mejor resultado que ambos parentales. El otro híbrido de *S. melongena* con *S. insanum*, MEL1 x INS2, en general no obtuvo mejores resultados que sus parentales. Aunque es remarcable que en condiciones de sequía tuvo mayores concentraciones del osmolito prolina. El híbrido INC1 x MEL1 tampoco se mostró tan heterótico como lo hizo MEL1 x INS1, aunque cabe destacar la capacidad aumentada de acumulación de compuestos fenólicos que posee con respecto a sus parentales. En todos los híbridos se observó un sistema radicular más desarrollado respecto a sus parentales, lo que les puede conferir una ventaja en condiciones de escasez de agua, y también un menor contenido en MDA.

En este caso también se realizó un análisis de la varianza para determinar si hubo diferencias significativas entre genotipos sometidos al mismo tratamiento y dentro de cada genotipo también se evaluaron las diferencias entre el tratamiento de control y sequía en el Anexo en la Tabla 4.

Tabla 5. Análisis de los híbridos utilizando sus parentales medios. En el interior viene recogido en primer lugar el valor de MEL1 para dichos parámetros. Seguidamente para cada híbrido se recoge el valor observado en el híbrido para cada parámetro (F1), el cual es la media de las 5 réplicas biológicas. A continuación, se recoge el valor del parental silvestre seguido del valor del ratio F1/Pm, donde Pm es el valor del parental medio. Este ratio está coloreado según su valor utilizando la relación de colores que aparece en la leyenda.

		MEL1 x INS1				MEL1 x INS2			INC1 x MEL1		
		MEL1	F1	INS1	Ratio	F1	INS2	Ratio	F1	INC1	Ratio
Contenido de agua total	C	82,81	78,72	76,01	0,99	82,32	80,76	1,01	80,89	80,36	0,99
	S	67,13	60,33	71,79	0,87	60,56	67,34	0,90	63,56	66,91	0,95
Altura	C	12,2	18,60	16,25	1,31	14,10	18,00	0,93	14,60	17,00	1,00
	S	10,4	15,50	14,00	1,27	14,10	16,70	1,04	15,36	13,10	1,31
Peso fresco parte aérea	C	25,18	29,89	15,52	1,47	24,59	22,96	1,02	22,03	18,17	1,02
	S	10,18	11,22	8,63	1,19	12,16	10,63	1,17	9,28	7,72	1,04
Peso seco parte aérea	C	3,76	5,17	3,02	1,52	3,93	4,12	1,00	4,10	3,75	1,09
	S	2,67	3,55	2,15	1,47	3,58	2,84	1,30	2,94	2,44	1,15
Peso fresco raíz	C	9,61	11,96	5,50	1,58	13,54	8,99	1,46	11,22	7,92	1,28
	S	6,94	7,50	5,20	1,24	6,06	6,41	0,91	8,80	3,14	1,75
Peso seco raíz	C	1,65	2,55	1,30	1,73	2,11	1,45	1,36	1,76	1,16	1,25
	S	1,92	2,65	1,32	1,63	2,17	1,94	1,13	2,71	1,16	1,76
Área de las hojas	C	158,5	153,05	89,12	1,24	162,30	145,36	1,07	148,27	150,80	0,96
	S	87,12	59,54	58,69	0,82	69,40	71,89	0,87	60,24	72,08	0,76
Contenido en MDA	C	95,82	37,33	37,04	0,56	39,45	78,41	0,45	42,43	42,43	0,61
	S	123,9	69,29	47,59	0,81	84,02	134,57	0,65	89,36	78,94	0,88
Contenido en prolina	C	27,02	33,90	30,79	1,17	15,43	35,22	0,50	6,64	38,67	0,20
	S	176,8	231,15	159,75	1,37	243,03	194,72	1,31	157,63	207,30	0,82
Contenido en compuestos fenólicos	C	17,74	16,28	14,81	1,00	18,98	26,37	0,86	20,95	13,16	1,36
	S	22,99	19,91	16,16	1,02	24,34	33,35	0,86	25,18	15,57	1,31
Contenido en flavonoides	C	4,7	4,21	4,46	0,92	5,00	6,95	0,86	5,55	3,87	1,30
	S	8,55	7,06	5,45	1,01	9,38	11,47	0,94	9,57	5,53	1,36



4.2.3. Criterios de evaluación de la tolerancia de las plantas

En este trabajo se propusieron varios métodos de sencillo cálculo para ordenar las plantas según su tolerancia o sensibilidad a la sequía (Figura 7).

Un parámetro muy informativo es el porcentaje de reducción del peso fresco que experimenta la planta a consecuencia de estar sometida a algún estrés, con respecto al control no estresado. Esta evaluación ayuda a estimar la repercusión que ha tenido el efecto de la sequía sobre las plantas tanto en su humedad como en su generación de biomasa. Basándonos en este criterio se observó que, entre todos los genotipos, LIN1 e INC1 mostraron la peor respuesta con una reducción del 58%. En cambio, la accesión INS1 mostró la menor reducción con un 34,23% y muy cerca de ella, le siguió DAS1 con un 34,66%.

Las accesiones también fueron ordenadas atendiendo a otros criterios. La ordenación por reducción del contenido de agua nos permite valorar la pérdida de agua que ha sufrido el genotipo respecto al control. En este caso los mejores resultados son también de las especies INS1 (5,55%) y DAS1 (14,53%).

El criterio basado en el peso seco se centra en la reducción del crecimiento de biomasa. Y, por último, el aumento de la eficiencia en el uso del agua evalúa la capacidad que tiene cada genotipo en condiciones de sequía para aprovechar el agua aportada para generar biomasa. Cabe remarcar que este último parámetro se define como aumento y no como reducción porque todos los genotipos en sequía han mejorado esta eficiencia respecto a las plantas control. La ordenación de los genotipos mediante estos dos criterios apuntó a DAS1 como la especie más recomendable.

La accesión de *S. melongena*, MEL1, sorprendentemente no fue la más afectada por el tratamiento. Si hacemos una valoración general basándonos en los criterios, se observa que las accesiones LIN1 e INC1 obtienen unos resultados más bajos que *S. melongena*, a excepción de en la eficiencia en el uso del agua. Este último valor, de tanto interés agronómico, revela la necesidad de la mejora de la tolerancia a la sequía de la berenjena cultivada.

Si observamos el comportamiento de los híbridos interespecíficos se puede apreciar cómo ninguna de las combinaciones de *S. melongena* con *S. insanum* ha obtenido una tolerancia mejorada con respecto a ambos parentales. En cambio, el híbrido INC1 x MEL1 se define en la mayoría de los criterios como más tolerante que sus dos parentales y más tolerante que el resto de híbridos.

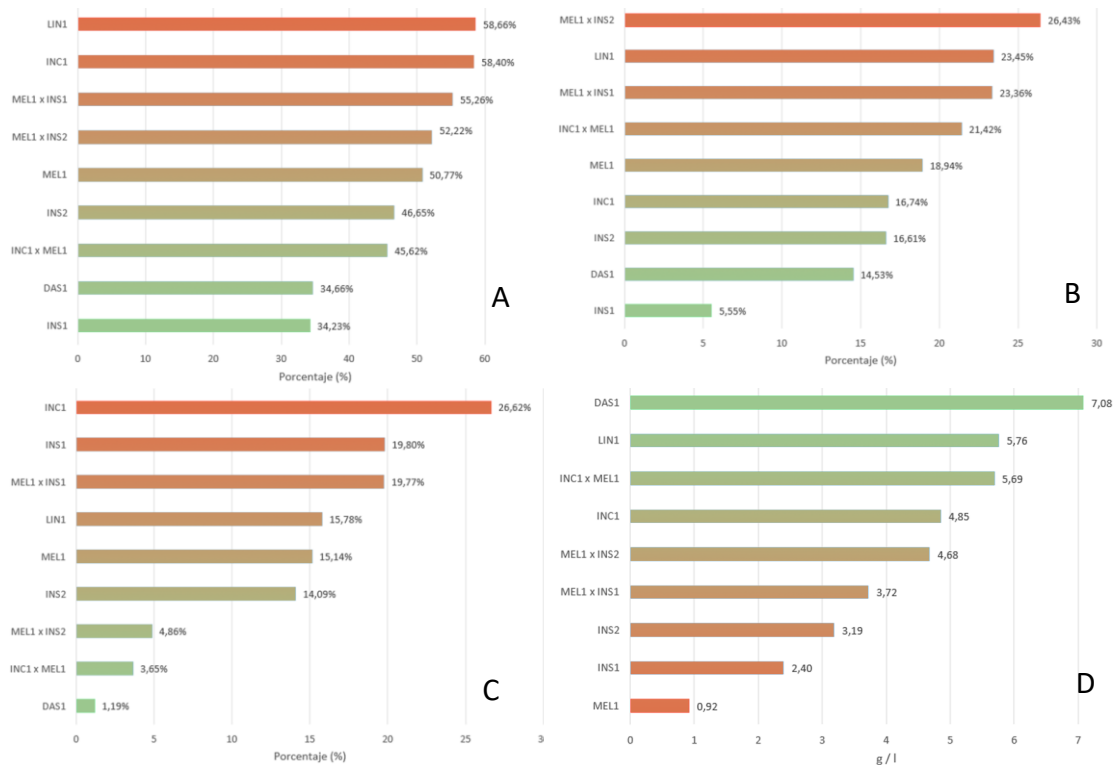


Figura 7. Porcentaje de reducción del peso fresco (A), porcentaje de reducción de humedad de la planta (B), porcentaje de reducción de biomasa seca (C) y porcentaje de aumento de la eficiencia del uso del agua (D) de las en las plantas sometidas a sequía respecto a sus respectivas plantas control. La denominación de las accesiones se define en la Tabla 1. El aumento de la eficiencia en el uso del agua se ha calculado como el incremento de los gramos de biomasa secos producidos desde el t_0 por litro de agua consumido.

4.2.4. Análisis de componentes principales (ACP) y correlaciones

Mediante el ACP se realizó una reducción de dimensiones donde la primera componente principal explicó el 75,7% de la variación de las muestras (Figura 8). En el caso de la CP2 explica el 10,3 % de la varianza total, mientras la CP3 solo explica el 5,8%. Por lo que fueron seleccionadas para explicar la variación la CP1 y la CP2 que suman el mayor porcentaje de la varianza total, concretamente el 86%.

La CP1 fundamentalmente es explicada mediante los parámetros bioquímicos los cuales influyen de forma positiva mientras que los parámetros morfométricos influyen de forma negativa en la formación de la componente. El nivel de prolina es el factor que más contribuye a la CP1, con un peso en la componente de 0,82. El siguiente parámetro que más contribuye es el peso fresco de la parte aérea con un -0,27. Se puede observar cómo los niveles de los compuestos bioquímicos se encuentran correlacionados positivamente entre sí (coeficientes de correlación entre 0,64 y 0,93) y la mayoría de los parámetros morfométricos también. Entre ellos están correlacionados negativamente (Figura 8 y Tabla 5 del Anexo).

En la formación de la CP2 contribuyen de forma similar las variables CFT, FT, PF_r y PS_r , con un valor de peso de 0,45 aproximadamente. Mientras que el resto de las variables contribuyen con un menor peso en la generación de la CP2.

Al proyectar los datos sobre este nuevo espacio conformado por CP1 y CP2 se observa una separación entre las accesiones según el tratamiento recibido formándose 4 grupos. Por lo tanto, a la derecha encontramos las accesiones que presentan niveles elevados de prolina y

bajos valores de peso fresco y humedad. Se puede apreciar que MEL1 y sus híbridos forman un pequeño clúster en condiciones de sequía, mientras LIN1, INC1 y INS1 forman otro grupo. La accesión DAS1 se comporta parecido al resto de las accesiones en condiciones control, mientras que en sequía se observa un comportamiento diferencial con respecto a sus relativos.

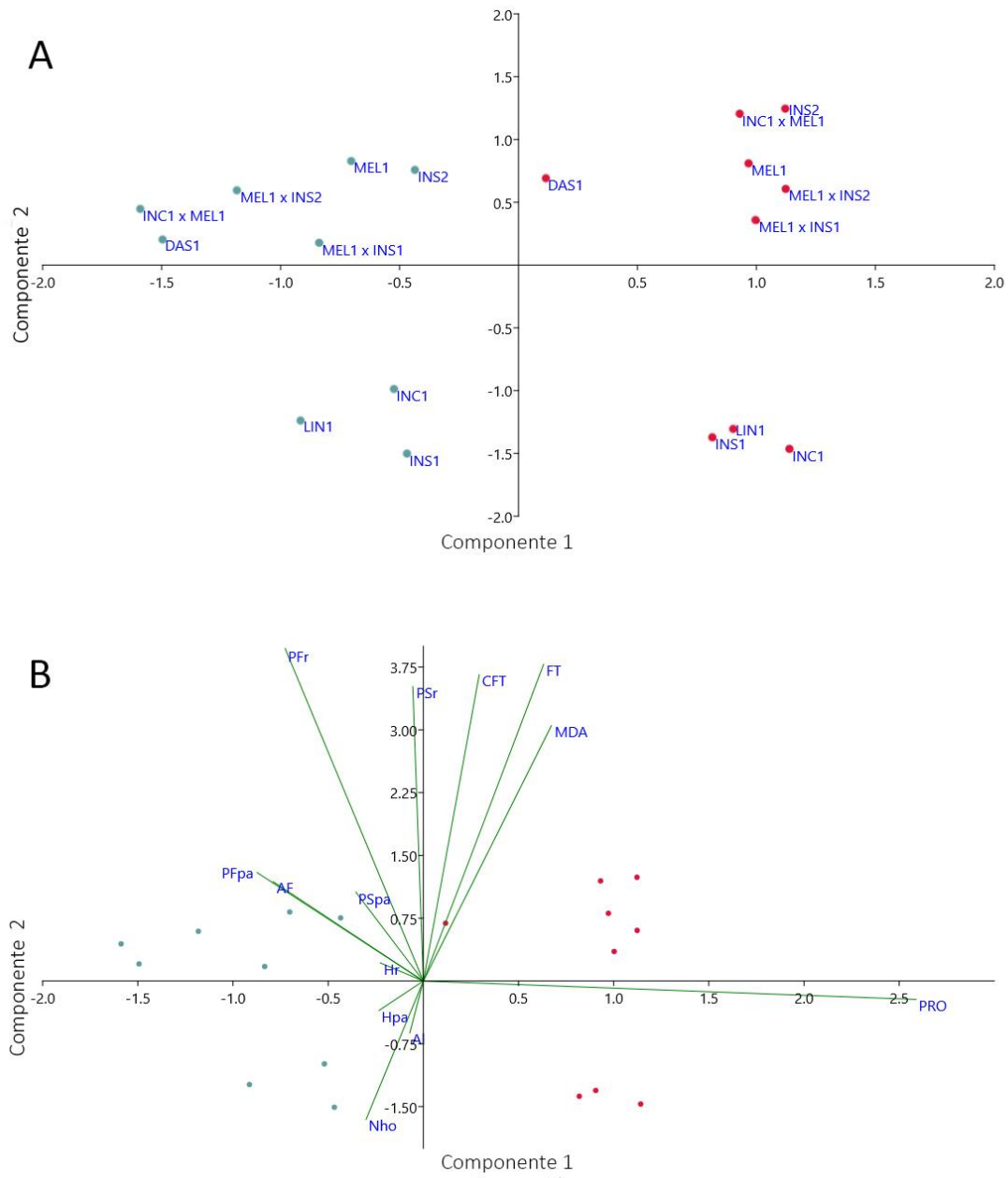


Figura 8. Score plot (A) y biplot del ACP (score plot + loading plot) (B). La componente principal 1 y 2 explican respectivamente el 75,7% y el 10,3% de la variación de los datos. En el gráfico A se muestran las relaciones entre las 9 accesiones sujetas a los dos tratamientos (control vs. sequía). En la gráfica de arriba los puntos azules y rojos representan, respectivamente, los tratamientos de control y sequía. En el diagrama B se muestran las relaciones entre los 13 parámetros morfológicos y bioquímicos. Los vectores muestran el resultado del análisis para los parámetros: peso fresco de raíz (PF_r) y de parte aérea (PF_{pa}), el peso seco de raíz (PS_r) y de parte aérea (PS_{pa}), la altura de la planta (A), el número de hojas (N_{ho}), el área foliar (AF), la humedad de la parte aérea (H_{pa}), de la raíz (H_r), el contenido el compuestos fenólicos totales (CFT), el contenido en flavonoides totales (FT), el contenido en MDA y el contenido en prolina

5. Discusión

5.1. Relevancia del proyecto

En la actualidad la sequía es uno de los factores más devastadores para la agricultura, siendo la causa de grandes pérdidas de producción agrícola (Bray *et al.*, 2000; Bartels y Sunkar, 2005). Las predicciones señalan que este efecto va a agravarse debido al cambio climático (IPCC, 2014). En este contexto, el uso de la mejora genética para aumentar la tolerancia de los cultivos puede ser crucial.

Concretamente, la exploración de germoplasma silvestre relacionado con la berenjena puede ser de gran utilidad, pues se ha visto que algunas de estas especies son capaces de vivir en zonas desérticas o secas (Dempewolf *et al.*, 2014; Knapp *et al.*, 2013). Por ello, en este trabajo se ha evaluado la respuesta a la sequía de especies silvestres relacionadas con la berenjena y de híbridos interespecíficos con algunas de estas especies. También se han analizado algunos mecanismos bioquímicos que podrían estar relacionados con la tolerancia a la sequía. La información aquí recogida puede ser de interés para abordar el diseño de futuros programas de mejora genética de la berenjena.

5.2. Evolución del crecimiento de las plantas y verificación de la efectividad del tratamiento.

Tanto la progresión de la humedad del sustrato como la evolución del crecimiento de las plantas control por un lado y de las plantas en sequía por otro mostró que el tratamiento fue efectivo en nuestras condiciones experimentales.

El riego de las plantas control fue programado para que la humedad se mantuviera dentro de un intervalo propicio para el desarrollo de las plantas (80-60%). Sin embargo, el último día (el día del muestreo), en el control se observó un descenso de humedad hasta aproximadamente el 50%. No se descarta que esta ligera deshidratación del sustrato pueda repercutir en cierto modo a los resultados, pues las diferencias entre los dos tratamientos serían menores. Pese a ello, las diferencias de humedad en la propia planta entre las plantas control y las plantas sometidas a sequía fueron altamente significativas (valor-P < 0.001), como se puede observar en el análisis de la varianza de la Tabla 3, por lo que no se puede rechazar la efectividad del tratamiento.

Concretamente, dieciocho días fueron suficientes para deshidratar el sustrato de las plantas sometidas a sequía casi hasta la totalidad y para observar diferencias significativas entre las plantas. En este sentido debe tenerse en cuenta que las macetas eran de pequeño tamaño por lo que pueden deshidratarse más rápidamente que en condiciones de campo. Por otro lado, las condiciones de temperatura y humedad pueden hacer que este tiempo varíe en otros experimentos.

5.3. La respuesta al tratamiento de sequía

5.3.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento y de humedad de *S. melongena* y su pool genético

La inhibición de crecimiento es un efecto ampliamente visto en plantas sometidas a estrés (Hsiao *et al.*, 1976). La activación de los mecanismos de defensa supone un consumo de los recursos de la planta (precursores metabólicos y energía), lo que afecta al metabolismo primario y por

tanto, a la acumulación de biomasa (Munns y Termaat, 1986). Este efecto se observa en los resultados de nuestro trabajo. Cuando los tejidos mostraron deshidratación extrema, se cesó el tratamiento. En el periodo de tiempo del tratamiento el déficit hídrico tuvo un fuerte impacto en la mayoría de los parámetros analizados, generalmente más alto que el efecto del genotipo (Tabla 3). El hecho de que la contribución de los efectos residuales a la suma de cuadrados medios fuera generalmente baja en comparación con el resto de los efectos, indica que la influencia de los factores del ambiente y no controlados en este experimento fue pequeña, permitiendo maximizar la relevancia estadística de los datos.

El peso fresco de todas las plantas se redujo debido a las condiciones de estrés hídrico, aunque se observaron diferencias cuantitativas entre especies (Tabla 3 y Anexo Tabla 2). Este descenso no fue solo debido a la pérdida de agua, sino que el tratamiento de sequía también conllevó una reducción de la generación de biomasa en todas las plantas, lo que se manifiesta en un peso seco menor que en sus respectivos controles (Figura 5 y Anexo Tabla 2). Además, las humedades de las partes de la planta tuvieron un comportamiento algo dispar. En el caso de INC1 y LIN1 se observa un descenso de la humedad de la raíz notablemente más alto que en el caso de la parte aérea, mostrando la sensibilidad de esta parte de la planta.

En condiciones de estrés hídrico es común también observar cómo el crecimiento foliar se ve más afectado que el crecimiento radicular. La reducción de la expansión de las hojas resulta beneficiosa, dado que una menor área expuesta se traduce en una reducción de la transpiración (Mahajan y Tuteja, 2005). Estos acontecimientos están plasmados en nuestras mediciones, en los cuales en el área de las hojas se observa un descenso significativo por el tratamiento de sequía y también se observa un descenso significativo en el peso seco de las hojas. Al contrario, la reducción del peso seco de la raíz no es significativa y tampoco el efecto del tratamiento sobre su longitud (Figura 5 y Tabla 3). Y esta mínima reducción de la raíz es lo que sobre todo explica el menor efecto del tratamiento sobre el peso seco total. Con este acontecimiento se puede interpretar que existe una adaptación de la planta para mantener o aumentar el área de absorción de agua (Comas *et al.*, 2013). De hecho, en el estudio realizado por Rahma (2016) con genotipos similares relacionados con *S. melongena*, ya observó que la raíz no descendía su peso seco de forma significativa.

En alguno de los casos se advirtió un descenso del número de hojas debido al déficit hídrico. Este fenómeno se conoce como senescencia foliar y es un proceso fisiológico regulado que se ha visto que puede contribuir a la supervivencia de las plantas en condiciones climáticas adversas (Munné-Bosch y Alegre, 2004). Con este mecanismo se movilizan los nutrientes a otras partes de las plantas y se evitan las grandes pérdidas de agua por transpiración (Zimmermann y Zentgraf, 2005).

También se observó que la altura del tallo se mantuvo similar en la mayoría de los genotipos pese al tratamiento de sequía, probablemente debido a que el tratamiento no duró el tiempo suficiente como para llegar a observar cambios.

La reducción de peso fresco ha sido el utilizado como el criterio principal para evaluar la tolerancia relativa de estas especies, aunque también fueron ordenadas con otros criterios (Figura 5). INS1 es la accesión con menor reducción del peso fresco en las condiciones de sequía y el segundo mejor valor corresponde a DAS1.

En las 5 especies también se observó una fuerte reducción relativa del agua, aunque la deshidratación de los genotipos no fue uniforme. La accesión INS1 parece ser más resistente a la deshidratación inducida por la sequía y le sigue DAS1.

La accesión DAS1 es, además, la que tiene menor reducción del peso seco (1,19%), por tanto, se puede concluir que su generación de biomasa apenas se ha visto afectada por la escasez de agua. Esta capacidad de generación de biomasa pese a la condición de estrés es lo que le posiciona también en primer lugar en cuanto a eficiencia en el uso del agua (gramos producidos por litros de agua consumidos). Esta ventaja no la posee INS1, cuya capacidad de generación de biomasa en condiciones de estrés es muy reducida (Figura 1). Los mecanismos por los cuales INS1 responde mejor que INS2 deberán determinarse en futuros experimentos.

El estudio comparativo realizado por Rahma (2016) concluyó que *S. dasyphyllum* era relativamente más sensible que el resto de los genotipos. No obstante, en este ensayo las plantas se encontraban en un estadio algo más joven (3-4 hojas) y el tratamiento no fue tan severo (reducción del 50% de la irrigación). En estas diferencias radica la importancia de realizar un experimento con el mayor número de genotipos posibles y en diferentes estadios y condiciones, pues se podría descartar una especie que en realidad sea prometedora y viceversa. Cabe destacar también que en el ensayo de Rahma (2016) se evaluó un híbrido de *S. dasyphyllum* con *S. melongena* que obtuvo mejores resultados que ambos parentales, lo que reafirma la aptitud de *S. dasyphyllum* como especie donadora de genes de interés.

Las especies como *S. insanum* y *S. dasyphyllum* son además recomendables por el tamaño de fruto parecido al de *S. melongena*, pues se podría recuperar este carácter en programas de retrocruzamiento de forma rápida (Kaushik *et al.*, 2016).

Los resultados de Rahma (2016) determinaron que *S. linnaeanum* era una especie muy afectada por el estrés hídrico. En el presente estudio los datos apuntan a la misma conclusión; pues se observa que es la especie con mayor reducción de peso fresco y la segunda con mayor reducción de humedad. Sin embargo, no se puede descartar el uso de esta especie en la mejora de la tolerancia al estrés salino (Weese y Bohs, 2010).

Aunque la berenjena se considere tolerante al someterla a estrés hídrico suave (Sarker *et al.*, 2004; Díaz-Pérez y Eaton, 2015), los resultados obtenidos indican que la ausencia completa de riego afecta al cultivar de *S. melongena* aquí evaluado. De hecho, MEL1 resultó ser la accesión con menor eficiencia del uso del agua, mostrando que un aumento de la tolerancia haciendo uso de especies silvestres relacionadas puede ser recomendable para el aumento del rendimiento del cultivar.

5.3.2. Estimación del estrés oxidativo mediante la medición de MDA

Cuando están en exceso, las especies reactivas de oxígeno causan la oxidación de los residuos aminoacídicos de las proteínas, los lípidos de las membranas y el ADN. Este deterioro celular causado por estos compuestos se conoce como estrés oxidativo (Halliwell, 2006).

En nuestro caso la falta de agua generó como efecto secundario un estrés oxidativo, como se puede observar por los aumentos en MDA de las muestras de hoja, un marcador del estrés oxidativo usado ampliamente (Del Rio *et al.*, 2015).

Basándonos en este compuesto, en las condiciones control puede observarse también la presencia de estrés oxidativo. Esto es debido a que la planta suele estar sometida a otros estreses abióticos también como la luz y la temperatura, que también influyen en la acumulación de ROS (Apel y Hirt, 2004). Además, en condiciones control ya se observa que algunos genotipos poseen mayores niveles de estrés oxidativo que otros, por lo que la eficiencia de sus mecanismos de tolerancia, basados en la actividad de sistemas antioxidantes, debe ser diferente.

Por otro lado, el aumento de MDA en condiciones de estrés solamente fue estadísticamente significativo en la mitad de las especies (Figura 6). En la accesión de *S. melongena*, MEL1, la alta desviación de los datos no permitió observar diferencias. El estudio de Tani *et al.* (2018) en el que se realizó simultáneamente una infección con *Verticillium dahliae* y un tratamiento de sequía sí determinó una subida significativa en MDA.

En las accesiones DAS1 e INS1 el efecto tampoco fue significativo. Este resultado era esperable dado que, como hemos dicho anteriormente, la sequía no afectó en gran medida a su desarrollo. Por tanto, estas especies parecen tener unos mecanismos antioxidantes más eficaces.

Al contrario, en LIN1 se observó el máximo aumento indicando que estuvo muy afectada por el estrés oxidativo inducido por la sequía. Este valor está acorde con los daños observados mediante los resultados de humedad y peso fresco discutidos anteriormente, y corrobora su sensibilidad.

5.3.3. Efecto de la acumulación de prolina

El estrés osmótico causado por la sequía induce en la planta la síntesis y acumulación de osmolitos para ajustar el equilibrio osmótico. Los solutos compatibles acumulados en altos niveles pueden contribuir a la tolerancia sin interferir con el metabolismo celular normal (Singh *et al.*, 2015). La prolina es uno de los solutos compatibles más típicos de plantas y su aumento en respuesta al déficit hídrico ha sido observado en otras especies, como por ejemplo en las hojas del arroz (Verbruggen y Hermans, 2008, Hsu *et al.* 2003; Jimenez *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2006). Sin embargo, la acumulación de prolina no siempre se puede correlacionar de forma positiva con la tolerancia.

Todos los genotipos evaluados en este trabajo presentaron aumentos muy significativos cuando se sometieron a estrés hídrico. En el estudio realizado por Kurniawati (2014) en el que se sometía *S. melongena* a sequía, también se observó un aumento de prolina muy significativo (10 veces respecto al control). También se ha recogido un aumento de prolina significativo bajo condiciones de estrés en *S. melongena* en otros experimentos (Tani *et al.*, 2018; Sarker *et al.*, 2005). Sarker *et al.*, (2005) remarcaron el importante papel de este osmolito en el ajuste osmótico de *S. melongena* pues pudieron correlacionar los mayores niveles de prolina en condiciones de déficit hídrico con el mantenimiento de la actividad fotosintética.

En cambio, la dispersión observada en las muestras no permite determinar diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos sometidos al tratamiento de sequía. Y el nivel de aumento observado en cada especie debido al tratamiento, en todas significativo, tampoco se puede correlacionar con una mejor respuesta a la sequía.

Pese a ello, con estos valores absolutos de concentración tan altos en condiciones de sequía se puede afirmar que la concentración de prolina en el citosol fue lo suficientemente alta como para tener un efecto positivo en el ajuste del equilibrio osmótico (Heuer, 2010). Así pues,

aunque no puede establecer una correlación exacta con la tolerancia, no se puede desestimar el efecto positivo de este osmolito en la protección frente a la deshidratación inducida por sequía.

5.3.4. Efecto de la acumulación de flavonoides y otros compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos y, en particular, los flavonoides poseen actividades antioxidantes y secuestradoras de ROS. Son un buen ejemplo de metabolitos que se sintetizan en las plantas a consecuencia del estrés oxidativo, especialmente cuando su efecto es severo y el primer mecanismo de defensa ante ROS, basado en enzimas antioxidantes, no es suficiente (Fini *et al.*, 2011; Bautista *et al.*, 2016). Esta es probable nuestra situación, pues el tratamiento de sequía fue muy severo (eliminación de la totalidad del riego).

En la mayoría de los genotipos las diferencias observadas entre control y sequía son significativas (Figura 6). Los cambios en flavonoides son cualitativamente parecidos a los observados en compuestos fenólicos, este patrón conservado es esperable dado que los flavonoides son el subgrupo más numeroso de los compuestos fenólicos.

El desarrollo de mutantes de *Arabidopsis thaliana* reveló que la acumulación de flavonoides es esencial para mejorar la tolerancia a la sequía en esta especie modelo (Nakabayashi *et al.*, 2014). De acuerdo con Nisha *et al.* (2009), flavonoides aislados de berenjena mostraron una fuerte actividad secuestradora de radicales libres.

Al comparar con los niveles de subida MDA (Figura 6), se puede observar cómo aproximadamente hay una correspondencia entre el nivel de estrés oxidativo inducido por la sequía y la inducción de la síntesis de compuestos antioxidantes. Por ejemplo, en INS2 y LIN1 se observaba un gran incremento del contenido de MDA y en ellas se observa una inducción de la biosíntesis de estos compuestos mucho mayor. Así, el estrés oxidativo está induciendo la síntesis de compuestos antioxidantes.

En INS1 no se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el nivel de estrés oxidativo también se consideró bajo mediante los niveles observados de MDA. Por tanto, su sistema antioxidante, también conformado por enzimas, parece ser más activo.

El contenido en flavonoides fue similar en las especies no sometidas a estrés, pero no el contenido los compuestos fenólicos totales. Con ello se deduce que las especies deben tener un contenido diferencial, lo cual también puede ser de interés si se quiere aumentar la capacidad antioxidante de la berenjena.

Al analizar los compuestos fenólicos y los flavonoides se debe considerar que estos compuestos son responsables de muchas funciones en la célula, i.e. hormonales o estructurales (Gould y Lister, 2005; Boerjan *et al.*, 2003; Ylstra *et al.*, 1992). Estas funciones adicionales no relacionadas con las respuestas a estrés abiótico, pueden enmascarar parcialmente los resultados.

5.3.5. Evaluación de la respuesta de los híbridos

Una vez identificada la fuente de variabilidad de interés, el siguiente paso del programa de mejora es la obtención de híbridos interespecíficos entre dicha especie y una domesticada. En nuestro ensayo también se pudo evaluar la respuesta de 3 híbridos interespecíficos que se habían generado con anterioridad y que también fueron caracterizados fenotípicamente (Plazas *et al.*, 2016; Kaushik *et al.*, 2016), y son los siguientes: MEL1 x INS1, MEL1 x INS2 e INC1 x MEL1.

Resulta de especial interés evaluar su crecimiento dado que los híbridos en ocasiones son heteróticos para rendimiento. El uso de la ratio F1/Pm nos ayudó a comparar al híbrido con sus parentales. Un valor menor que uno en un parámetro indica que no se ha conseguido una combinación que se comporte mejor que los parentales. Un valor de cero indica que el híbrido se comporta parecido. Y un valor mayor que uno indica que al menos se comporta mejor que uno de los parentales.

Como puede verse en con las ratios de la Tabla 5, algunos híbridos poseen características mejoradas respecto a sus parentales (i.e. desarrollo de la raíz mejorado), aunque no por ello son más tolerantes que los parentales. Solo el híbrido INC1 x MEL1 consigue mejores resultados que sus parentales en condiciones de sequía (Figura 5). La mayor acumulación de flavonoides y otros compuestos fenólicos parece ser una parte de su mecanismo mejorado de tolerancia con respecto a sus parentales.

El híbrido INC1 x MEL1 fue además el híbrido que mejor respuesta obtuvo ante la sequía. No obstante, las características por las cuales se desenvuelve mejor en sequía que los otros híbridos se desconocen puesto que el análisis de los parámetros de crecimiento y bioquímicos no mostró apenas diferencias significativas entre la ejecución de cada híbrido (Anexo Tabla 4). Sus raíces en el tratamiento de sequía estaban más desarrolladas que en el resto de los híbridos, pero también deben poseer otros mecanismos bioquímicos mejorados no evaluados en este trabajo que estén involucrados en la tolerancia. Así pues, es de interés el estudio de estos mecanismos en futuros proyectos.

Cabe destacar también, que, en condiciones favorables, es decir, sin déficit hídrico, MEL1 x INS1 se desarrolla mejor que sus parentales, mostrando vigor híbrido (Tabla 5). A la vista de lo anterior, INC1 x MEL1 y MEL1 x INS1 podrían ser de interés para usarse directamente como portainjertos. Y el híbrido INC1 x MEL1 podría además continuar en un programa de retrocruzamiento para generar líneas de introgresión con la finalidad de mejorar la tolerancia de la berenjena cultivada.

En este ensayo no se han evaluado todas las especies que se pueden cruzar con *S. melongena* y que puedan ser de interés por sus genes de tolerancia. En futuros experimentos se deberían tener en consideración especies también del *pool* terciario como *S. elaeagnifolium*, que crece en ambientes muy secos (Christodoulakis *et al.*, 2009) y cuya hibridación con la berenjena fue lograda en un proyecto utilizando rescate embrionario (Kouassi *et al.*, 2016). En este tipo de especies tan lejanas filogenéticamente también habría que evaluar si poseen baja fertilidad o esterilidad. Estas especies podrían poseer mecanismos diferentes de tolerancia a la sequía, pero éstos se pueden combinar para obtener nuevas variedades más tolerantes.

5.3.6. Análisis de componentes principales

La comparación de las accesiones sometidas a distintos tratamientos utilizando un ACP muestra el impacto del tratamiento de déficit hídrico en la respuestas morfológicas y bioquímicas a la sequía. El ACP explicó el 86% de la variabilidad total y se pudo observar que existen altas correlaciones entre los parámetros morfológicos mientras que los parámetros bioquímicos están correlacionados entre sí. Entre ellos se encuentran negativamente correlacionados indicando que las plantas estresadas aumentaban el contenido de compuestos bioquímicos, especialmente prolina y disminuían su crecimiento.

Se observó cómo el contenido de prolina fue un factor clave para distinguir entre los tratamientos. Únicamente con el contenido de prolina se podrían separar las plantas control respecto a las plantas sometidas a la sequía, siendo así un buen indicador de estrés hídrico. De hecho, el ANOVA también mostró que todas las especies e híbridos evaluados mostraron un aumento de prolina muy significativo ante las condiciones de estrés (Figura 6).

Con el bajo peso de las variables altura de la planta y peso de raíz en la CP1, se refleja que estos no son unos parámetros que en general difieran entre los tratamientos. Esto fue observado también mediante el análisis de la varianza (Tabla 3 y Anexo I Tabla 2).

El ACP nos permitió identificar fácilmente también a las accesiones que se comportan de forma similar a otras o de forma diferente. En las condiciones control, DAS1 se comporta de forma parecida al resto de accesiones, pero en condiciones de sequía posee un mejor resultado que el resto, lo que podría asociarse a su sistema radicular más desarrollado. Las accesiones INS1, LIN1 e INC1 tienen comportamientos parecidos, comparten entre otros las características de peso de raíz bajo y un bajo contenido en MDA. Éstos y otras variables les sitúan en un pequeño clúster.

Otro agrupamiento se observa en *S. melongena*, *S. insanum* y los híbridos en condiciones de estrés mostrando que los híbridos tienen un comportamiento similar a sus parentales y lo cual concuerda con la teoría de que *S. insanum* es el ancestro silvestre de *S. melongena* (Weese y Bohs, 2010).

5.4. Perspectivas futuras

En este trabajo se ha analizado una pequeña parte de la compleja respuesta que puede experimentar una planta en condiciones de sequía. Resulta de interés realizar en un futuro un estudio más exhaustivo donde se puedan analizar otros metabolitos, actividad enzimática y la expresión génica (ver Introducción sección 1.5.4.). El análisis de muchos biomarcadores puede facilitar el descubrimiento de alguno que permita detectar los efectos perjudiciales de la sequía antes de que la inhibición de crecimiento sea perceptible.

Es importante mencionar que el ensayo debería realizarse también en campo, para obtener unos resultados más acordes con las condiciones reales, en las que, por ejemplo, no habría limitación para el desarrollo de las raíces debido a las macetas.

Puesto que el efecto del estrés hídrico depende del estado fisiológico y morfológico de la planta, también se debería considerar aplicar el tratamiento de forma que se pueda evaluar su efecto en la floración y cuajado de fruto, dado que es esta parte de la planta la que tiene mayor importancia económica.

El desarrollo de ILs (líneas de introgresión) utilizando MEL1 como parental recurrente podría ser el camino que seguir en estudios siguientes. Las líneas de introgresión permitirían por un lado diseccionar la base genética de los caracteres y por otro se generarían variedades de berenjena con tolerancia a la sequía mediante la introgresión de genes.

Los híbridos con buena ejecución en condiciones de sequía también pueden ser útiles como portainjertos. Incluso algunos híbridos pueden tener un interés comercial. Este puede ser el caso de un híbrido con *S. insanum*, dado que en el sudeste asiático en ocasiones se cosecha desde la naturaleza (Davidar *et al.*, 2015)

Pese a las limitaciones, la evaluación morfológica de todos estos genotipos nos ha permitido evaluar qué especies silvestres resultan de interés para aumentar la tolerancia a la sequía de la

berenjena cultivada. Esta información será útil en los proyectos de mejora genética en los que se considere la introgresión de genes a *S. melongena*.

6. Conclusiones

- Los resultados proporcionan información relevante sobre las respuestas morfológicas y bioquímicas de la berenjena y especies silvestres relacionadas ante el déficit hídrico.
- El tratamiento de sequía provocó descensos en la mayoría de los parámetros morfológicos a excepción de la raíz, la cual mantuvo o incluso aumentó su biomasa y así la superficie de absorción de agua.
- Los resultados mostraron que DAS1 e INS1 tuvieron un comportamiento de mayor tolerancia a la sequía: INS1 destaca por ser la accesión con menor pérdida de agua y DAS1 por la mayor capacidad de generación de biomasa en condiciones de sequía. Estas accesiones pueden ser buen material de partida para la introgresión de genes en *S. melongena*.
- La accesión de *S. melongena* (MEL1) no es la especie más sensible de todas las evaluadas; la más afectada por el estrés hídrico fue la accesión *S. linnaeanum*.
- De los 3 híbridos evaluados (MEL1 x INS1, MEL1 x INS2 e INC1 x MEL1), el híbrido INC1 x MEL1 fue el más recomendable al obtener mejor respuesta a la sequía que los otros híbridos evaluados y que sus propios parentales.
- El híbrido MEL1 x INS1 presenta vigor híbrido en condiciones favorables (sin déficit hídrico), pudiendo ser de interés como portainjertos.
- Niveles relativamente elevados de malondialdehído (MDA) se pudieron correlacionar con una menor tolerancia a la sequía
- El aumento de prolina parece una respuesta de protección general en todos los genotipos para contribuir al ajuste osmótico.
- Aunque no se observaron diferencias entre los genotipos tolerantes y sensibles, se pudo afirmar que la alta concentración de prolina contribuyó al ajuste osmótico.
- El estrés oxidativo indujo la activación de la biosíntesis de flavonoides y otros compuestos fenólicos en la mayoría de las accesiones.
- Los resultados obtenidos constituyen información de utilidad para el diseño de una nueva generación de cultivares de berenjena con una mayor tolerancia a la sequía.

7. Bibliografia

- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N. Y HEATH, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331–1341. <http://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1331>
- APEL, K. Y HIRT, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- ASHRAF, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 28(1), 169–183. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.005>
- ASHRAF, M. Y FOOLAD, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- BARTELS, D. Y SUNKAR, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23–58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P. Y TEARE, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- BAUTISTA, I.; BOSCAIU, M.; LIDÓN, A.; LLINARES, J. V.; LULL, C.; DONAT, M. P. Y VICENTE, O. (2016). Environmentally induced changes in antioxidant phenolic compounds levels in wild plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2025-2>
- BHASKARAN, S.; SMITH, R. H. Y NEWTON, R. J. (1985). Physiological Changes in Cultured Sorghum Cells in Response to Induced Water Stress: I. Free Proline. *Plant physiology*, 79(1), 266–269. <https://doi.org/10.1104/pp.79.1.266>
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J. Y WERETILNYK, E. (2000). Responses to abiotic stress, en: Biochemistry & molecular biology of plants. Gruissem, W. and Jones, R.; Eds.; American Society of Plant Physiologist, 1158-1203.
- BOERJAN, W.; RALPH, J. Y BAUCHER, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- BOYER, J. S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571), 443–448. <https://doi.org/10.1126/science.218.4571.443>
- CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANZIA, E. Y STANCA, A. M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, 105(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2007.07.004>
- CHRISTODOULAKIS, N. S.; LAMPRI, P. N. Y FASSEAS, C. (2009). Structural and cytochemical investigation of the leaf of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*), a drought-resistant alien weed of the Greek flora. *Australian Journal of Botany*, 57(5), 432. <https://doi.org/10.1071/BT08210>
- COLLINS, N. C.; TARDIEU, F. Y TUBEROSA, R. (2008). Quantitative Trait Loci and Crop Performance under Abiotic Stress: Where Do We Stand? *Plant physiology*, 147(2), 469–486. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118117>

- COMAS, L. H.; BECKER, S. R.; CRUZ, V. M. V.; BYRNE, P. F. Y DIERIG, D. A. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science*, 4, 442. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00442>
- DAVIDAR, P.; SNOW, A. A.; RAJKUMAR, M.; PASQUET, R.; DAUNAY, M. C. Y MUTEGI, E. (2015). The potential for crop to wild hybridization in eggplant (*Solanum melongena*; *Solanaceae*) in southern India. *American Journal of Botany*, 102(1), 129–139. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400404>
- DEL RIO, D.; STEWART, A. J. Y PELLEGRINI, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
- DEMPEWOLF, H.; EASTWOOD, R. J.; GUARINO, L.; KHOURY, C. K.; MÜLLER, J. V. Y TOLL, J. (2014). Adapting Agriculture to Climate Change: A Global Initiative to Collect, Conserve, and Use Crop Wild Relatives. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 38(4), 369–377. <https://doi.org/10.1080/21683565.2013.870629>
- DÍAZ-PÉREZ, J.C. Y EATON, T.E. (2015). Eggplant (*Solanum melongena* L.) plant growth and fruit yield as affected by drip irrigation rate. *HortScience*, 50, 1709-1714.
- DRANCA, F. Y OROIAN, M. (2017). Total Monomeric Anthocyanin, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extracts from Eggplant (*Solanum Melongena* L.) Peel Using Ultrasonic Treatments. *Journal of Food Process Engineering*, 40(1), e12312. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12312>
- FAO (2017). FAOSTAT Production Databases. Visto el 13 de junio de 2019, disponible online en: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>,
- FINI, A.; BRUNETTI, C.; FERDINANDO, M. DI, FERRINI, F. Y TATTINI, M. (2011). Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *J Plant Physiol*, 168, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.016>
- FITA, A.; FIORUCI, F.; PLAZAS, M.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. Y PROHENS, J. (2015). Drought Tolerance Among Accessions of Eggplant and Related Species. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 72(2). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:11600>
- FU, Q. S. YANG, R. C.; WANG, H. S.; ZHAO, B.; ZHOU, C. L.; REN, S. X. Y GUO, Y.D. (2013). Leaf morphological and ultrastructural performance of eggplant (*Solanum melongena* L.) in response to water stress. *Photosynthetica*, 51(1), 109–114. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0005-6>
- GOULD, K. Y LISTER, C. (2005). Flavonoid functions in plants. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 397-441. <https://doi.org/10.1201/9781420039443.ch8>
- GOUSSET, C.; COLLONNIER, C.; MULYA, K.; MARISKA, I.; ROTINO, G. L.; BESSE, P. Y SIHACHAKR, D. (2005). *Solanum torvum*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant (*S. melongena* L.). *Plant Science*, 168(2), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.034>
- GUARINO, L. Y LOBELL, D. B. (2011). A walk on the wild side. *Nature Climate Change*, 1(8), 374–375. <https://doi.org/10.1038/nclimate1272>

- CAO, G.; SOFIC, E. Y PRIOR, R. L. (1996). Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3426-3431 <https://doi.org/10.1021/JF9602535>
- GUTTERIDGE, J. M. C. (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical chemistry*, 41(12), 1819-1828. Recuperado de <http://clinchem.aaccjnl.org/content/clinchem/41/12/1819.full.pdf>
- HAJJAR, R. Y HODGKIN, T. (2007). The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 156(1-2), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9363-0>
- HALLIWELL, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- HARLAN, J. R. Y DE WET, J. M. J. (1971). Toward a Rational Classification of Cultivated Plants. *Taxon*, 20(4), 509-517. <https://doi.org/10.2307/1218252>
- HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A. S.; PICHTEL, J. Y AHMAD, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456-1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- HEATH, R. L. Y PACKER, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- HEUER, B. (2010). Role of Proline in Plant Response to Drought and Salinity. <https://doi.org/10.1201/b10329-12>
- HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F. Y PRANGE, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- HSIAO, T. C.; ACEVEDO, E.; FERERES, E. Y HENDERSON, D. W. (1976). Water Stress, Growth, and Osmotic Adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(927), 479-500. <https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0026>
- HSU, S. Y.; HSU, Y. T. Y KAO, C. H. (2003). The Effect of Polyethylene Glycol on Proline Accumulation in Rice Leaves. *Biologia Plantarum*, 46(1), 73-78. <https://doi.org/10.1023/A:1022362117395>
- HURTADO, M.; VILANOVA, S.; PLAZAS, M.; GRAMAZIO, P. Y FONSEKA, H. H. (2012). Diversity and Relationships of Eggplants from Three Geographically Distant Secondary Centers of Diversity. *PLoS ONE*, 7(7), 41748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041748>
- IPCC (2014). "Intergovernmental panel on climate change" in Proceeding of the 5th Assessment Report, WGII, Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability (Cambridge: Cambridge University Press). Visto el 17 de junio de 2019, disponible en: <http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg2/>,

- JIMENEZ, S.; DRIDI, J.; GUTIERREZ, D.; MORET, D.; IRIGOYEN, J. J.; MORENO, M. A. Y GOGORCENA, Y. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses in four Prunus rootstocks submitted to drought stress. *Tree Physiology*, 33(10), 1061–1075. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt074>
- KAUSHIK, P.; PROHENS, J.; VILANOVA, S.; GRAMAZIO, P. Y PLAZAS, M. (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*, 7, 677. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00677>
- KETCHUM, R. E. B.; WARREN, R. S.; KLIMA, L. J.; LOPEZ-GUTIÉRREZ, F. Y NABORS, M. W. (1991). The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cell cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. *Journal of Plant Physiology*, 137(3), 368–374. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80147-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80147-1)
- KIRNAK, H.; TAS, I.; KAYA, C. Y HIGGS, D. (2002). Effects of deficit irrigation on growth, yield and fruit quality of eggplant under semi-arid conditions. *Australian Journal of Agricultural Research*, 53(12), 1367. <https://doi.org/10.1071/AR02014>
- KNAPP, S.; VORONTSOVA, M. S. Y PROHENS, J. (2013). Wild Relatives of the Eggplant (*Solanum melongena* L.: *Solanaceae*): New Understanding of Species Names in a Complex Group. *PLoS ONE*, 8(2), e57039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057039>
- KOUASSI, B.; PROHENS, J.; GRAMAZIO, P.; KOUASSI, A. B.; VILANOVA, S.; GALÁN-ÁVILA, A.; PLAZAS, M. (2016). Development of backcross generations and new interspecific hybrid combinations for introgression breeding in eggplant (*Solanum melongena*). *Scientia Horticulturae*, 213, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.039>
- KURNIAWATI, S. (2014). Drought stress tolerance mechanisms of eggplant (*Solanum* spp.): physiology and molecular. Tesis de Máster. Recuperado de <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/68351>
- LEI, Y. YIN, C. Y LI, C. (2006). Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum*, 127(2), 182–191. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00638.x>
- LEIGH, R. A.; AHMAD, N. Y JONES, R. G. W. (1981). Assessment of glycinebetaine and proline compartmentation by analysis of isolated beet vacuoles. *Planta*, 153(1), 34–41. <https://doi.org/10.1007/BF00385315>
- LOBELL, D. B.; SIBLEY, A. Y IVAN ORTIZ-MONASTERIO, J. (2012). Extreme heat effects on wheat senescence in India. *Nature Climate Change*, 2(3), 186–189. <https://doi.org/10.1038/nclimate1356>
- LOVELLI, S.; PERNIOLA, M.; FERRARA, A. Y DI TOMMASO, T. (2007). Yield response factor to water (Ky) and water use efficiency of *Carthamus tinctorius* L. and *Solanum melongena* L. *Agricultural Water Management*, 92(1–2), 73–80. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2007.05.005>
- MAHAJAN, S. Y TUTEJA, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>

- MENNELLA, G.; LO SCALZO, R.; FIBIANI, M.; D'ALESSANDRO, A.; FRANCESE, G.; TOPPINO, L.; ROTINO, G. L. (2012). Chemical and Bioactive Quality Traits During Fruit Ripening in Eggplant (*S. melongena* L.) and Allied Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(47), 11821–11831. <https://doi.org/10.1021/jf3037424>
- MEYER, R. S.; KAROL, K. G.; LITTLE, D. P.; NEE, M. H.; y LITT, A. (2012). Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 685–701. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.006>
- MILLER, G.; SHULAEV, V. Y MITTLER, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133(3), 481–489. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x>
- MITTLER, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- MUNNÉ-BOSCH, S. Y ALEGRE, L. (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31(3), 203. <https://doi.org/10.1071/FP03236>
- MUNNS, R. Y TERMAAT, A. (1986). Whole-Plant Responses to Salinity. *Functional Plant Biology*, 13(1), 143. <https://doi.org/10.1071/PP9860143>
- MUÑOZ-FALCÓN, J. E.; PROHENS, J.; VILANOVA, S. Y NUEZ, F. (2009). Diversity in commercial varieties and landraces of black eggplants and implications for broadening the breeders' gene pool. *Annals of Applied Biology*, 154(3), 453–465. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00314.x>
- MUTEGI, E.; SNOW, A. A.; RAJKUMAR, M.; PASQUET, R.; PONNIAH, H.; DAUNAY, M. C. Y DAVIDAR, P. (2015). Genetic diversity and population structure of wild/weedy eggplant (*Solanum insanum*, *Solanaceae*) in southern India: Implications for conservation. *American Journal of Botany*, 102(1), 140–148. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400403>
- NAKABAYASHI, R. YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; URANO, K.; SUZUKI, M. YAMADA, Y.; NISHIZAWA, T. Y SAITO, K. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 77(3), 367–379. <https://doi.org/10.1111/tpj.12388>
- NISHA, P.; ABDUL NAZAR, P. Y JAYAMURTHY, P. (2009). A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2640–2644. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.026>
- PEKAL, A. Y PYRZYNSKA, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- PLAZAS, M.; ANDÚJAR, I.; VILANOVA, S.; GRAMAZIO, P.; HERRAIZ, F. J.; PROHENS, J. Y HANCOCK, J. (2014a). Conventional and phenomics characterization provides insight into the diversity and relationships of hypervariable scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) and gboma (*S. macrocarpon* L.) eggplant complexes. *Front Plant Sci*; 5, 318 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00318>

- PLAZAS, M.; PROHENS, J.; CUÑAT, A. N.; VILANOVA, S.; GRAMAZIO, P.; HERRAIZ, F. J. Y ANDÚJAR, I. (2014b). Reducing Capacity, Chlorogenic Acid Content and Biological Activity in a Collection of Scarlet (*Solanum aethiopicum*) and Gboma (*S. macrocarpon*) Eggplants. *Int. J. Mol. Sci*, 15, 17221–17241. <https://doi.org/10.3390/ijms151017221>
- PLAZAS, M.; VILANOVA, S.; GRAMAZIO, P.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; FITA, A.; HERRAIZ, F. J. Y PROHENS, J. (2016). Interspecific Hybridization between Eggplant and Wild Relatives from Different Genepools. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 141(1), 34–44. <https://doi.org/10.21273/JASHS.141.1.34>
- PODLICH, D. W.; WINKLER, C. R. Y COOPER, M. (2004). Mapping As You Go. *Crop Science*, 44(5), 1560. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1560>
- POLLASTRI, S. Y TATTINI, M. (2011). Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany*, 108(7), 1225–1233. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr234>
- RAHMA, N. A. F. (2016). Screening for Drought Tolerance in Eggplants relatives and Interspecific Hybrids (*Solanum* spp.). Tesis de Máster. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/68707/RAHMA>
- RANIL, R. H. G.; PROHENS, J.; AUBRIOT, X.; NIRAN, H. M. L.; PLAZAS, M.; FONSEKA, R. M. Y KNAPP, S. (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), 1707–1722. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0467-z>
- RANIL, R. H. G.; NIRAN, H. M. L.; PLAZAS, M.; FONSEKA, R. M.; FONSEKA, H. H.; VILANOVA, S. Y PROHENS, J. (2015). Improving seed germination of the eggplant rootstock *Solanum torvum* by testing multiple factors using an orthogonal array design. *Scientia Horticulturae*, 193, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.030>
- RAY, D. K.; MUELLER, N. D.; WEST, P. C. Y FOLEY, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE*, 8(6), e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
- ROXAS, V. P.; SMITH, R. K.; ALLEN, E. R. Y ALLEN, R. D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathioneperoxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology*, 15(10), 988–991. <https://doi.org/10.1038/nbt1097-988>
- SAED-MOUCHESHI, A.; SHEKOOFA, A. Y PESSARAKLI, M. (2014). Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 37(10), 1573–1585. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.868483>
- SARKER, B. C.; HARA, M. Y UEMURA, M. (2004). Comparison of response of two C3 species to leaf water relation, proline synthesis, gas exchange and water use under periodic water stress. *Journal of Plant Biology*, 47(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/BF03030225>
- SARKER, B. C.; HARA, M. Y UEMURA, M. (2005). Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. *Scientia Horticulturae*, 103(4), 387–402. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2004.07.010>
- SILVENTE, S.; SOBOLEV, A. P. Y LARA, M. (2012). Metabolite Adjustments in Drought Tolerant and Sensitive Soybean Genotypes in Response to Water Stress. *PLoS ONE*, 7(6), e38554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038554>

- SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P. Y PRASAD, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 407–426. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8>
- SINGLETON, V. L. Y ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. Recuperado de <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- SYFERT, M. M.; CASTAÑEDA-ÁLVAREZ, N. P.; KHOURY, C. K.; SÄRKINEN, T.; SOSA, C. C.; ACHICANOY, H. A. Y KNAPP, S. (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*, 103(4), 635–651. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500539>
- TAKAHASHI, M. Y ASADA, K. (1988). Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(2), 714–722. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90080-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90080-X)
- TANI, E.; KIZIS, D.; MARKELLOU, E.; PAPADAKIS, I.; TSAMADIA, D.; LEVENTIS, G. Y KARAPANOS, I. (2018). Cultivar-Dependent Responses of Eggplant (*Solanum melongena* L.) to Simultaneous *Verticillium dahliae* Infection and Drought. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1181. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01181>
- TREUTTER, D. (2005). Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581–591. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873009>
- VERBRUGGEN, N. Y HERMANS, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35(4), 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- VORONTSOVA, M. S.; STERN, S.; BOHS, L. Y KNAPP, S. (2013). African spiny *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae): a thorny phylogenetic tangle. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173(2), 176–193. <https://doi.org/10.1111/boj.12053>
- WANG, W.; VINO CUR, B. Y ALTMAN, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- WEESE, T. L. Y BOHS, L. (2010). Eggplant Origins: Out of Africa, into the Orient. *Taxon*, 59, 49–56. <https://doi.org/10.2307/27757050>
- WEESE, T. L. Y BOHS, L. (2007). A Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 32(2), 445–463. <https://doi.org/10.1600/036364407781179671>
- WINKEL-SHIRLEY, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218–223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
- World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100 | UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs. (2017). Visto el 16 de junio de 2019, de <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html>
- YLSTRA, B.; TOURAEV, A.; MARIA, R.; MORENO, B.; STOGER, E.; VAN TUNEN, A. J. Y HEBERLE-BORS, E. (1992). Flavonols Stimulate Development, Germination, and Tube Growth of Tobacco Pollen. *Plant Physiol*, 100, 902–907. <https://doi.org/10.1104/pp.100.2.902>

- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T. Y JIANMING, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- ZHU, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- ZIMMERMANN, P. Y ZENTGRAF, U. (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & molecular biology letters*, 10(3), 515-34. Recuperado de <http://www.cmbl.org.pl>