



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Regulación genética de la coloración del Fruto de
Berenjena

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Toledo Garcia, Maria Dolores

Tutor/a: Vilanova Navarro, Santiago

Cotutor/a externo: Gomis Cebolla, Joaquín

Director/a Experimental: Manrique Urpí, Silvia

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

MÁSTER EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Autora:

María Dolores Toledo García
Curso 2022/2024



Tutor: Dr. Santiago Vilanova Navarro

Primer tutor externo: Dr. Joaquín Gomis Cebolla

Director experimental: Dra. Silvia Manrique Urpi

Valencia, julio 2024.

RESUMEN

La coloración del fruto de la berenjena es un aspecto de gran interés en mejora por su relevancia nutricional, e incluye tanto el reticulado verde como la presencia o ausencia de antocianinas. En esta investigación, se han explorado los factores de transcripción de las familias GOLDEN2-LIKE (GLK) y MYB, y su implicación en la regulación de estos caracteres en la berenjena.

Los resultados muestran la implicación de GLK2 en el reticulado verde del fruto y han clarificado el papel de distintos genes de la familia MYB en la síntesis de antocianinas en la piel del fruto. Se ha estudiado el efecto de las mutaciones presentes en variedades con distintos fenotipos en cuanto a coloración, alcanzando una mejor comprensión de la regulación genética de estos caracteres en berenjena.

Este estudio proporciona una visión integral de los genes reguladores que controlan la coloración del fruto de berenjena y contribuye al avance en la comprensión de la biología molecular de este cultivo.

Palabras clave: berenjena; reticulado; antocianinas; *GLK2*; *MYB113*

ABSTRACT

The coloration of eggplant fruit is a major area of interest in breeding due to its nutritional relevance. It includes both the green netting and the presence or absence of anthocyanins. In this research, transcription factors from the GOLDEN2-LIKE and MYB families and their involvement in the regulation of these traits in eggplant were explored.

The results show the involvement of GLK2 in the green netting of the fruit and have clarified the role of different genes in the MYB family in the synthesis of anthocyanins in the fruit's skin. The effect of mutations present in varieties with different phenotypes regarding coloration was studied, leading to a better understanding of the genetic regulation of these traits in eggplant.

This study provides a comprehensive view of the regulatory genes controlling the coloration of eggplant fruit and contributes to advancing the understanding of the molecular biology of this crop.

Keywords: eggplant; netting; anthocyanins; GLK2; MYB113

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	La coloración en el fruto de berenjena: interés y relevancia nutricional.....	1
1.1.1.	El reticulado verde.....	3
1.1.1.1.	Factores de transcripción de la familia GOLDEN2-LIKE: función y relevancia.....	4
1.1.2.	Antocianinas en la piel de fruto en berenjena.....	4
1.1.2.1.	La red molecular que controla la síntesis de antocianinas en berenjena.....	5
1.1.2.2.	Factores de transcripción de la familia MYB.....	5
1.1.2.3.	Síntesis de antocianinas independiente de la luz en berenjena (PUC).....	6
2.	OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1.	Material vegetal y tratamientos.....	7
3.2.	Cepas (bacterias y levaduras).....	7
3.3.	Medios utilizados en este trabajo.....	8
3.4.	Cebadores.....	8
3.5.	Métodos para la extracción y análisis de ácidos nucleicos.....	9
3.5.1.	Extracción de DNA plasmídico.....	9
3.5.2.	Extracción RNA.....	10
3.5.3.	Retrotranscripción de ARN.....	10
3.5.4.	PCR semi-cuantitativa.....	11
3.6.	Métodos de clonaje.....	15
3.6.1.	Clonaje Gibson Assembly.....	15
3.6.2.	Clonaje TOPO-TA.....	16
3.6.3.	Gateway.....	17
3.7.	Métodos para el análisis de la interacción de proteínas mediante ensayos de doble híbrido.....	18
3.7.1.	Preparación de células competentes de levadura.....	18
3.7.2.	Transformación de levaduras.....	18
3.7.3.	Análisis de la interacción proteica mediante ensayos de doble híbrido.....	19
4.	RESULTADOS.....	19
4.1.	Implicación de <i>GLK2</i> en el reticulado verde del fruto.....	19
4.1.1.	Expresión de genes de la familia GOLDEN2-LIKE en diferentes tejidos de berenjena.....	19
4.1.2.	Clonaje de los alelos wt y mutantes de <i>GLK2</i>	20
4.1.3.	Dimerización de <i>GLK2</i> asociada con su función.....	23
4.2.	Implicación de <i>MYB113</i> en la síntesis de antocianinas en piel de fruto y fotoinsensibilidad.....	26
4.2.1.	Efectos en la piel de las berenjenas del tratamiento de embolsado y desembolsado.....	26
5.	DISCUSIÓN.....	29
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	31
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	32
8.	ANEXO I.....	36
8.1.	RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción y superficie cultivada de berenjena en el mundo desde 1994 hasta 2022.	1
Figura 2. Producción de berenjena por FAOSTAT (FAO, 2023).....	2
Figura 3. Apariencia de frutas de berenjena en presencia (FN) o ausencia (FN) de la red de verde.....	3
Figura 4. Análisis de parsimonia de la superfamilia de genes <i>GARP</i> para ver las relaciones entre genes <i>GLK</i> . Se muestra la existencia de un subgrupo de genes <i>GLK</i> (65), dentro de la superfamilia <i>GARP</i>	4
Figura 5. Ejemplo de embolsado para los ensayos de síntesis de antocianinas independiente de la luz de berenjena, de la variedad ASI-S-1 en el invernadero de la UPV.....	7
Figura 6. Cálculo de la masa requerida del inserto de DNA con la aplicación NEBuilder.....	16
Figura 7. Gel electroforético al 2% para ver la expresión en diferentes tejidos de <i>S.insanum</i> de genes de la familia GOLDEN2-like. PCR BIO Taq con los cebadores <i>GLK1</i> RT y <i>GLK2</i> RT.....	20
Figura 8. Gel de electroforesis al 1% para amplificar los alelos <i>glk2-mut</i> y <i>GLK2-wt</i> de las muestras de ASI-S-1 y <i>S.insanum</i> , respectivamente.	21
Figura 9. Gel de agarosa al 2% usando como marcador (M) <i>FastGene</i> 100pb, de la PCR BIO Taq de las 7 colonias, con cebadores GW1 y GW2	22
Figura 10. Gel agarosa al 1% de los resultados de la 2x PCR BIO <i>High fidelity</i> para amplificar el fragmento de <i>Glk2-mut</i> insertado en el vector pCR8/GW/TOPO de la colonia 4, con los cebadores del <i>Gibson cloning</i> , <i>gcGLK2</i>	22
Figura 11. Gel de agarosa al 1% de los resultados de la PCR BIO Taq utilizando como cebador <i>forward</i> promotor T7 y <i>reverse</i> TOPO <i>GLK2</i>	23
Figura 12. Placas YPDA+ X-Gal	25
Figura 13. Ensayos de auxotrofia en la biosíntesis de His y Ura	26
Figura 14. Geles de electroforesis de agarosa al 1% teñido con <i>GreenSave</i> de la amplificación del cDNA.....	27
Figura 15. Variedades de ASI-S-1.....	27
Figura 16. Geles de electroforesis de agarosa al 2% teñido con <i>GreenSave</i> para ver la expresión de los parálogos del <i>MYB113</i>	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados en el análisis de PCR.....	9
Tabla 2. Reactivos empleados en la reacción de síntesis de cDNA a partir de las muestras de RNA, junto con las cantidades utilizadas.	11
Tabla 3. Componentes y condiciones (2) de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores <i>GLK1</i> RT, <i>GLK2</i> RT y <i>TIP41</i> , siendo f (<i>forward</i>) y r (<i>reverse</i>).....	11
Tabla 4. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq empleando los cebadores TOPO <i>GLK2</i> f (<i>forward</i>) y r (<i>reverse</i>).	12
Tabla 5. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores del Vector TOPO: GW1 (<i>forward</i>) y GW2 (<i>reverse</i>).	12
Tabla 6. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores del <i>Gibson Cloning</i> , gc- <i>GLK2</i> f (<i>forward</i>) y gc- <i>GLK2</i> r (<i>reverse</i>).....	12
Tabla 7. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando como cebador <i>forward</i> , T7 promotor y como <i>reverse</i> , TOPO <i>GLK2</i> r.....	13
Tabla 8. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores TOPO <i>MYB-113</i> del chr 10; TOPO <i>MYB113</i> -chr 10 f (<i>forward</i>) y TOPO <i>MYB113</i> -chr 10 r (<i>reverse</i>).....	13
Tabla 9. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores <i>GADPH</i> f (<i>forward</i>) y r (<i>reverse</i>).	13
Tabla 10. Componentes y condiciones (1) de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores <i>MYB113</i> -chr 1 RT, <i>MYB113</i> -chr 10 RT y <i>TIP41</i> , siendo f (<i>forward</i>) y r (<i>reverse</i>).	14
Tabla 11. Componentes y condiciones (2) de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores <i>MYB113</i> -chr 1 RT, <i>MYB113</i> -chr 10 RT y <i>TIP41</i> , siendo f (<i>forward</i>) y r (<i>reverse</i>).	15
Tabla 12. Descripción de los componentes utilizados en la digestión del vector pet51b+ junto con los volúmenes necesarios.....	15
Tabla 13. Descripción de los componentes utilizados en la reacción de <i>Gibson Assembly</i> junto con los volúmenes necesarios.....	15
Tabla 14. Componentes junto con sus respectivas cantidades para la reacción de recombinación LR para la creación de los plásmidos <i>Bait</i> (utilizando el vector pDEST TM 32) y <i>Prey</i> (utilizando el vector pDEST TM 22).	17
Tabla 15. Componentes para un análisis de restricción con la enzima EcoRI de las colonias transformadas con pEXP22 y pEXP32.....	18
Tabla 16. Controles de las transformaciones e interacciones de los plásmidos descritos, en las células de levadura MaV203.	19
Tabla 17. Cuantificación en NanoDrop del RNA (ng/μl) en muestras extraídas de plántula, hojas jóvenes, raíces, flores y frutos de <i>S.insanum</i>	20
Tabla 18. Concentraciones del DNAP aislado de las 4 colonias que insertaron el vector pet51b(+) con el inserto <i>Glk2-mut</i>	23
Tabla 19. Cuantificación de los vectores obtenidos pEXP TM 32 y pEXP TM 22 tras la reacción de recombinación LR, con el inserto del gen <i>glk2-mut</i> y <i>GLK2-wt</i>	24
Tabla 20. Cuantificación de los vectores obtenidos de las colonias 1 de cada pEXP TM 32 y pEXP TM 22 con el inserto del gen <i>glk2-mut</i> y <i>GLK2-wt</i>	24
Tabla 21. Grado de relación del trabajo final de máster con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La coloración en el fruto de berenjena: interés y relevancia nutricional

La berenjena común (*Solanum melongena L.*, $2n = 2x = 24$) pertenece a la familia de las solanáceas, una extensa familia de plantas que abarca más de 3000 especies y que incluye cultivos de gran relevancia como el tomate, la patata, el pimiento y el tabaco (Hirakawa *et al.*, 2014). Más concretamente, la berenjena es el segundo cultivo en importancia de bayas de la familia de las solanáceas, superado solo por el tomate (Eich, 2008). No obstante, la investigación predominante se enfoca en otros cultivos del mismo género, como el tomate y la patata. Por tanto, es necesario aumentar los estudios en este cultivo específico (Gramazio *et al.*, 2019).

La producción mundial de berenjena fue de 59,312,599 toneladas, obtenidas en una superficie cosechada de 1,892,798 hectáreas (Figura 1), por lo que el rendimiento promedio quedó en 31.34 toneladas por hectárea, según la información presentada en FAOSTAT para el año 2022 (FAO, 2023).

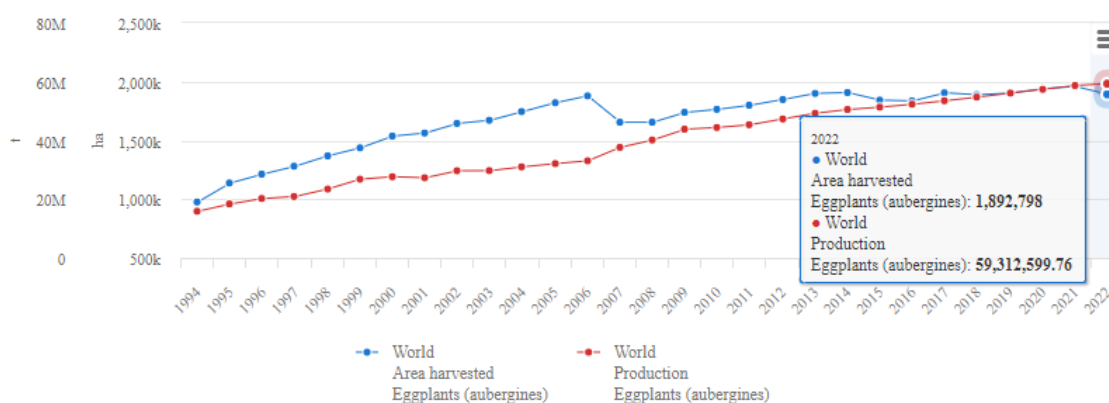


Figura 1. Producción y superficie cultivada de berenjena en el mundo desde 1994 hasta 2022. Fuente: FAOSTAT (FAO, 2023) <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.

Para esta fecha, 2022, China Continental fue el principal productor de berenjena en el mundo con 22,752,933 toneladas (38.3%), seguido por India con 9,994,200 toneladas (16.9%) y Egipto con 1,031,743 toneladas (1.7%) (Figura 2), por lo que estas 3 naciones representaron el 56.9% de la producción mundial (FAO, 2023).

Las exportaciones mundiales totales de berenjena en 2022, ascendieron a 439,71 millones de kilogramos, por un valor de 541,95 millones de euros, con un precio medio de 1,23 euros el kilogramo, siendo España la que encabeza la lista de países exportadores mundiales de berenjena, con un volumen total de 146,12 millones de kg (el 33,23% del total), seguida de México con 83,39 millones de kg, Países Bajos con 61,85 millones de kg, Turquía con 26,7 millones de kg y Estados Unidos, que exportó 22,95 millones de kg de berenjena (Hortoinfo, 2023).

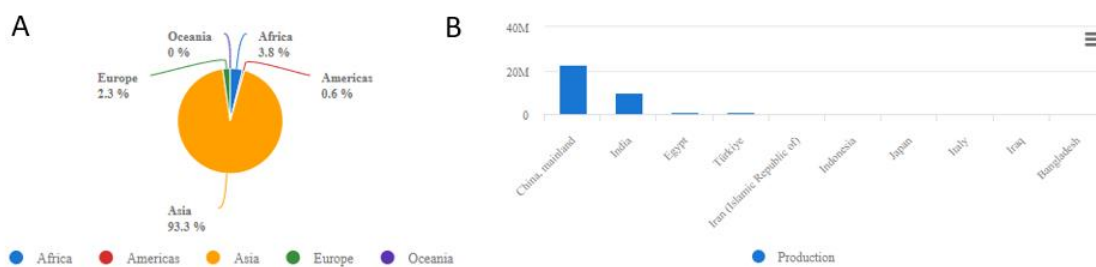


Figura 2. Producción de berenjena por FAOSTAT (FAO, 2023). (A) Porcentaje de producción de berenjena repartido en cada continente. (B) Top 10 productores mundiales de berenjena.

S. melongena se distingue de sus ancestros silvestres principalmente por el color y la forma de su fruto, ya que las variedades cultivadas presentan una gama de colores que va desde el púrpura oscuro hasta el negro, incluyendo algunas de color verde y blanco, frutos notablemente más grandes y formas más diversas (Swarup, 1995).

En términos de valor nutricional, la berenjena destaca por su bajo contenido calórico y es reconocida como uno de los vegetales más beneficiosos para la salud debido a su elevada concentración de vitaminas, minerales y su variada composición de compuestos bioactivos, incluyendo fenoles, carotenoides y glicoalcaloides (Taher *et al.*, 2017). Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides, con efecto hipolipidémico (Sudheesh *et al.*, 1997), son los más significativos en la berenjena, presentando diferentes perfiles en hojas y los frutos (Huang *et al.*, 2007), destacando las antocianinas y los taninos en la piel, cuyo contenido duplica el presente en los tomates (Alkurd, Takruri and Al-Sayyed, 2008) y el ácido clorogénico en la carne del fruto.

Por otro lado, los carotenoides son pigmentos utilizados en la industria alimentaria como colorantes. Además presentan beneficios para la salud, como la prevención de la degeneración macular y las cataratas, destacando la luteína y zeaxantina (Benke and Benke, 2014). Además, en la berenjena, se han identificado dos glicoalcaloides esteroideos (SGA) principales: α -solamargina y α -solasonina (Blankemeyer *et al.*, 1998), los cuales han mostrado potencial en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de hígado (Ding *et al.*, 2013), leucemia (Sun *et al.*, 2011), entre otros. Además de sus propiedades anticancerígenas, también se ha documentado su actividad antiparasitaria en la literatura científica (Lezama-Dávila *et al.*, 2016). En el estudio de Meyer *et al.*, se registraron 77 propiedades medicinales para berenjenas que indican la importancia de esta planta como alimento funcional y en la industria de productos naturales (Meyer *et al.*, 2014). Debido a su gran poder antioxidante, y a estos beneficios significativos para la salud humana, ha ganado un creciente interés (Gajewski, Katarzyna and Bajer, 2009).

La coloración de la piel del fruto, la cual varía desde tonos blancos y verdes hasta distintos tonos púrpuras, constituye un rasgo de relevancia económica en la berenjena. Sin embargo, la razón por la cual se forman diferentes colores no se comprende con claridad (Zhou *et al.*, 2022), aunque está determinada por la cantidad y la composición de antocianinas y clorofila, principalmente (Zhou *et al.*, 2021).

Más concretamente, las antocianinas son las responsables de la coloración púrpura en la piel de la berenjena, mientras que la clorofila aporta el color verde, el cual se hace visible en ausencia de antocianinas o cuando su concentración es muy baja. En caso de estar presentes, las antocianinas son complementadas por la clorofila, lo que intensifica el color púrpura del fruto (Daunay *et al.*, 2004).

1.1.1. El reticulado verde

La piel del fruto de berenjena (*S. melongena*) puede presentar una distribución uniforme de clorofila. Adicionalmente, pueden presentar también un patrón de red verde irregular, conocido como reticulado o *netting* (Tigchelaar, Janick and Erickson, 1968). Sus ancestros silvestres presentaban este fenotipo de reticulado, que se muestra como un gradiente de redes de color verde oscuro, más intenso en la parte proximal de la fruta sobre un fondo verde más pálido (Figura 3). A lo largo del proceso de domesticación y mejora moderna de las berenjenas, se ha preferido seleccionar un color uniforme para el fruto. No obstante, la recuperación de variedades de frutos con reticulado verde, ha incrementado la diversidad cromática de esta especie y puede tener relevancia en su contenido nutricional (Arrones *et al.*, 2023).

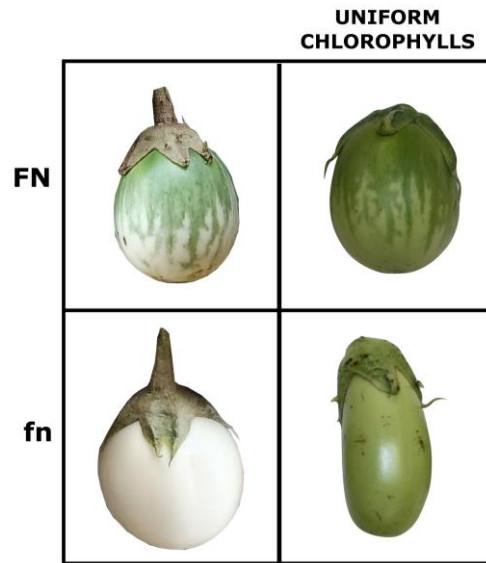


Figura 3. Apariencia de frutas de berenjena en presencia (FN) o ausencia (FN) de la red de verde.
Fuente: Arrones *et al.*, 2023, bajo licencia internacional CC-BY-NC-ND 4.0.

Este carácter evoca al rasgo, descrito en tomate, de hombros verdes, cuyo control es monogénico dominante, concretamente por el locus de maduración uniforme (U) (Arrones *et al.*, 2023). Durante 70 años, los mejoradores han seleccionado tomates en contra de este carácter (genotipo u/u), ya que facilita la determinación de madurez y su cosecha. No obstante, estos frutos alcanzan la madurez con un contenido reducido de azúcares, lo cual puede afectar negativamente a los productos procesados y al propio sabor de la fruta fresca (Powell *et al.*, 2012). Posteriormente se determinó que dicho locus correspondía al gen *GLK2*.

Los primeros mapas genéticos de la berenjena, revelaron que varios rasgos cuantitativos (QTL) relacionados con la domesticación de esta planta se ubicaban en las mismas regiones genómicas que los de especies como el tomate, el pimiento y la patata (Chapman, 2019). Considerando esto, es posible que *GLK2* sea responsable del *netting* también en berenjena y que un mecanismo de selección similar haya ocurrido en este cultivo donde las especies silvestres presentan *netting* mientras que la mayor parte de las cultivadas no (Arrones *et al.*, 2023), y efectivamente, el estudio genético de Arrones *et al.*, 2023 sugiere que el gen subyacente al fenotipo de *netting* en los frutos de berenjena es el *SmGLK2* (*S. melongena* Golden2-like 2), el cual, en la variedad utilizada para producir el genoma de referencia (MEL1) (sin *netting*) presenta una mutación en la región codificante de *GLK2* que determina la formación de un codón stop prematuro (Chapman, 2019), (Arrones *et al.*, 2023).

1.1.1.1. Factores de transcripción de la familia GOLDEN2-LIKE: función y relevancia

Los genes *GLK* comprenden un grupo distinto, dentro de la superfamilia *GARP*, de factores de transcripción (Figura 3), cuya función es regular el desarrollo de los cloroplastos en distintas especies mediante su unión al DNA generalmente formando dímeros (Fitter *et al.*, 2002). Al igual que en la mayoría de especies de plantas, el genoma del tomate contiene dos copias del gen *GLK*, denominadas *SIGLK1* y *SIGLK2*. *SIGLK1* presenta expresión principalmente en cotiledones, sépalos y hojas y *SIGLK2*, predominantemente en los frutos, dando lugar al conocido fenotipo de hombro verde (Lupi *et al.*, 2019), el cual se perdió durante la domesticación, como bien mencioné anteriormente, por la fijación de un alelo codificante de *SIGLK2* truncado no funcional (*Slglk2*). La sobreexpresión de *SIGLK2* a lo largo del fruto en el fondo mutante ha mostrado promover tanto el metabolismo de azúcares como de carotenoides en tomate (Powell *et al.*, 2012). De este modo, un desarrollo adecuado de los cloroplastos en el fruto es necesario para obtener una alta calidad nutricional, ya que no solo afecta al contenido de fotoasimilados, sino además al de metabolitos secundarios (Lupi *et al.*, 2019).

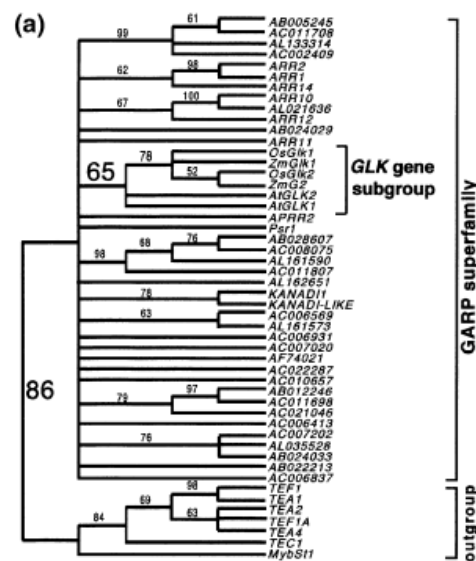


Figura 4. Análisis de parsimonia de la superfamilia de genes *GARP* para ver las relaciones entre genes *GLK*. Se muestra la existencia de un subgrupo de genes *GLK* (65), dentro de la superfamilia *GARP*. Fuente: Fitter *et al.*, 2002.

1.1.2. Antocianinas en la piel de fruto en berenjena

Las antocianinas, que representan un gran grupo de metabolitos secundarios de plantas, son pigmentos polifenólicos pertenecientes a la familia de los flavonoides, y son las responsables de la amplia gama de colores que va del rojo-naranja al azul-violeta en diversas partes de las plantas, como hojas, flores y frutos (Wallace, T. C., & Giusti, 2015).

Se ha sugerido que su ingesta prolongada o de los propios alimentos que las contienen, puede ofrecer diversos beneficios para la salud humana por sus propiedades antioxidantes, ya que los seres humanos no producen niveles de enzimas antioxidantes suficientemente elevados para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por los procesos metabólicos celulares. Por ello, es necesario obtener antioxidantes a través de la dieta (Lobo *et al.*, 2010).

Las plantas tienen la capacidad de sintetizar diversos antioxidantes y muchas de ellas son particularmente ricas en estos compuestos. En este contexto, la berenjena destaca por su capacidad

antioxidante, situándose entre las diez mejores de 120 vegetales diferentes (Nisha, Abdul Nazar and Jayamurthy, 2009). Entre estos beneficios se encuentran la neuroprotección y la protección cardiovascular, la mejora de la visión, propiedades antidiabéticas y antiobesidad, efectos antiinflamatorios, así como la prevención y protección contra el cáncer (Pojer *et al.*, 2013).

En la berenjena, las antocianinas se concentran en la piel del fruto, pudiendo variar desde 80 hasta 850 mg/kg de piel, dependiendo de factores agronómicos y genéticos, así como la intensidad y tipo de luz, temperatura, procesamiento y almacenamiento (Dranca and Oroian, 2016). Cabe destacar, los glucósidos de delphinidina, por ser una de las principales antocianinas de la piel de berenjenas, proporcionando un color púrpura oscuro (Gürbüz *et al.*, 2018). Más concretamente, los dos tipos de antocianinas que dominan en las berenjenas moradas son delphinidina-3-rutinosido (D3R) y la nasunina (Toppino *et al.*, 2016).

1.1.2.1. La red molecular que controla la síntesis de antocianinas en berenjena

La concentración de antocianinas está regulada por el equilibrio entre los procesos de biosíntesis y degradación (Liu *et al.*, 2018). La regulación de la biosíntesis de antocianinas en las plantas ocurre principalmente a nivel de la expresión de los genes reguladores y estructurales involucrados en este proceso, ya sea induciéndolos o reprimiéndolos (Liu *et al.*, 2018). Los genes estructurales, codifican las enzimas que catalizan cada paso de la biosíntesis, y se dividen en genes de biosíntesis temprana (EBG) y genes de biosíntesis tardía (LBG) (Dubos *et al.*, 2010). En cambio, los genes reguladores codifican factores de transcripción que controlan la expresión de los genes estructurales (Gonzali, Mazzucato and Perata, 2009).

Dentro de los EBG, los genes comunes de la vía de flavonoides, chalcona sintasa (*CHS*), chalcona isomerasa (*CHI*) y Flavanona 3-Hidroxilasa (*F3H*), están involucrados en la biosíntesis de todos los flavonoides. En la berenjena, se informó un nivel de expresión de *SmCHS* significativo en cultivares con frutos negros o violeta, en comparación con los mutantes verdes o blancos (Stommel and Dumm, 2015). Y en cuanto a los LBG, se requieren *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS* y *UFGT* para la biosíntesis de clases específicas de flavonoides, y, por tanto, para antocianinas. Para la berenjena, Stommel and Dumm, 2015, reportaron que los niveles de expresión de *SmDFR* y *SmANS* fueron significativamente más altos en cultivares con frutos negros o violeta en comparación con los genotipos verdes o blancos, en todas las etapas del desarrollo del fruto.

Estos genes estructurales, que participan en la vía biosintética de las antocianinas, están bajo el control de un complejo regulador llamado MYB-bHLH-WD40 (MBW), el cual está formado por proteínas de las familias MYB, bHLH (hélice-bucle-hélice básica) y WD40 (Liu *et al.*, 2018). Dentro de este complejo, los factores de transcripción MYB desempeñan un papel crucial en la activación o represión de los genes estructurales. Las proteínas bHLH modulan la actividad de las proteínas MYB el factor de transcripción BHLH para mejorar esa activación, y por último, las proteínas WD40, tienen como función estabilizar la estructura del complejo (Li *et al.*, 2023).

1.1.2.2. Factores de transcripción de la familia MYB

Los miembros de la familia de proteínas nucleares MYB funcionan como reguladores transcripcionales, y están altamente conservados en la evolución (Santiago Jimenez, 2012). Se distinguen por poseer un dominio N-terminal conocido como dominio MYB, que consiste en 1 a 3 repeticiones imperfectas de aproximadamente 52 aminoácidos cada una (denominadas R1, R2 y R3). Este dominio MYB participa en la unión al ADN y la dimerización, mientras que la región C-terminal se encarga de regular la expresión del gen objetivo, actuando ya sea como activador o represor (Hichri *et al.*, 2011).

Los MYB relacionados con la síntesis de antocianinas son principalmente R2R3-MYB y R3 MYB (Li *et al.*, 2022). Gracias a ensayos de sobreexpresión, se sabe que *SmMYB113* juega un papel

importante en la regulación de la biosíntesis de antocianinas en la berenjena. Más concretamente, su sobreexpresión favoreció la acumulación de antocianinas en el exocarpo y mesocarpo de las berenjenas (Yang *et al.*, 2022), (Zhang *et al.*, 2014).

Se ha reportado que *SmMYB113* regula la expresión de los genes *SmCHS* y *SmDFR* (Jiang *et al.*, 2016). No obstante, las enzimas codificadas por estos genes no participan directamente en la síntesis de las antocianinas mayoritarias en berenjena, cianidinas y delfinidinas. Por consiguiente, el mecanismo molecular que determina la variación de color en la berenjena sigue siendo desconocido (Li *et al.*, 2023).

1.1.2.3. Síntesis de antocianinas independiente de la luz en berenjena (PUC)

La biosíntesis de antocianinas en las plantas está influenciada por diversos factores ambientales, incluyendo la luz y la temperatura, siendo la luz el más significativo (Ma *et al.*, 2021). A pesar de que la luz es uno de los factores ambientales cruciales para la síntesis de antocianinas en la berenjena, en ocasiones, la producción de antocianinas puede continuar incluso en ausencia de luz (He *et al.*, 2019). La luz insuficiente, frecuentemente resulta en una coloración deficiente de la fruta, lo que se traduce en una calidad inferior. Es por esto, que la selección de variedades de berenjena fotoinsensibles es de suma importancia (Li *et al.*, 2022).

Por esto, las berenjenas se pueden clasificar en fenotipos fotosensibles y fotoinsensibles (Honda *et al.*, 2012). En las berenjenas fotosensibles, la biosíntesis de antocianinas en la piel depende estrictamente de la luz, y, por tanto, en oscuridad (p.e. cuando se embolsan los frutos), no pueden acumular estas moléculas (Liu *et al.*, 2017b; Jiang *et al.*, 2016b; Honda *et al.*, 2012). En contraste, las berenjenas fotoinsensibles son capaces de sintetizar antocianinas en condiciones de oscuridad, aunque el contenido de éstas se reduce aproximadamente en un 20% (He *et al.*, 2019).

Con respecto a esto, se han localizado varios loci de caracteres cuantitativos (QTLs) que controlan el carácter de fotoinsensibilidad, también denominado PUC (de “*purple under calix*”) en berenjenas en el cromosoma 1 y 10 (Qiao J, Liu J, Li S, 2022), (Mangino *et al.*, 2022). Además, en ensayos previos realizados en el laboratorio del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universidad Politécnica de Valencia, a partir de cruzamientos entre la variedad ASI-S-1 (fotosensible) e IVIA-371 (fotoinsensible), se identificaron varios picos principales en estos dos cromosomas para este rasgo (Gomis-Cebolla *et al.*, en preparación).

2. OBJETIVOS

La finalidad general de este trabajo es la investigación y análisis de distintos factores de transcripción implicados en la regulación de la coloración del fruto en berenjena, y alcanzar una mejor comprensión del mecanismo molecular detrás de estos caracteres, que sigue sin conocerse en berenjena. En concreto, esto se ha traducido en dos objetivos:

1. La implicación del factor de transcripción de la familia GOLDEN2-LIKE, *GLK2* en el reticulado verde del fruto y el estudio de su mecanismo de acción, utilizando variedades con distintos fenotipos.

2. La caracterización del papel de distintos factores de transcripción de la familia MYB, en la acumulación de antocianinas independientemente de la luz en la piel del fruto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y tratamientos

Para el clonaje de la versión silvestre de *GLK2* y el análisis del carácter del reticulado verde, se utilizaron muestras de plántula, hojas jóvenes, raíces, flores y frutos de la especie silvestre *Solanum insanum*, pariente cercano de *S. melongena*, que presenta reticulado verde. Para los diferentes ensayos se seleccionaron dos variedades cultivadas de *S. melongena*, ASI-S-1 (fotosensible) e IVIA-371 (fotoinsensible). En ambos casos, las semillas germinaron en placas de Petri y se transfirieron a semilleros en una cámara climática con 16 horas de luz diarias a 22 ± 2 °C. Las plántulas crecieron durante 4 semanas, hasta la quinta hoja verdadera, y luego se aclimataron durante 48 horas en el invernadero.

Posteriormente, se trasplantaron a macetas de 15 L y se cultivaron en un invernadero libre de polinizadores en la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Las plantas se espaciaron a 1,2 m entre filas y 1 m dentro de las filas, se fertilizaron mediante riego por goteo. La poda se realizó manualmente para regular el crecimiento y la floración, y los tratamientos fitosanitarios se aplicaron según fue necesario. Se recolectaron muestras de las plántulas, sus hojas y raíces, flor cerrada y, por último, los frutos, de los que obtuvimos finas láminas de su piel, para determinar la expresión génica específica del tejido.

Para los estudios de PUC, el experimento de embolsado de los frutos incluyó tres tratamientos: embolsado, utilizando bolsas de papel impermeables, que cubrían las flores después de la antesis (Figura 4); desembolsado, retirando las bolsas después de 10 días; y control, en el cual los frutos no fueron embolsados en ningún momento. La piel de los frutos se recogió a las 0 h, 4 h y 1 día después de la eliminación de las bolsas. Todo el material vegetal recién recolectado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenó a -80°C hasta su uso.



Figura 5. Ejemplo de embolsado para los ensayos de síntesis de antocianinas independiente de la luz de berenjena, de la variedad ASI-S-1 en el invernadero de la UPV.

3.2. Cepas (bacterias y levaduras)

Para la transformación con las reacciones de recombinación LR con pDEST, se utilizaron volúmenes de 50 μ l de células *Escherichia coli* químicamente competentes *OneShot TOP10* de *ThermoFisher*, con una eficacia de transformación de 1×10^9 ufc/ μ g de ADN plasmídico.

Para la transformación de los productos del ensamblaje Gibson se utilizaron las células *E. coli* competentes NEB® 5-alpha proporcionadas por el kit de clonación *Gibson Assembly* de BioLabs.

Para los ensayos de doble híbrido, se utilizó la cepa de levadura MaV203, proporcionado por el kit de Invitrogen™, ProQuest™ *Two-Hybrid System* con tecnología Gateway™.

3.3. Medios utilizados en este trabajo

Para los ensayos de *Yeast Two Hybrid*, se utilizó un medio sintético (SC), que consiste en una base de nitrógeno, una fuente de carbono y una solución de *dropout* que contiene aminoácidos esenciales, ácidos nucleicos, oligoelementos y vitaminas. Para fines de selección, omitimos ciertos aminoácidos (leucina, triptófano, histidina) y la base nitrogenada (uracilo).

Con el objetivo de elaborarlo, en primer lugar, preparamos una solución de glucosa al 40%, la cual fue autoclavada posteriormente y una de uracilo 20 mM, histidina-HCL y de leucina 100 mM y de triptófano 40 mM, las cuales fueron esterilizadas mediante filtración en condiciones de esterilidad. A continuación, se preparó una mezcla de purina y aminoácidos en pesos iguales (unos 2–3 g para cada compuesto).

Proseguimos con la preparación del medio líquido, suspendiendo 13,4 g de una base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y 1,35 g de la mezcla de polvo de aminoácidos en 1L de agua destilada y ajustando el pH a 5,9 y, por otro lado, del medio de agar, añadiendo 40 g de agar en 900 ml de agua destilada, ambos se autoclavarón por 20 min.

Una vez terminado, se vertió el contenido del matraz que contiene agar en el matraz que contiene medio y se atemperó en un baño de agua a 50 °C durante aproximadamente 1 hora, para poder agregar así 100 ml de glucosa al 40%. Paralelamente, para la preparación y transformación de las células competentes MaV203, se preparó el medio YPAD, cuyo pH se ajustó a 6.0 con HCl y se autoclavó a 121°C por 25 minutos, así como las siguientes soluciones 10xLiAc, 10xTE, 1X LiAc/0.5X TE, 1X LiAc/1X TE, 1X LiAc/40% PEG-3350/1X TE, las cuales fueron esterilizadas mediante filtración.

Para testar las posibles interacciones específicas y llevar a cabo la caracterización de los transformantes se prepararon placas SC-Leu-Trp+Ura+His para cultivar levadura que contenía los 2 plásmidos a evaluar; placas YPAD + X-Gal con el fin de inducir LacZ; placas SC-Leu-Trp-Ura para probar la inducción de URA3 y placas SC-Leu-Trp-His, para probar la inducción HIS3.

Por otro lado, para testar los determinados clonajes, se prepararon los medios líquidos con *LB Broth (Lennox)* y las placas con *LB+Agar (Lennox)* de Condalab, con sus respectivos antibióticos. Concretamente, con espectinomocina (100 µg/ml), para seleccionar las células que habían incorporado el plásmido pCR8/GW/TOPO correctamente; con ampicilina (50 µg/ml), para seleccionar aquellas células con transformación positiva con el plásmido pet51b (+) y con gentamicina (10 µg/ml), para los plásmidos *bait* y ampicilina (100 µg/ml), para los plásmidos *prey*.

3.4. Cebadores

La amplificación y expresión de genes candidatos se detectó usando PCR semi-cuantitativa. El software Primer3 se utilizó para diseñar los cebadores, que se enumeran a continuación, en la tabla 1.

Nombre	Dirección	Cebador
TOPO <i>MYB113</i> -Chr10	Forward	5'-ATGAATACTGCTACTGTTGCTAAG-3'
	Reverse	5'-CTAATTAAATAGATTCCATAGGTC-3'
TOPO <i>MYB113</i> -Chr1	Forward	5'-ATGAATAATCCTCCTATAATCTG-3'
	Reverse	5'-TTAATCAAGTAGATTCCATAAATC-3'
<i>MYB113</i> -Chr10 RT	Forward	5'-TGCTCCGGACGAAATAGATCT-3'
	Reverse	5'-TGCTGTTCTTTCCGGAAATCT-3'
<i>MYB113</i> -Chr1 RT	Forward	5'-TGTAGGCTGAGGTGGTTGAA-3'
	Reverse	5'-CCCGGAAGTCTACCAGCAAT-3'
gc- <i>GLK2</i>	Forward	5'-AGATGACGACGACAAGGTACTTGGTGTATCTCCACCATT-3'
	Reverse	5'-GAGAAGCCCGGAGCTCCTGCGGCC GCTTAAGTTGGGGG-3'
GW1 GW2	Forward	5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC-3'
	Reverse	5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA-3'
TOPO <i>GLK2</i>	Forward	5'-ATGCTTGGTGTATCTCCACCATTG-3'
	Reverse	5'-TTAAGTTGGGGGTATTTGGTAAT-3'
PROMOTOR T7	Forward	5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
<i>GLK1</i> RT	Forward	5'-TTTTCCACCACCTCCTCCTC-3'
	Reverse	5'-GGTGTAAGAGAATTTGGTACCCA-3'
<i>GLK2</i> RT	Forward	5'-TTCCTGCACCCACGAGATTT-3'
	Reverse	5'-GCTTTGCCAAAACATCCTCA-3'
<i>GADPH</i>	Forward	5'-CCGCTCCTAGCAAAGATGCC-3'
	Reverse	5'-ACCCTCCACAATGCCAAACC-3'
<i>TIP41</i>	Forward	5'-ATTAGTGGGAGGATTGTGAG-3'
	Reverse	5'-CAGCCAGTTCATCCTCGTATAA-3'
<i>BAIT</i>	Forward	5'-AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG-3'
	Reverse	5'-AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC-3'
<i>PREY</i>	Forward	5'-TATAACGCGTTTGGGAATCACT-3'
	Reverse	5'-AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC-3'

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados en el análisis de PCR.

3.5. Métodos para la extracción y análisis de ácidos nucleicos

3.5.1. Extracción de DNA plasmídico

Para aislar el DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos se utilizó el *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I*, de *Omega Bio-Tek* provisto de columna Mini HiBind®. Primero, se cultivaron 5 ml de cultivo bacteriano durante la noche. A continuación, se centrifugó el cultivo a 10.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente (*RT*) y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 250 µl de la solución I con RNasa A y se utilizó el vórtex para resuspender completamente el pellet. Después, se añadieron 250 µl de la solución II. Se invirtió suavemente el tubo varias veces para obtener un lisado transparente. Fue necesario una incubación de 2-3 minutos. Posteriormente, se añadieron 350 µl de la solución III. Se invirtió inmediatamente varias veces hasta que se formó un precipitado blanco floculento. Se centrifugó a 13,000 x g durante 10 minutos, formándose un pellet blanco compacto. Se insertó una mini columna I DNA HiBind® en un tubo de recolección de 2 ml y se transfirieron 700 µl del sobrenadante vertiéndolo en ésta. Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto y se descartó el filtrado.

Luego, se añadieron 500 µl de tampón HBC diluido con isopropanol al 100%. Se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto y se descartó el filtrado. Se prosiguió de la misma manera añadiendo 700 µl de tampón de lavado de DNA diluido con etanol al 100%, centrifugando 30 segundos. Este paso se repitió para un segundo lavado.

Se centrifugó la columna Mini de DNA HiBind® vacía a velocidad máxima durante 2 minutos para secarla, siendo este paso crítico para la eliminación de trazas de etanol que podrían interferir con las aplicaciones posteriores.

Por último, se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml libre de nucleasas para eluir con 60 µl de tampón de elución. Se incubó a temperatura ambiente durante 60 segundos y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto. Y el DNA eluido, se cuantificó por nano-espectrofotometría en un NanoDrop y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.5.2. Extracción RNA

Con el fin de aislar el RNA de las distintas muestras se empleó el kit *RNAqueous™ Total RNA Isolation* de *Invitrogen™*, junto con *Ambion® Plant RNA Isolation Aid* para la eliminación de contaminantes comunes de preparaciones de RNA vegetal, como polisacáridos y polifenoles.

En primer lugar, se preparan las muestras de tejido pesando la cantidad requerida y se trituran con nitrógeno líquido en un *TissueLyser* (Qiagen). Para preparar el lisado, se añadió 10 µl del buffer de lisis 1 µl del *Plant RNA Isolation Aid* por mg de tejido para homogeneizar el tejido, siendo homogeneizada con ayuda de un *micropestle* hasta que se reduzca la viscosidad. El lisado fue centrifugado durante 5 min a 15000 x g, y el sobrenadante transferido a un nuevo tubo. Para continuar con el procedimiento, agregamos un volumen de etanol al 64% y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Esta mezcla de lisado/etanol se vertió en la columna ensamblada en un tubo de recolección y fue centrifugada durante 30 segundos a 15000 x g. Después, pasamos a los lavados con 700 µl de la solución de lavado#1, centrifugando a las mismas condiciones. Y al terminar, se realizaron dos lavados 500 µl de la solución de lavado #2/3, repitiendo el paso de centrifugación. Tras descartar la solución de lavado, se centrifugó la columna vacía durante 60 segundos para eliminar las últimas trazas de solución de lavado. Y, por último, se eluyó el RNA con 40-60 µl de buffer de elución precalentado a 70°C, el cual se recuperó por centrifugación durante 30 segundos a 15000 x g. El RNA eluido se cuantificó en un NanoDrop.

Para evaluar la integridad y calidad de las extracciones se preparó un gel de agarosa al 1,5% y las muestras se cargaron en el gel junto con el tampón de carga *Thermo Scientific™* de DNA (6X). La electroforesis se llevó a cabo durante 40 minutos a 100V. Posteriormente, los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz UV Gel Doc, utilizando el software *Quantity One* (BioRad).

Con el fin de eliminar las posibles trazas de DNA genómico presentes en la muestra de RNA, las muestras se trataron con DNasa I de *Thermo Scientific*. Para ello se preparó una reacción con 1 µg de RNA con un volumen máximo de 5 µl, a los cuales se añadió, 1 µl del buffer 10X, 0,1 µl de DNasa I y se llevó hasta 10 µl con agua milliQ libre de nucleasas. A continuación, se incubó 15 min a 37°C, al finalizar se añadió 1 µl de EDTA y se reincubó 10 min a 65°C para inactivar la DNasa I.

3.5.3. Retrotranscripción de ARN

El cDNA fue sintetizado gracias al *UltraScript® 2.0 cDNA Synthesis Kit Separate Oligos* de *PCRBiosystems*, el cual utiliza la transcriptasa inversa ultrascript 2.0 (RTase), una transcriptasa inversa MMLV modificada, altamente termoestable diseñada para una velocidad de síntesis de cDNA superior. La RTasa se combina con un inhibidor avanzado de RNasa para evitar la degradación de RNA. Para la reacción, se preparó una mezcla maestra basada en la siguiente tabla (Tabla 2), insertando los reactivos en la secuencia enumerada.

Reactivo	Reacción de 20 µl
5x UltraScript Buffer	4.0 µl
UltraScript 2.0 para la síntesis cDNA	1.0 µl
1 µg RNA total	10 µl
10x Primer Mix	2 µl
H ₂ O	3 µl

Tabla 2. Reactivos empleados en la reacción de síntesis de cDNA a partir de las muestras de RNA, junto con las cantidades utilizadas.

Para evaluar si la incubación con la DNasa I había eliminado completamente las trazas de DNA genómico, se realizó una reacción control, que contenía una mezcla de las diferentes muestras de RNA utilizadas llevándolas a una concentración final de 1 µg, y se añadieron todos los reactivos para la retrotranscripción excepto la RTasa. Las reacciones se incubaron a 55°C por 30 minutos, y después, a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar la enzima.

3.5.4. PCR semi-cuantitativa

Para amplificar las distintas muestras de cDNA se realizaron PCR semicuantitativas con distintas condiciones y cebadores, que quedan registradas en las siguientes tablas (Tabla 3-11). Con el fin de comprobar el éxito de la retrotranscripción y validar los resultados de amplificación, se empleó el gen de referencia *GADPH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y el *TIP41* (Proteína Interactora TOR de 41 kDa).

Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>GLK1</i> RT f (10µM)	1µL
<i>GLK1</i> RT r (10µM)	1 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	2 µL
Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>GLK2</i> RT f (10µM)	1µL
<i>GLK2</i> RT r (10µM)	1 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	2 µL
Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>TIP41</i> f (10µM)	1µL
<i>TIP41</i> r (10µM)	1 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	2 µL

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	94 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	98 °C	15´´	Desnaturalización
	58 °C	15´´	Anillamiento
	68 °C	30´´	Extensión
1	72 °C	3´	Extensión final

Tabla 3. Componentes y condiciones (2) de la PCRBIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores *GLK1* RT, *GLK2* RT y *TIP41*, siendo f (*forward*) y r (*reverse*).

Reactivo		Reacción 50 μ L	
TaKaRa LA Taq (5u/ μ L)		0,5 μ L	
10X LA PCR Buffer II (Mg ⁺² plus)		5 μ L	
Mezcla dNTPs (2.5 mM cada uno)		8 μ L	
TOPO <i>GLK2</i> f (10 μ M)		2 μ L	
TOPO <i>GLK2</i> r (10 μ M)		2 μ L	
cDNA (1:5)		4 μ L (<1 μ g)	
H2O destilada		28,5 μ L	

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	94 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	98 °C	10´´	Desnaturalización
	58 °C	15´´	Anillamiento
	68 °C	1´	Extensión
1	72 °C	30´	Extensión final

Tabla 4. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq empleando los cebadores TOPO *GLK2* f (*forward*) y r (*reverse*).

Reactivo		Reacción 10 μ L	
2x PCR BIO Taq Mix		5 μ L	
GW1 (10 μ M)		1 μ L	
GW2 (10 μ M)		1 μ L	
cDNA (1:5)		0,5 μ L (<100 ng)	
H2O destilada		2,5 μ L	

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	95 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	95 °C	15´´	Desnaturalización
	58 °C	15´´	Anillamiento
	72 °C	30´´	Extensión (20 s por kb)
1	72 °C	30´	Extensión final

Tabla 5. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores del Vector TOPO: GW1 (*forward*) y GW2 (*reverse*).

Reactivo		Reacción 50 μ L	
2x PCR BIO Taq Mix		25 μ L	
gc- <i>GLK2</i> f (10 μ M)		2 μ L	
gc- <i>GLK2</i> r (10 μ M)		2 μ L	
cDNA (1:5)		1 μ L <100 ng	
H2O destilada		22 μ L	

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	95 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	95 °C	15´´	Desnaturalización
	60 °C	15´´	Anillamiento
	72 °C	30´´	Extensión (20 s por kb)
1	72 °C	5´	Extensión final

Tabla 6. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores del Gibson Cloning, gc-*GLK2* f (*forward*) y gc-*GLK2* r (*reverse*).

Reactivo		Reacción 10µL	
2x PCR BIO Taq Mix		5 µL	
T7 promotor f (10µM)		1µL	
TOPO <i>GLK2</i> r (10µM)		1 µL	
cDNA (1:5)		0,5 µL <100 ng	
H2O destilada		2,5 µL	

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	95 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	95 °C	15´´	Desnaturalización
	54 °C	15´´	Anillamiento
	72 °C	30´´	Extensión (20 s por kb)
1	72 °C	3´	Extensión final

Tabla 7. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando como cebador *forward*, T7 promotor y como *reverse*, TOPO *GLK2* r.

Reactivo		25µL reaction	
2x PCR BIO Taq Mix		12.5 µL	
TOPO <i>MYB113</i> -chr 10 f (10µM)		1 µL	
TOPO <i>MYB113</i> -chr 10 r (10µM)		1 µL	
cDNA (1:5)		4 µL	
H2O destilada		6.5 µL	

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	95 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	95 °C	15´´	Desnaturalización
	55 °C	15´´	Anillamiento
	72 °C	30´´	Extensión (20 s por kb)
1	72 °C	3´	Extensión final

Tabla 8. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores TOPO *MYB-113* del chr 10; TOPO *MYB113*-chr 10 f (*forward*) y TOPO *MYB113*-chr 10 r (*reverse*).

Reactivo		25µL reaction	
2x PCR BIO Taq Mix		12.5 µL	
<i>GADPH</i> f (10µM)		1 µL	
<i>GADPH</i> r (10µM)		1 µL	
cDNA (1:5)		4 µL	
H2O destilada		6.5 µL	

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	95 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	95 °C	15´´	Desnaturalización
	58 °C	15´´	Anillamiento
	72 °C	30´´	Extensión (20 s por kb)
1	72 °C	3´	Extensión final

Tabla 9. Componentes y condiciones de la PCR BIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores *GADPH* f (*forward*) y r (*reverse*).

Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>MYB113</i> -chr 1 RT f (10µM)	1µL
<i>MYB113</i> -chr 1 RT r (10µM)	1 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	2 µL
Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>MYB113</i> -chr 10 RT f (10µM)	1µL
<i>MYB113</i> -chr 10 RT r (10µM)	1 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	2 µL
Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>TIP41</i> f (10µM)	1µL
<i>TIP41</i> r (10µM)	1 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	2 µL

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	95 °C	1´	Desnaturalización inicial
35	95 °C	15´´	Desnaturalización
	55 °C	15´´	Anillamiento
	72 °C	30´´	Extensión (20 s por kb)
1	72 °C	3´	Extensión final

Tabla 10. Componentes y condiciones (1) de la PCRBIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores *MYB113*-chr 1 RT, *MYB113*-chr 10 RT y *TIP41*, siendo f (*forward*) y r (*reverse*).

Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>MYB113</i> -chr 1 RT f (10µM)	0,3µL
<i>MYB113</i> -chr 1 RT r (10µM)	0,3 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	3,4 µL
Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>MYB113</i> -chr 10 RT f (10µM)	0,3µL
<i>MYB113</i> -chr 10 RT r (10µM)	0,3 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng
H2O destilada	3,4 µL
Reactivo	Reacción 10µL
2x PCRBIO Taq Mix	5 µL
<i>TIP41</i> f (10µM)	0,3µL
<i>TIP41</i> r (10µM)	0,3 µL
cDNA (1:5)	1 µL <100 ng

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Notas
1	95 °C	1´	Desnaturalización inicial
30	95 °C	15´´	Desnaturalización
	58 °C	15´´	Anillamiento
	72 °C	30´´	Extensión (20 s por kb)
1	72 °C	3´	Extensión final

Tabla 11. Componentes y condiciones (2) de la PCRBIO Taq Mix con la DNA polimerasa Taq, empleando los cebadores *MYB113*-chr 1 RT, *MYB113*-chr 10 RT y *TIP41*, siendo f (*forward*) y r (*reverse*).

Después de amplificar las muestras, se preparó un gel de agarosa al 1 o al 2% (según el tamaño del fragmento amplificado) para verificar la eficacia de la amplificación y confirmar que los fragmentos tenían los tamaños esperados. Las muestras se cargaron en el gel junto con el tampón de carga *Thermo Scientific*TM de DNA (6X). La electroforesis se llevó a cabo durante 40 minutos a 100V. Posteriormente, los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz UV Gel Doc, utilizando el software *Quantity One* (BioRad). Para determinar el tamaño de los fragmentos, se emplearon los marcadores moleculares Lambda HindIII, *FastGene* 100pb y *Gene ruler* 100pb plus.

3.6. Métodos de clonaje

3.6.1. Clonaje Gibson Assembly

En primer lugar, comenzamos con la linealización del vector pet51b+ mediante su digestión con las enzimas de restricción KpnI y NotI (Tabla 12). La reacción se incubó durante 1h a 37°C y al finalizar, 5 minutos a 80°C para inactivar las enzimas.

Componentes	Cantidades (reacción 20 µL)
Buffer 10X	2 µL
pDNA (pet51b+)	1 µg
KpnI	1 µL
NotI	1 µL
H ₂ O	14 µL

Tabla 12. Descripción de los componentes utilizados en la digestión del vector pet51b+ junto con los volúmenes necesarios.

A continuación, utilizamos la herramienta NEBuilder para realizar el cálculo de la masa requerida de cada fragmento para el óptimo ensamblaje, y se llevó a cabo esta reacción siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 13.

Componentes	Cantidades (reacción 20 µL)
Inserto	56,52 ng
DNA lineal (pet51b+)	2 µL
Gibson Assembly Master Mix (2X)	10 µL
H ₂ O	Hasta 20 µL

Tabla 13. Descripción de los componentes utilizados en la reacción de *Gibson Assembly* junto con los volúmenes necesarios.

Ligation Calculator

This tool will calculate the mass of insert required at several molar insert:vector ratios in the range needed for typical ligation reactions.

Ligation		Tutorials
Insert DNA length		Required insert DNA mass
<input type="text" value="983"/>	<input type="text" value="bp"/>	<input type="text" value="18.84 ng (1:1)"/>
Vector DNA length		<input type="text" value="37.68 ng (2:1)"/>
<input type="text" value="5218"/>	<input type="text" value="bp"/>	<input type="text" value="56.52 ng (3:1)"/>
Vector DNA mass		<input type="text" value="94.19 ng (5:1)"/>
<input type="text" value="100"/>	<input type="text" value="ng"/>	<input type="text" value="131.9 ng (7:1)"/>

Figura 6. Cálculo de la masa requerida del inserto de DNA con la aplicación NEBuilder.

Las muestras se incubaron en el termociclador a 50°C por 15 minutos y se guardaron a -20°C para la subsecuente transformación.

Para ello, se utilizaron las células competentes NEB® 5-alpha *E. coli*, a las cuales se agregaron 5 µl del producto de ensamblaje obtenido, mezclándolo por pipeteo. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos y se realizó un choque térmico calentando la mezcla a 42°C durante 30 segundos. Inmediatamente después, transferimos los tubos a hielo durante 2 minutos y tras finalizar, se agregaron 950 µl de medio SOC. Se incubó a 37°C durante 60 minutos con una agitación constante de 225 rpm. Después de la incubación, plaqueé 100 µl, y el restante se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm para plaquear 100 µl más el *pellet* celular sobre las placas de selección preparadas de *LB* con ampicilina a 50 µg/ml, para seleccionar las células que habían incorporado el plásmido correctamente. Finalmente, se incubaron durante la noche a 37°C.

Una vez crecidas, se prepararon cultivos líquidos de 10 colonias con *LB* más ampicilina (50 µg/ml) para proceder con el aislamiento del plásmido pet51b (+) que había adquirido el inserto (gen *GLK2*) siguiendo el procedimiento explicado anteriormente, gracias a *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I*, de *Omega Bio-Tek*.

3.6.2. Clonaje TOPO-TA

La clonación de PCR TOPO requiere de tres pasos según lo establecido en el protocolo de *ThermoFisher Scientific*. Previamente se amplificó mediante PCR, siguiendo las condiciones correspondientes mencionadas anteriormente, el cDNA obtenido de las muestras de ASI-S-1 e IVIA-371 y *S. insanum* y se realizó un gel preparativo al 0,8% y se procedió a cortar la banda de interés y purificarla. Para este último paso, utilizamos el kit *NucleoSpin Gel and PCR clean-up* de *Macherey-Nagel*, siguiendo el protocolo establecido. Se pesó la banda cortada y se mezcló con 2 µl de buffer NTI por cada mg de agarosa y se incubó la mezcla a 50 °C con vórtex cada 2 - 3 minutos hasta que el gel esté completamente disuelto. A continuación, se colocó una columna *XS* de *Gel y PCR Clean-up* de *NucleoSospin®* en un tubo de 2 ml y se cargó hasta 700 µl de muestra. Se centrifugó durante 30 s a 11,000 x g y se descartó el sobrenadante. Para lavar la membrana de silica, se agregó 700 µl de tampón NT3 y se centrifugó en las mismas condiciones, este paso de lavado se repitió una segunda vez. Al finalizar, se desecha el sobrenadante para proceder al secado de la membrana, mediante centrifugación durante 1 minuto a 11,000 x g. Así, ya podemos colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml para terminar con la elución del DNA, agregando 30µl de buffer NE, previamente calentado a 70°C para mejorar la elución. Se incubó a esta misma temperatura durante 5 min y se centrifugó durante 1 minuto a 11,000 x g. La concentración del DNA se midió utilizando el *Nanodrop*.

Una vez teníamos el producto de PCR, añadimos 2 μl junto con 1 μl de la solución salina, y del vector de clonación TOPO proporcionado y se incubó 5 min a temperatura ambiente (*RT*). Luego se transformó las células competentes de *E.coli OneShot TOP10*, previamente descongeladas en hielo, siguiendo el siguiente protocolo.

Primero, agregué los 6 μl del producto de reacción a las células competentes. Fue crucial mezclar suavemente la solución, evitando usar el vórtex para no dañar las células. Una vez mezclado, coloqué la mezcla en hielo durante 5'-30' minutos. Tras la incubación en hielo, se realizó un choque térmico calentando la mezcla a 42°C durante 30 segundos. Este paso ayudó a que las células absorbieran el DNA plasmídico. Inmediatamente después del choque térmico, transferí los tubos al hielo y dejé enfriar la mezcla durante 2 minutos. Esto ayudó a estabilizar las membranas celulares después del choque térmico. Agregué 250 μl de medio SOC al tubo. Se incubó a 37°C durante 60 minutos con una agitación constante de 225 rpm. Después de la incubación, la transformación se plaqueó en dos placas de *LB* con espectinomicina a 100 $\mu\text{g/ml}$, para seleccionar las células que habían incorporado el plásmido correctamente. Para asegurarnos de tener colonias aisladas tanto si la eficiencia de transformación era alta como si era baja, la transformación se repartió en dos placas: en una se plaqueó aproximadamente 1/10 del volumen total de células, y en la otra, los 9/10 restantes (previamente centrifugados para sedimentar las células). Esta estrategia se utilizó en todas las transformaciones de *E. coli* con los diferentes vectores. Finalmente, se incubó las placas durante la noche a 37°C. Esta incubación permitió el crecimiento de las colonias transformadas, que pude identificar al día siguiente.

3.6.3. Gateway

La tecnología Gateway™ es un método de clonación universal que aprovecha las propiedades de recombinación específicas del sitio de Bacteriófagos Lambda (Landy, 1989) para proporcionar una forma rápida y altamente eficiente de mover su secuencia de interés de ADN a sistemas de vectores múltiples.

Con el fin de detectar interacciones proteicas, utilizamos la tecnología de clonación *Gateway* por recombinación LR catalizada por la enzima *LR Clonasa™ II* de *Invitrogen* para crear plásmidos específicos *bait* y *prey* utilizando un clon de entrada existente (p.e. colonia con el DNA plasmídico purificado del GLK2 en vector TOPO insertada en la dirección correcta) y los vectores de destino PDEST™ 32 y PDEST™ 22. La reacción se llevó a cabo añadiendo y mezclando por vórtex a *RT* los componentes, previamente descongelados en hielo, de la siguiente tabla (Tabla 14) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 μl .

Componentes	Muestra	Control negativo
Clon de entrada (100 ng/reacción)	x μl	2 μl
pDEST™32/pDEST™22 (150 ng/ μl)	1 μl	1 μl
TE buffer, pH 8.0	x μl (Vf=8 μl)	7 μl
Mix de enzima LR Clonasa™ II	2 μl	–

Tabla 14. Componentes junto con sus respectivas cantidades para la reacción de recombinación LR para la creación de los plásmidos *Bait* (utilizando el vector pDEST™32) y *Prey* (utilizando el vector pDEST™22).

Una vez preparado, se incubaron las distintas reacciones durante 1 hora a 25°C. Una vez pasado este tiempo, se añadió la solución con la proteinasa K proporcionada por el kit a cada reacción para eliminar la enzima, y fueron incubadas de nuevo a 37°C durante 10 minutos. A continuación, procedimos a transformar las células competentes de *E. coli One Shot™ TOP10* con el fin de seleccionar para clones de expresión (pEXP™32 y pEXP™22) de los plásmidos *bait* y *prey*, respectivamente, siguiendo el procedimiento de transformación desarrollado en el anterior apartado,

con las diferencias en la cantidad de producto de reacción LR empleada, en este caso 2,5 µl, y las placas de selección, siendo placas de LB agar con 10 µg/ml de gentamicina (para los plásmidos *bait*) y 100 µg/ml de ampicilina (para los plásmidos *prey*). Éstas se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Para analizar los clones positivos, se eligió entre 5-10 colonias y se cultivaron durante la noche en medio LB que contenía los distintos antibióticos mencionados. Posteriormente se obtuvo el ADN plasmídico puro con el *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I*, de *Omega Bio-Tek*. Para confirmar la presencia del inserto realizamos un análisis de restricción con la enzima EcoRI (Tabla 15) de las colonias transformadas con pEXP22 y pEXP32 que corta una vez en el inserto. Las reacciones se incubaron a 37°C durante una hora.

Componentes	Cantidades
Buffer 10X	1,5 µl
EcoRI	0,5 µl
DNA	1 µg
H ₂ O	Hasta 15 µl

Tabla 15. Componentes para un análisis de restricción con la enzima EcoRI de las colonias transformadas con pEXP22 y pEXP32

Por último, se visualizó el patrón mediante un gel de electroforesis al 1% utilizando como tampón de carga *Thermo Scientific™* de DNA (6X). La electroforesis se llevó a cabo durante 40 minutos a 100V. Posteriormente, los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz UV Gel Doc, utilizando el software *Quantity One* (BioRad). Para determinar el tamaño de los fragmentos, se empleó el marcador molecular Lambda HindIII. Las colonias que fueron positivas mediante restricción se mandaron a secuenciar por Sanger al servicio de genómica del IBMCP (CISC/UPV) para comprobar que todos los componentes estaban en pauta.

3.7. Métodos para el análisis de la interacción de proteínas mediante ensayos de doble híbrido

3.7.1. Preparación de células competentes de levadura

Se inoculó 10 ml de medio YPAD con la cepa MaV203 y se incubó durante la noche a 30°C con agitación constante a 225 rpm. A la mañana siguiente, se determinó la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) y se diluyó el cultivo en 50 ml de medio YPDA hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.4 dejándolas crecer unas 2-4 horas adicionales. Se centrifugaron las células a 2500 rpm y el pellet se resuspendió en 40 ml de solución 1X TE. El proceso de centrifugación se repitió bajo las mismas condiciones y el sobrenadante se descartó. Esta vez, el pellet celular se resuspendió en 2 ml de solución 1X LiAc/0.5X TE. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se procedió inmediatamente a la transformación de las células competentes MaV203.

3.7.2. Transformación de levaduras

Con el fin de transformar las células de levadura MaV20 se llevó a cabo el siguiente procedimiento. En primer lugar, para cada una de las 9 transformaciones a realizar (Tabla 7), se añadieron 1 µg de ADN plasmídico y 100 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado con 100 µl de la suspensión de levadura del paso anterior. Se prosiguió añadiendo 700 µl de solución 1X LiAc/40% PEG-3350/TE y se mezcló adecuadamente. La solución se incubó a 30°C durante 30 minutos.

A continuación, se añadieron 88 µl de DMSO, invirtiendo para mezclar completamente. y se realizó un choque térmico a 42°C durante 7 minutos. Se centrifugaron dichas transformaciones en una microcentrífuga por 10 segundos y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 1 ml TE y se repitió el proceso, resuspendiendo el pellet en 50 µl TE. Por último, se sembraron en las placas selectivas SC-Leu-Trp para seleccionar para la presencia de ambos plásmidos y se incubaron a 30°C durante 2-3 días.

Transformación	Plásmido LEU2	Plásmido TRP1	Propósito
Nº1	Ninguno	Ninguno	Control de transformación –
Nº2	pEXP TM 32/Krev1	pEXP TM 22/RalGDS-wt	Control de interacción fuerte +
Nº3	pEXP TM 32/Krev1	pEXP TM 22/RalGDS-m1	Control de interacción débil +
Nº4	pEXP TM 32/Krev1	pEXP TM 22/RalGDS-m2	Control de interacción –
Nº5	pEXP TM 32/GLK2 _{wt}	pEXP TM 22/GLK2 _{wt}	Confirmar posible interacción
Nº6	pEXP TM 32/GLK2 _{wt}	pEXP TM 22/glk2 _{mut}	Confirmar posible interacción
Nº7	pEXP TM 32/glk2 _{mut}	pEXP TM 22/glk2 _{mut}	Confirmar posible interacción

Tabla 16. Controles de las transformaciones e interacciones de los plásmidos descritos, en las células de levadura MaV203.

3.7.3. Análisis de la interacción proteica mediante ensayos de doble híbrido

Para verificar las interacciones positivas en cepas de levadura replicamos las colonias utilizando 3 genes reporteros presentes en este sistema (HIS3, URA3, *lacZ*). En los dos primeros casos, se llevó a cabo una selección en placas que carecen del marcador auxotrófico, como histidina (SC-Leu-Trp-His) o uracilo (SC-Leu-Trp-Ura), respectivamente. Y, por otro lado, se analizó la actividad enzimática de la β-galactosidasa, para reducir los falsos positivos después de la selección por auxotrofia. Las placas se incubaron durante 2 días a 30°C.

4. RESULTADOS

4.1. Implicación de *GLK2* en el reticulado verde del fruto

4.1.1. Expresión de genes de la familia GOLDEN2-LIKE en diferentes tejidos de berenjena

En el tomate, se ha establecido que el gen *GLK2* está involucrado en el reticulado verde del fruto, promoviendo el desarrollo de cloroplastos y la biosíntesis de clorofila en los frutos (Jia *et al.*, 2020). Por otro lado, el homólogo *GLK1* (Golden 2-Like 1) se expresa predominantemente en tejidos vegetativos, como hojas, donde regula funciones similares en el desarrollo de cloroplastos y la fotosíntesis en dichos tejidos (Powell *et al.*, 2012).

Con el fin de determinar si estos patrones de expresión se mantienen en berenjena, se llevó a cabo la extracción de RNA y análisis de la expresión génica de *GLK1* y *GLK2* en diferentes tejidos. Más concretamente, en muestras de plántula, hojas jóvenes, raíces, flores y frutos de la especie silvestre *S. insanum*, ya que presenta reticulado verde. Las raíces se utilizaron como control negativo, ya que en teoría no deben tener cloroplastos. La concentración de RNA de las diferentes muestras se muestra en la tabla 17.

Muestra	Concentración	Ratio 260/280 nm	Ratio 260/230nm
Plántula	97,3 ng/μl	2,01	2,15
Hojas jóvenes	503,1 ng/μl	2,19	2,47
Raíces	95,9 ng/μl	2,25	2,16
Flores	647,5 ng/μl	2,15	2,41
Frutos	156,1 ng/μl	2,09	2,32

Tabla 17. Cuantificación en NanoDrop del RNA (ng/μl) en muestras extraídas de plántula, hojas jóvenes, raíces, flores y frutos de *S.insanum*.

Los cebadores utilizados para este experimento se diseñaron para ver expresión, seleccionando un fragmento pequeño del gen a amplificar (*GLK1* y *GLK2*), con el fin de obtener una eficiencia de amplificación del 100% y que la amplificación de las bandas sea proporcional al nivel de expresión del gen. Es por esto por lo que el tamaño de la banda obtenido no representa el tamaño del gen, sino se trata de un fragmento arbitrario de unos 100-150 pb.

La expresión de *GLK1/2* de *S. insanum* (*SiGLK1* y *SiGLK2*), predice sus funciones en los distintos tejidos. Los resultados obtenidos fueron coherentes con nuestra hipótesis establecida en base al patrón de expresión en *S.lycopersicum* (Figura 7). Los transcritos de *SiGLK1* y *SiGLK2* se acumulan en hojas, raíces y flores, pero solo los transcritos de *SiGLK2* se acumulan en el fruto, al igual que en tomate. Por otro lado, como control positivo de la PCR, observamos la amplificación de *TIP41*, que presenta expresión constitutiva, obteniendo banda en todos los tejidos (Figura 7). Por otro lado, podemos observar amplificación para la muestra de raíces en los 3 casos, esto puede deberse a que se trataba de raíces de plantas crecidas *in vitro*, por lo cual, las raíces han estado expuestas a la luz, de ahí que presenten algo de expresión (Figura 7).

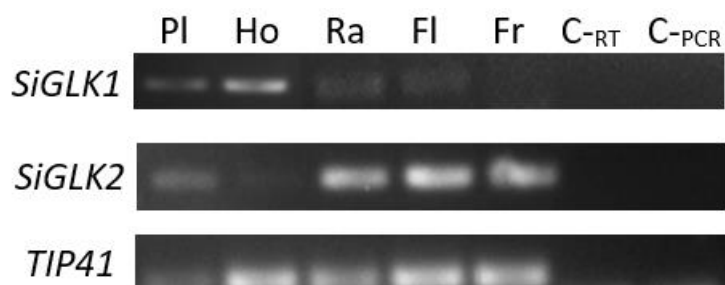


Figura 7. Gel electroforético al 2% para ver la expresión en diferentes tejidos de *S.insanum* de genes de la familia GOLDEN2-like. PCR BIO Taq con los cebadores *GLK1* RT y *GLK2* RT. En la primera línea encontramos el control positivo de la PCR con la expresión de *TIP41* en todos los tejidos ensayados; plántula (PI), hoja (Ho), raíz (Ra), flor (Fl) y fruto (Fr). En el centro, la expresión del gen *SiGLK1* en Ho, Ra y Fl y por último, la expresión del gen *SiGLK2*, en PI, Ho, Ra, Fl y Fr, siendo menor en los tejidos vegetativos PI y Ho.

4.1.2. Clonaje de los alelos wt y mutantes de *GLK2*

Con el fin de confirmar la mutación en *GLK2*, presente en el genoma de referencia (MEL1, variedad sin *netting*) y entender mejor el modo de acción de la proteína de *GLK2*, se decidió clonar los dos alelos (*GLK2-wt* y *glk2-mut*) y se diseñaron dos tipos de ensayos de interacción, por un lado, experimentos de interacción de doble híbrido en levadura (Y2H) y por otro, ensayos de co-inmunoprecipitación con extractos de proteína de la piel de berenjena.

Para ello se llevó a cabo la extracción de RNA, de piel del fruto de una variedad que no presenta reticulado verde en el fruto (ASI-S-1), para clonar el alelo mutado de *glk2* (1 deleción de 1 nt) (*glk2-mut*), y de *S.insanum*, para clonar el alelo salvaje de *GLK2* (*GLK2-wt*). Las cantidades obtenidas mediante su cuantificación en *Nanodrop* fueron de 196,6 y 43,1 ng/μL.

Una vez sintetizado el cDNA, se llevó a cabo una PCR con la enzima *high fidelity* TaKaRa LA Taq y con los cebadores TOPO *GLK2*, dirigidos a amplificar la región codificante completa de *GLK2* (Figura 8), y los resultados se visualizaron en un gel de electroforesis al 1%, obteniendo para ambos casos una banda del peso molecular esperado (~1kb).

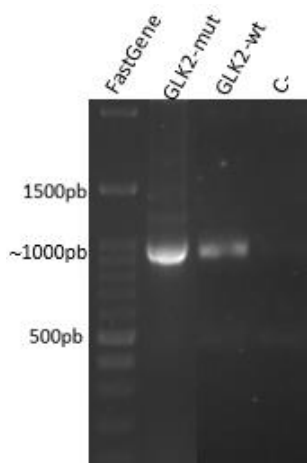


Figura 8. Gel de electroforesis al 1% para amplificar los alelos *glk2-mut* y *GLK2-wt* de las muestras de ASI-S-1 y *S.insanum*, respectivamente. Como marcador de peso molecular se empleó el FastGene 100pb (Nippongene). La presencia de banda confirma la amplificación de los genes, la cual se corresponde con un tamaño aproximado de 1kb.

Las bandas se cortaron y purificaron obteniendo así, unas concentraciones de DNA, de 64,8 ng/ μ L para el *glk2-mut* y de 21,7 ng/ μ L para el *GLK2-wt*, sirviendo de inserto para su clonación en el vector pCR8/GW/TOPO. A continuación, se transformaron las células competentes de la cepa *One Shot™ TOP10* de *E.coli* con la ligación obtenida. En el caso del inserto *GLK2-wt* el número de colonias presente en ambas placas de transformación (1/10 y 9/10 de la transformación), se procedió directamente a hacer cultivos líquidos para luego mandar a secuenciar el DNA plasmídico por Sanger. En el caso del inserto *glk2-mut*, como no se obtuvieron diferencias en el número de colonias presentes entre ambas placas (lo cual podría indicar la presencia de colonias contaminantes), se llevó a cabo una reacción de PCR Bio Taq para 7 colonias (Figura 9), con el fin de hacer un screening de las colonias y descartar posibles colonias contaminantes. Como el clonaje en el vector pCR8/GW/TOPO no es direccional, se utilizaron dos combinaciones de cebadores para identificar las colonias en las cuales el inserto se había insertado en la orientación correcta (ATG del gen cercano a la secuencia attL1 del vector). Para la PCR se utilizaron los cebadores GW1 y GW2 que anillan en el vector, flanqueando el sitio de clonaje del inserto.

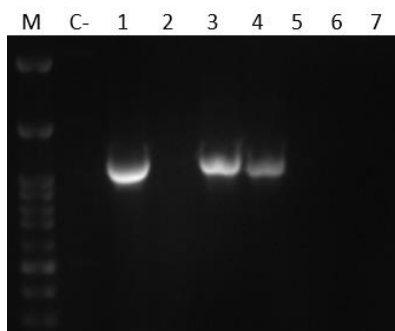


Figura 9. Gel de agarosa al 2% usando como marcador (M) *FastGene* 100pb, de la PCRBio Taq de las 7 colonias, con cebadores GW1 y GW2, para comprobar la eficacia de transformación y descartar posibles escapes de selección. Las colonias que han incorporado el inserto del gen *glk2-mut* han sido la 1,3 y 4.

Se obtuvo banda sólo en 3 de las 7 colonias cribadas (colonias 1, 3 y 4), lo cual indica que las otras o bien eran contaminantes o contenían vectores vacíos religados (sin inserto) (Figura 9). Se inocularon cultivos líquidos de las colonias 1, 3 y 4 y se obtuvo el DNA plasmídico, obteniendo una concentración de 354, 307 y 337 ng/ μ L, respectivamente. A continuación, se analizaron las secuencias de las colonias 1, 3 y 4, donde en todas se insertó *glk2-mut*. Se observó que la secuencia del alelo *glk2-mut* era correcta en todas ellas (tal como aparece en el genoma de referencia de la variedad MEL1), pero se observó en las colonias 1 y 3 estaban insertadas en sentido inverso al deseado para los clonajes sucesivos, ya que el clonaje en el vector TOPO no es direccional, por lo que la única insertada en sentido correcto, 5'→3', fue la colonia 4. En el caso del *GLK2-wt*, se inocularon cultivos líquidos de 4 colonias, y se obtuvo el pDNA, obteniendo una concentración de 98, 98, 103 y 103 ng/ μ L, respectivamente. En cuanto a los resultados de secuenciación por Sanger, todos los clones contenían el alelo *GLK2-wt* sin errores, pero la única colonia que presentaba el inserto en la dirección correcta fue la 1.

La secuenciación Sanger de los clones seleccionados para ambos alelos permitió verificar que la mutación presente en el genoma de referencia (MEL1, variedad sin *netting*) es real y está presente en otras variedades sin *netting*. Una vez confirmada la secuencia de ambos alelos, se procedió a usar dichos clones como clon de entrada para la generación de clones de expresión para la realización de experimentos de interacción de proteínas (Y2H y co-inmunoprecipitación) para entender mejor el modo de acción de la proteína GLK2.

Para continuar con la clonación de los alelos *glk2-mut* en los vectores de expresión de proteínas *pet51b(+)*, a partir de los plásmidos obtenidos, primeramente se amplificó el fragmento *Glk2-mut* con los cebadores *Gibson cloning*, que contienen una secuencia complementaria al vector de destino (*pet51b(+)*) para permitir el apareamiento de ambos fragmentos y el clonaje por *Gibson assembly*, para generar el inserto de entrada para el sistema *Gibson cloning*. (Figura 10).

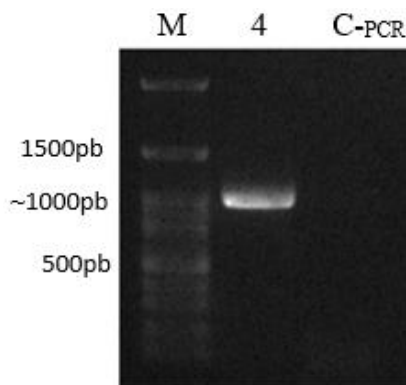


Figura 10. Gel agarosa al 1% de los resultados de la 2x PCRBio *High fidelity* para amplificar el fragmento de *Glk2-mut* insertado en el vector pCR8/GW/TOPO de la colonia 4, con los cebadores del *Gibson cloning*, *gcGLK2*. Como marcador molecular se usó el *FastGene* 100pb. Se obtuvo amplificación, donde podemos observar una banda del tamaño aproximado de 1 kb.

Seguidamente, el producto de PCR fue purificado, obteniendo una concentración de 163,7 ng/ μ L, que nos sirvió como inserto de entrada. De manera paralela se linealizó el vector *pet51b(+)*. Una vez obtenidos ambos productos, se llevó a cabo la reacción de *Gibson assembly* y se transformaron las células competentes. Con el fin de comprobar si se había insertado el *Glk2-mut* en el vector *pet-51b(+)*, se llevó a cabo una PCRBio Taq con el cebador *forward* promotor T7, presente

en el vector pet-51b(+), y *reverse* TOPO *GLK2*, presente en el inserto. Como se puede observar en la Figura 11, en las 4 colonias se insertó el inserto.

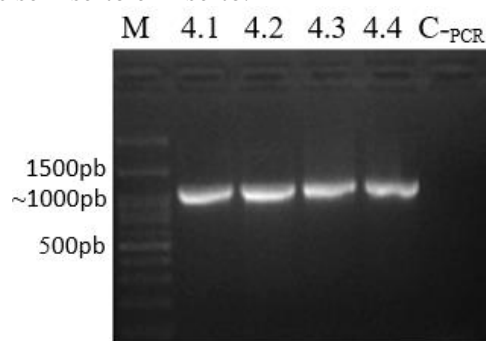


Figura 11. Gel de agarosa al 1% de los resultados de la PCR Bio Taq utilizando como cebador *forward* promotor T7 y *reverse* TOPO *GLK2*, para comprobar si las colonias transformadas contenían el vector pet51b(+) con el gen *Glk2-mut* insertado. Observamos banda para las 4 colonias (4.1, 4.2, 4.3 y 4.4), por lo que en todas se ha introducido el inserto. Como marcador de peso molecular (M) se empleó *FastGene* 100pb.

Habiendo incorporado las 4 colonias el inserto, se inocularon cultivos líquidos de dichas colonias y se aisló el plásmido pet51b(+) con el inserto *glk2-mut*, obteniendo la siguiente concentración de pDNA (Tabla 18). Las colonias se secuenciaron por Sanger, determinando que todos los clones eran correctos tanto a nivel de la secuencia del inserto como a nivel de pauta de lectura con los *tags* presentes en el vector, necesarios para los ensayos de proteínas posteriores.

Muestra	Concentración
Colonia 4.1	80´1 ng/µL
Colonia 4.2	64´1 ng/µL
Colonia 4.3	64´5 ng/µL
Colonia 4.4	75´1 ng/µL

Tabla 18. Concentraciones del DNAp aislado de las 4 colonias que insertaron el vector pet51b(+) con el inserto *Glk2-mut*.

4.1.3. Dimerización de GLK2 asociada con su función

En *Arabidopsis thaliana*, *GLK1* posee un dominio de activación de la transcripción y, uniéndose al DNA, un dominio de dimerización GCT (Kim *et al.*, 2023). Además, un estudio anterior (Fitter *et al.*, 2002) sugería que *AtGLK1* y *AtGLK2*, pueden homo-dimerizar e incluso, formar heterodímeros, aunque no mostraba los datos.

En base a estos resultados, decidimos llevar a cabo ensayos Y2H para testar la hipótesis de que el GLK2 de berenjena dimeriza para llevar a cabo su función, y que, por tanto, en la versión mutada de GLK2, la ausencia del dominio de dimerización es responsable de la pérdida de función de la proteína.

Para ello, como clon de entrada, utilizamos aquellas colonias con el inserto direccional 5'→3'; la colonia 4 con el vector *glk2-mut*/PCR8/GW/TOPO y la colonia 1 con el vector *GLK2-wt*/PCR8/GW/TOPO, para llevar a cabo la reacción de recombinación LR con pDEST™ 32 y pDEST™ 22 y crear los plásmidos *bait* y *prey*, respectivamente. De la correspondiente transformación celular, se seleccionaron 10 colonias, de las cuales se inocularon cultivos líquidos y se aisló el pDNA de los plásmidos pEXP™ 32 y pEXP™ 22, cuya cuantificación queda registrada en la tabla 19.

Muestras	Concentración	Ratio 260/280nm	Ratio 260/230nm
pEXP32- <i>glk2mut.1</i>	463 ng/μL	1,89	2,42
pEXP32- <i>glk2mut.2</i>	443 ng/μL	1,89	2,43
pEXP32- <i>glk2mut.3</i>	489 ng/μL	1,87	2,40
pEXP32- <i>glk2mut.4</i>	573 ng/μL	1,88	2,42
pEXP32- <i>glk2mut.5</i>	381 ng/μL	1,92	2,43
pEXP32- <i>glk2mut.6</i>	398 ng/μL	1,89	2,43
pEXP32- <i>glk2mut.7</i>	411 ng/μL	1,89	2,42
pEXP32- <i>glk2mut.8</i>	382 ng/μL	1,90	2,43
pEXP32- <i>glk2mut.9</i>	357 ng/μL	1,88	2,33
pEXP32- <i>glk2mut.10</i>	496 ng/μL	1,87	2,40
pEXP22- <i>glk2mut.10</i>	289 ng/μL	1,89	2,41
pEXP22- <i>glk2mut.10</i>	311 ng/μL	1,92	2,32
pEXP22- <i>glk2mut.10</i>	344 ng/μL	1,98	2,35
pEXP32- <i>GLK2wt.1</i>	291 ng/μL	1,88	2,40
pEXP32- <i>GLK2wt.1</i>	332 ng/μL	1,93	2,39
pEXP32- <i>GLK2wt.1</i>	385 ng/μL	1,90	2,41
pEXP22- <i>GLK2wt.1</i>	345 ng/μL	1,91	2,34
pEXP22- <i>GLK2wt.1</i>	299 ng/μL	1,86	2,42

Tabla 19. Cuantificación de los vectores obtenidos pEXP™ 32 y pEXP™ 22 tras la reacción de recombinación LR, con el inserto del gen *glk2-mut* y *GLK2-wt*.

Para confirmar la presencia del inserto, las colonias se secuenciaron por Sanger, determinando que todos los clones eran correctos, por lo que seleccionamos la colonia 1 para cada muestra. Además, se repitieron las *minipreps* para tener suficiente cantidad de DNA para poder realizar los ensayos Y2H. Las nuevas concentraciones obtenidas fueron (Tabla 20):

Muestras	Concentración	Ratio 260/280nm	Ratio 260/230nm
pEXP32- <i>GLK2wt.1</i>	301 ng/μL	1,92	1,98
pEXP32- <i>glk2mut.1</i>	296 ng/μL	1,92	1,98
pEXP22- <i>GLK2wt.1</i>	397 ng/μL	1,90	1,98
pEXP22- <i>glk2mut.1</i>	387 ng/μL	1,88	2,03

Tabla 20. Cuantificación de los vectores obtenidos de las colonias 1 de cada pEXP™ 32 y pEXP™ 22 con el inserto del gen *glk2-mut* y *GLK2-wt*.

Se llevaron a cabo las 7 transformaciones de las células competentes MaV203 (ver Materiales y Métodos). En el primer experimento de transformación, la cantidad de cultivo para preparar las células competentes resultó insuficiente (50 ml de cultivo de partida) ya que no se obtuvieron colonias en todas las transformaciones, lo cual indica una baja eficiencia de transformación. Además, hubo crecimiento con la transformación 1 (4 colonias), correspondiente al control negativo, lo cual indica pudo haber alguna contaminación. También hubo crecimiento con las transformaciones 3 y 7, correspondientes al control positivo de interacción débil y al ensayo de interacción entre pEXP32-*glk2mut* y pEXP22-*glk2mut*, respectivamente (16 y 4 colonias). Aunque la presencia de algunas colonias en la transformación 1 indicaba la presencia de algunas colonias contaminantes, la placa 3 (control positivo) contenía más colonias, indicando que algunas podían ser verdaderos positivos, y por ello se hizo una prueba para poner a punto las condiciones del ensayo de Y2H.

Tras los ensayos de auxotrofia y X-Gal, se observó, tal y como esperábamos, un crecimiento basal en las placas SC-Leu-Trp-Ura y SC-Leu-Trp-His y uno mayor con SC-Leu-Trp+X-Gal, pero

ninguna colonia azul en la transformación control por lo que el ensayo no es válido. En la transformación 3 se estaba testando una interacción positiva fuerte ya validada, por tanto, este resultado podría deberse a que todas las colonias fueran contaminantes o a que el X-Gal estuviera en mal estado. Por lo tanto, este proceso de preparación y transformación de las células MaV203 fue repetido.

En el segundo intento, se aumentó la cantidad de cultivo de partida para aumentar la eficiencia de transformación (300 ml), pero dicha cantidad resultó ser excesiva y el crecimiento de las levaduras fue confluyente, y aún replaqueando una cantidad menor (50 μ l) no conseguimos obtener colonias aisladas. Por tanto, para el tercer ensayo se decidió usar una cantidad intermedia.

En el tercer intento se utilizaron 100 ml de cultivo para preparar las competentes, y se obtuvieron 21 colonias en la transformación 2 (control positivo fuerte), 26 colonias en la transformación 3 (control positivo débil), 20 colonias en la transformación 5 (posible interacción entre pEXP32-*GLK2wt* y pEXP22-*GLK2wt*) y 26 colonias en la transformación 6 (posible interacción entre pEXP32-*GLK2wt* y pEXP22-*glk2mut*), por lo que se consideró que ésta cantidad de cultivo inicial era la adecuada para la posterior transformación. Las colonias se repicaron en placas de YPDA+ X-Gal (Figura 12), pero de nuevo, no se obtuvieron colonias azules. Dado que en este caso la transformación 1 salió limpia (0 colonias), este resultado confirmó que el X-Gal disponible estaba degradado.

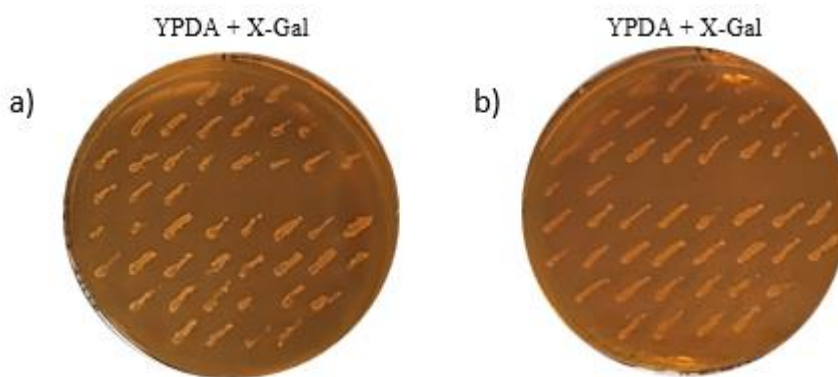


Figura 12. Placas YPDA+ X-Gal. a) Crecimiento de las colonias de las transformaciones control de interacción. Las 21 primeras colonias, contando desde arriba, de izquierda a derecha, correspondientes a la transformación 2 (control positivo fuerte) y en la fila siguiente, 26 colonias de la transformación 3 (control positivo débil). b) Las 20 colonias, comenzando desde arriba a la izquierda, correspondientes con la transformación 5 (posible interacción entre pEXP32-*GLK2wt* y pEXP22-*GLK2wt*) y a partir de la siguiente fila, 26 colonias en la transformación 6 (posible interacción entre pEXP32-*GLK2wt* y pEXP22-*glk2mut*).

Por lo que se decidió repicar las colonias en placas SC-Leu-Trp-His y SC-Leu-Trp-Ura, para hacer los ensayos de auxotrofia. Los resultados obtenidos tampoco fueron indicativo, ya que hubo crecimiento por igual de todas las colonias, sin haber diferencia entre el control positivo fuerte y débil como se esperaba (Figura 13). Es por esto, que no podemos sacar conclusiones certeras y en un futuro, repetir los ensayos con X-Gal nuevo y poner a punto el protocolo de Y2H.

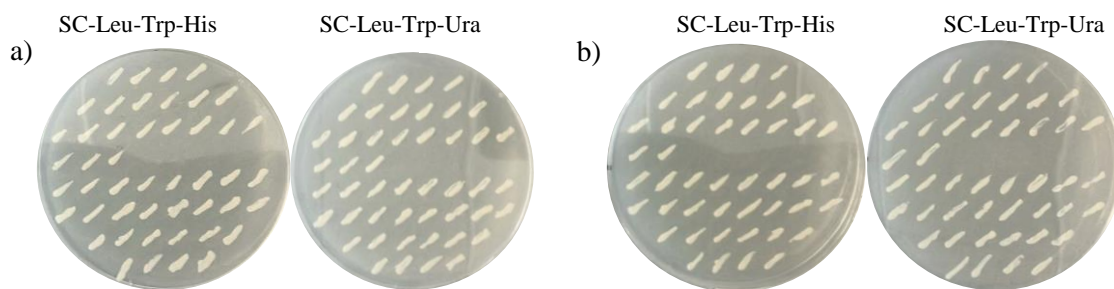


Figura 13. Ensayos de auxotrofia en la biosíntesis de His y Ura. a) Crecimiento de las colonias de las transformaciones control de interacción en placas SC-Leu-Trp-His y SC-Leu-Trp-Ura. Las 21 primeras colonias, contando desde arriba, de izquierda a derecha, correspondientes a la transformación 2 (control positivo fuerte) y en la fila siguiente, 26 colonias de la transformación 3 (control positivo débil). b) Crecimiento de las colonias de las transformaciones a ensayar en placas SC-Leu-Trp-His+Ura y SC-Leu-Trp-Ura+His. Las 20 colonias, comenzando desde arriba a la izquierda, correspondientes con la transformación 5 (posible interacción entre pEXP32-*GLK2wt* y pEXP22-*GLK2wt*) y a partir de la siguiente fila, 26 colonias en la transformación 6 (posible interacción entre pEXP32-*GLK2wt* y pEXP22-*glk2mut*).

4.2. Implicación de MYB113 en la síntesis de antocianinas en piel de fruto y fotoinsensibilidad

4.2.1. Efectos en la piel de las berenjenas del tratamiento de embolsado y desembolsado

Varios trabajos previos sobre fotoinsensibilidad (PUC) (Yang *et al.*, 2022), (Mangino *et al.*, 2022), incluyendo datos no publicados obtenidos en el laboratorio (Gomis-Cebolla *et al.*, en preparación), han identificado regiones en el cromosoma 1 y el cromosoma 10 asociadas a la fotoinsensibilidad. Además, en base a los resultados del análisis de BSA-Seq realizado en el laboratorio (Gomis-Cebolla *et al.*, en preparación), las regiones del cromosoma 1 y la del cromosoma 10, contienen dos parálogos del gen *SmMYB113*, que denominamos MYB113-chr1 y *MYB113*-chr10. Se ha demostrado que este *MYB* juega un papel importante en la activación de la biosíntesis de antocianina en la berenjena (Yang *et al.*, 2022), por tanto, podría ser que uno o ambos parálogos fueran responsable del carácter PUC, por ejemplo, si alguna mutación en una región reguladora hubiera desacoplado su expresión de la luz, o causado una expresión constitutiva. Para comprobar esta hipótesis, se extrajo RNA a partir de los parentales ASI-S-1 e IVIA-371 con piel morada, obteniendo una concentración de 196,6 y 634,2 ng/ μ L, respectivamente y se usaron 1000 ng de RNA para la reacción de retrotranscripción. Tras esta, se llevó a cabo las amplificaciones por PCR del *MYB113*-chr10, ya que la región del cromosoma 10 parecía tener un peso más importante en el carácter PUC, en base a los resultados de BSA-Seq. Como control positivo se usó la Glicerilaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*). Como se observa en la Figura 14, no se obtuvo expresión del *MYB113*-chr10, pero sí del *GADPH*, lo cual indica, que, en términos generales, el cDNA se ha sintetizado correctamente (porque hemos obtenido amplificación de *GADPH*), y que, por tanto, en las condiciones utilizadas el *MYB113*-chr10 no se está expresando. Lo cual quizás podría ser debido a que ya se han alcanzado los niveles máximos de acumulación de antocianinas, y el *MYB113*-chr10 ha dejado de expresarse porque no es necesario sintetizar más antocianinas (este tipo de regulación por *feedback* negativo es común en genes metabólicos).

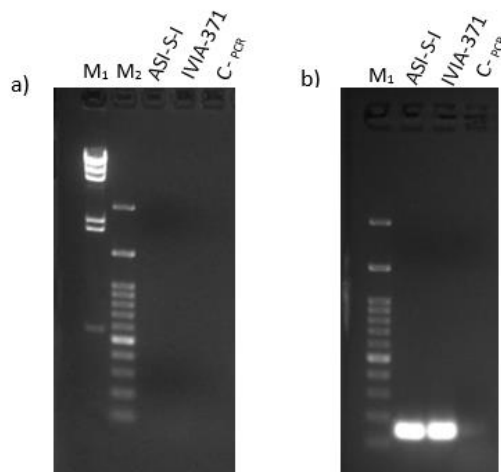


Figura 14. Geles de electroforesis de agarosa al 1% teñido con *GreenSave* de la amplificación del cDNA. a) PCRBio Taq con los cebadores TOPO *MYB113*-ch10, para amplificar el gen *MYB113*-ch10, además, se muestran los dos marcadores de peso molecular, Lambda DNA/*Hind*III (M_1) y *FastGene* 100pb (M_2) y a continuación, la ausencia de amplificación en el cDNA de ASI-S-1 y de IVIA-371. Por último, el control negativo de la reacción de PCR (C_{-PCR}) b) Control positivo, PCRBio Taq para amplificar el gen *GADPH*, se muestra en el primer carril el marcador de peso molecular (M_2), *FastGene* 100pb y a continuación, la amplificación en el cDNA de ASI-S-1 y de IVIA-371 y por último el control negativo de la reacción de PCR (C_{-PCR}).

La biosíntesis de antocianinas está influenciada por varios factores, siendo la luz el que juega un papel clave. Gracias a análisis transcriptómicos y artículos de variedades asiáticas (He *et al.*, 2019), (Jiang *et al.*, 2016), (Li *et al.*, 2018), se ha evidenciado que la expresión de los genes se induce por la luz a tiempos cortos de exposición solar. Por eso, se decidió repetir este proceso, esta vez con variedades de ASI-S-1 (fotosensible) embolsadas durante 10 días (desde antes de la antesis de la flor), obteniendo muestras de piel a condiciones de 0h, 4h y 1 día de exposición solar (Figura 15). Tras la extracción de RNA, obtuvimos unas concentraciones de 332, 280 y 15,8 ng/ μ L respectivamente. Debido a la baja cantidad de RNA obtenida con la piel expuesta durante 1 día, se hicieron dos retrotranscripciones: una con una cantidad total de RNA de 225 ng, ya que esa era la cantidad máxima disponible para la muestra de 1d, y otra, de reserva, con 1000 ng para 0, 4h y el control negativo de la RT. En este caso, se llevó a cabo la amplificación del *MYB113* del chr 1 y 10, ya que los resultados anteriores indicaban que el parálogo del cromosoma 10 quizás no se expresaba en fruto. Para ello, se utilizaron los cebadores *MYB113*-chr 1/10 RT y como control positivo, *TIP41* (Proteína Interactora TOR de 41 kDa), en estas muestras de cDNA.

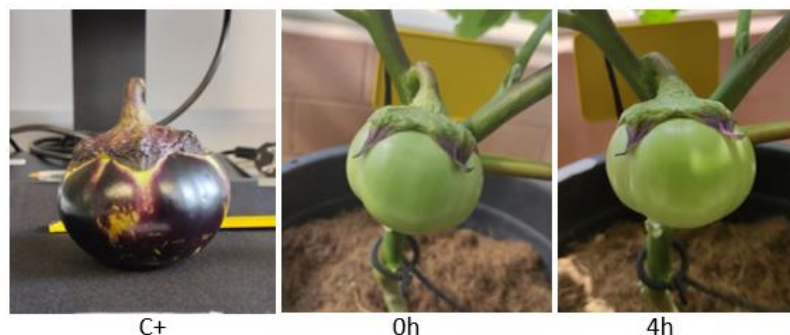


Figura 15. Variedades de ASI-S-1. A la izquierda, como control positivo (C+), berenjena completamente morada de la variedad ASI-S-1, sin recibir ningún tratamiento. A continuación, berenjenas embolsadas durante 10 días (desde antes de la antesis de la flor), obteniendo muestras de piel a condiciones de 0h y 4h de exposición solar.

El primer tentativo resultó fallido porque se obtuvieron bandas contaminantes tanto en el C-RT (restos de DNA genómico) como en el C- de PCR, además de la aparición de bandas de bajo peso molecular correspondiente a *primer dimers* (resultados no mostrados). Con el fin de eliminar las bandas de DNAg y evitar la formación de los *primers dimers*, se trataron las muestras de RNA anteriores de ASI-S-1 0h y 4h de nuevo con DNasa y se cambiaron 4 condiciones de la reacción de PCR, aumentando la cantidad de cDNA, pasando de una dilución 1:4 a una 1:2, disminuyendo la de los *primers* (de 1 μ L a 0,3 μ L), aumentando la temperatura de anillado de la PCR de 55°C a 58°C y disminuyendo el número de ciclos (de 35 a 30).

Esta vez se llevó a cabo la amplificación del *MYB113*-chr 1, del chr 10, y de la proteína *TIP41* en las muestras de ASI-S-1 a las 0h, 4h y el control- de la RT y de IVIA-371, junto a su control – de la RT, utilizadas en los anteriores experimentos. No se pudo usar la muestra de ASI-SI-I de 1h porque no había más cDNA y no quedaba material para repetir la extracción.

Tal y como se aprecia en la Figura 16, se obtiene expresión del *MYB113* del chr 1 en todas las muestras analizadas, así como la amplificación de *TIP41*, que nos confirma la validez de la reacción, así como la consistencia del análisis. De todos modos, la expresión del *MYB113*-chr1 en las muestras de 0h y 4h de exposición es muy leve (Figura 16). En esta ocasión tampoco detectamos expresión del *MYB113*-chr 10 en ninguna de las muestras. Por otro lado, la ausencia de banda en los carriles correspondientes al control – de las RT nos confirman la eliminación del gDNA. Así mismo ocurre en el caso de las muestras control – de la PCR, indicando la ausencia de contaminación en los reactivos empleados y confirmando en conjunto la validez del resultado obtenido.

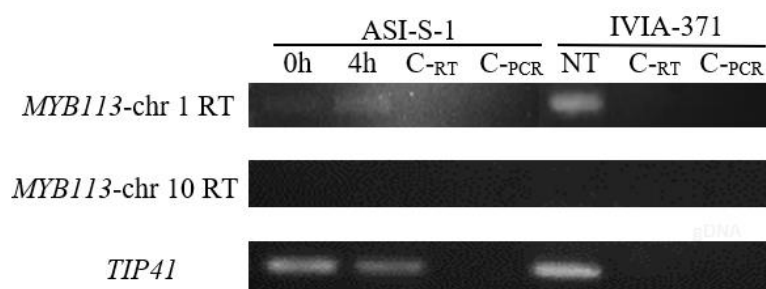


Figura 16. Geles de electroforesis de agarosa al 2% teñido con *GreenSave* para ver la expresión de los parálogos del *MYB113*. PCRBio Taq con los cebadores *MYB113*-ch1 RY, *MYB113*-ch10 RT y *TIP41* para las muestras ASI-S-1 0h, 4h e IVIA-371 sin tratamiento (NT), junto a sus controles – de RT (C-RT) y PCR (C-PCR).

En conclusión, estos resultados indican que sólo el parálogo ubicado en el cromosoma 1 se expresa en la piel del fruto. Por tanto, por lo que respecta a la zona asociada al fenotipo PUC del cromosoma 10, podemos descartar el parálogo de *MYB113* como gen responsable del fenotipo. En el caso de la zona del cromosoma 1, la existencia de expresión del parálogo de *MYB113*-ch1 en fruto, indica que el gen puede ser responsable del fenotipo, aunque son necesarios experimentos adicionales para evaluarlo ya que las muestras de ASI-S-1 e IVIA-371 usadas en este experimento no son comparables y por tanto no podemos afirmar que la expresión en IVIA-371 sea mayor, cosa que implicaría la posible participación de este gen en el carácter PUC.

5. DISCUSIÓN

El color de la piel del fruto, que varía significativamente, es una característica de gran importancia económica para las berenjenas (Zhou *et al.*, 2022). Más concretamente, la que presenta un color morado intenso, ha cobrado mayor relevancia por su alto contenido de antocianinas. A pesar de la falta de conocimiento molecular de la regulación del color, se conoce que está determinado principalmente por la cantidad y composición de antocianinas y clorofila (Zhou *et al.*, 2021). La regulación de la biosíntesis de antocianinas en las plantas se lleva a cabo principalmente a través de la modulación de la expresión de los genes reguladores y estructurales implicados en este proceso (Liu *et al.*, 2018). Dentro de los primeros, cabe destacar *SmMYB113*, por su papel determinante en la regulación de la biosíntesis de antocianinas en la berenjena (Yang *et al.*, 2022), (Zhang *et al.*, 2014).

Por otro lado, relacionado con la coloración de la piel del fruto, ésta puede mostrar una distribución uniforme de clorofila o un reticulado verde irregular llamado *netting* (Tigchelaar, Janick y Erickson, 1968), el cual se asemeja al fenotipo de hombro verde en tomate, donde se ha establecido el papel del *GLK2* la reticulación verde del fruto, promoviendo así el desarrollo de cloroplastos y la biosíntesis de clorofila en los frutos (Jia *et al.*, 2020).

En el presente proyecto, se ha querido investigar el papel y el modo de acción de estos factores de transcripción en la regulación de la coloración del fruto en berenjena.

En cuanto al fenotipo del *netting* y al papel de *GLK2* en él, para el análisis de expresión de los genes de la familia GOLDEN2-LIKE; *GLK1* y *GLK2*, en diferentes tejidos de *S.insanum*, nos basamos en los estudios realizados en tomate, donde *GLK1* se expresa predominantemente en tejidos vegetativos (Powell *et al.*, 2012) y *GLK2* se expresa en fruto y está implicado en la reticulación del mismo (Jia *et al.*, 2020). Nuestros resultados confirman que, este patrón de expresión es parecido en berenjena, acumulándose los transcritos de *SiGLK1* y *SiGLK2* en hojas, raíces y flores, pero solo los de *SiGLK2* se acumulan en el fruto, lo cual sugiere que, al igual que en tomate, de los dos parálogos, sólo *GLK2* puede ser responsable del fenotipo de *netting* en berenjena. Este resultado, sumado a los análisis genéticos realizados previamente en el laboratorio, donde se vio que la pérdida del *netting* está asociada a una mutación que causa la presencia de un codón stop prematuro en *GLK2* (Arrones *et al.*, 2023), indica que este gen es el responsable del *netting* en el fruto.

Una vez confirmada la implicación del *GLK2* en el *netting* del fruto, se clonaron los alelos wt y mutados de *GLK2* para confirmar la presencia de las mutaciones en variedades con y sin *netting* y para hacer experimentos de interacción que ayuden a dilucidar el modo de acción de la proteína. En concreto, se clonó el alelo mutante del gen *GLK2* de variedad ASI-S-1, (sin *netting*), y el alelo silvestre de *S.insanum*, con *netting*.

En primer lugar, para llevarlos a cabo, se clonó el gen en el vector pCR8/GW/TOPO, que sirvió para la secuenciación para confirmar la presencia de las mutaciones y como vector de entrada para los siguientes clonajes.

Para en un futuro poder llevar a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos de proteínas de la piel del fruto de berenjena, se clonó el alelo mutante *glk2-mut* en el pet51b(+) mediante Gibson Assembly *Glk2-mut*. En el futuro, se clonará también el alelo *GLK2-wt* del mismo modo y se procederá a hacer los ensayos de co-inmunoprecipitación.

Por lo que se refiere al segundo experimento de interacción, ensayos en *A. thaliana*, demostraron que la dimerización *AtGLK1* es necesaria para llevar a cabo su función (Kim *et al.*, 2023). Además, anteriormente, Fitter *et al.*, 2002, ya sugirió la interacción de *AtGLK1* y de *AtGLK2*, se quiso comprobar si en berenjena *GLK2* también debía dimerizar, mediante ensayos Y2H. Hasta el momento no hemos obtenido resultados concluyentes, pero se han probado diferentes condiciones para poner a punto los ensayos. En el primer experimento, solo hubo crecimiento en 2 de las 7 transformaciones realizadas, por lo que se consideró que la cantidad de células competentes MaV203

utilizadas no era suficiente. En el segundo intento, se aumentó la cantidad de células de partida y obtuvimos crecimiento con todas las transformaciones, pero éste fue confluyente, por lo que la cantidad de células en esta ocasión fue excesiva. En la tercera y última repetición, conseguimos crecimiento con las transformaciones 2,3, 5 y 6. Pero los ensayos con X-Gal no fueron válidos, ya que ninguna colonia viró a azul, como era de esperar al menos en los controles. Por ello dedujimos que el X-Gal podría estar degradado y pasamos a ensayos de auxotrofia. Estos resultados tampoco cumplieron nuestras expectativas, ya que hubo crecimiento en todas las placas por igual, SC-Leu-Trp-His y SC-Leu-Trp-Ura, para las 4 transformaciones, siendo la transformación 2, un control de interacción positivo fuerte y la 3, débil. Para el cribado de interacciones por auxotrofia en ocasiones es necesario utilizar compuestos que aumentan la astringencia del ensayo (p.e. 3-amino triazol, 3AT, en el caso de la auxotrofia de histidina) y ayudan a eliminar los falsos positivos. En el futuro, se utilizará un nuevo stock de X-Gal y se incluirán estrategias para aumentar la astringencia de las auxotrofias.

En cuanto a los resultados del papel del *MYB113* en la síntesis de antocianinas en función de la luz, estudios de BSA-seq realizados previamente en el laboratorio (Gomis-Cebolla et al., en preparación) determinaron que había una región en el cromosoma 1 y una región en el cromosoma 10 que podrían contener genes implicados en el carácter PUC. Además, estas regiones habían sido seleccionadas también en estudios de otros autores (p.e. Mangino et al., 2022), y especialmente la del cromosoma 10 parecía tener un papel relevante en el control del carácter. Ambas regiones contenían sendos parálogos del *MYB113*, gen que se sabe que está implicado en la síntesis de antocianinas, por lo que podrían ser candidatos a controlar el carácter del PUC, en caso que una mutación en estos genes hubiera desacoplado su expresión del control de la luz (p.e. una mutación en una región reguladora). Por tanto, como primer paso se quiso determinar si estos genes se expresaban en fruto y si su patrón de expresión podía ser compatible con un papel en la fotoinsensibilidad. Para ello, se usaron muestras de la piel de las variedades ASI-S-1 e IVIA-371. En primer lugar, se usaron muestras de piel morada de las berenjenas, expuestas a la luz en todo el ciclo de crecimiento, en las cuales no conseguimos amplificar el gen *MYB113* del chr 10, (Mangino et al., 2022). Esto podría indicar que o bien este gen no puede estar implicado en el carácter de fotoinsensibilidad porque no se expresa en fruto, o bien que los tiempos de muestreo habían sido inadecuados para revelar su expresión, quizás porque en el estadio seleccionado ya se habían acumulado una gran cantidad de antocianinas y quizás eso llevaba a la represión del *MYB113* por acumulación de producto. Existen evidencias de que la inducción de estos factores se daba a tiempos cortos de exposición solar, por lo que se recogieron muestras de las variedades de ASI-S-1 (fotosensible) embolsadas durante 10 días, obteniendo muestras de piel a condiciones de 0h, 4h y 1 día de exposición solar y de IVIA-371 (fotoinsensible), sin ningún tratamiento. En esta ocasión, tampoco observamos expresión del parálogo *MYB113* del chr 10, pero sí el del chr1.

Esto indica que el parálogo del cromosoma 10 no está implicado en el carácter de fotoinsensibilidad, ya que no se expresa en fruto ni en variedades fotosensibles ni en fotoinsensibles. Respecto al parálogo del cromosoma 1, sí pudimos observar expresión en fruto tanto en la variedad fotosensible (ASI-S-1) como en la fotoinsensible. Sin embargo, por problemas técnicos no pudimos comparar muestras biológicamente equivalentes de ambas variedades, por lo que no se pudo determinar si el patrón de expresión en la variedad fotoinsensible apoya un papel de este gen en el fenotipo.

Aunque el resultado para el *MYB113*-ch1 sea negativo, ya que hemos descartado que este gen esté implicado en el carácter de la fotoinsensibilidad, es una información relevante porque al ser el *MYB113* un regulador maestro de la síntesis de antocianinas, era un candidato muy atractivo, y el descartarlo permite formular hipótesis alternativas respecto al control del carácter.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En el presente estudio, hemos confirmado que *GLK2* es el responsable del *netting* en berenjena, ya que *GLK1* se expresa sólo en los tejidos vegetativos y estudios genéticos previos apoyan también su implicación (Arrones et al., 2023). En cuanto a su modo de acción, hemos puesto a punto el protocolo de interacción con levaduras Y2H, y en el futuro, se estudiará si, al igual que en *A.thalina*, *GLK2*, debe dimerizar para llevar a cabo su función de unión al DNA.

Además, se han generado plásmidos con el alelo *glk2-mut*, en el vector pet51b(+). Esto nos permitirá realizar diferentes experimentos, por un lado, la expresión de proteína heteróloga para ser usada como control para análisis de Western Blot, y por otro, para ensayos de co-inmunoprecipitación de extractos proteicos de piel de berenjena y análisis LC/MSMS para revelar interactores de *GLK2* que nos permitan entender mejor cómo desempeña su función.

Con respecto a la síntesis de antocianinas independiente de la luz, no hemos podido identificar el gen mayor responsable encargado, pero sí hemos podido descartar el factor de transcripción *MYB113* del chr 10, el cual se creía posible responsable, ya que no se expresa en el tejido correcto, el fruto. Además, el similar patrón de expresión del *MYB113* del chr 1 entre variedades fotosensibles y fotoinsensibles, sugiere que este gen tampoco es el responsable del carácter PUC.

Esta investigación no solo amplía nuestro molecular conocimiento sobre la regulación genética de la fotosíntesis y el desarrollo de cloroplastos, así como, la de biosíntesis de antocianinas, sino que también puede tener implicaciones prácticas en la mejora de la calidad nutricional y visual de los frutos de berenjena mediante la manipulación genética de estos factores de transcripción.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alkurd, R., Taktur, H. and Al-Sayyed, H. (2008) 'Tannin contents of selected plants used in Jordan', *Jord. J. Agric. Sci.*, 4, pp. 265–274.
- Arrones, A. *et al.* (2023) 'The irregular fruit green netting: An eggplant domestication trait controlled by the SmGLK2 gene with implications in fruit colour diversification', *bioRxiv*. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/early/2023/06/30/2023.06.28.546667>.
- Benke, K. K. and Benke, K. E. (2014) 'Experimental Design Issue for Assessment of Carotenoids Lutein and Zeaxanthin in Age-Related Eye Disease Study 2 Formulation for Age-Related Macular Degeneration', *JAMA Ophthalmology*, 132(7), p. 904. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.1768.
- Blankemeyer, J. T. *et al.* (1998) 'Developmental Toxicology of Solamargine and Solasonine Glycoalkaloids in Frog Embryos', *Food and Chemical Toxicology*, 36(5), pp. 383–389. doi: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00164-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00164-6).
- Chapman, M. A. (2019) 'Introduction: The Importance of Eggplant BT - The Eggplant Genome', in Chapman, M. A. (ed.). Cham: Springer International Publishing, pp. 1–10. doi: 10.1007/978-3-319-99208-2_1.
- Daunay, M.-C. *et al.* (2004) *Eggplant (Solanum melongena) fruit colour: pigments, measurements and genetics*.
- Ding, X. *et al.* (2013) 'Purification, antitumor activity in vitro of steroidal glycoalkaloids from black nightshade (*Solanum nigrum* L.)', *Food Chemistry*, 141(2), pp. 1181–1186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.062>.
- Dranca, F. and Oroian, M. (2016) 'Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel', *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, pp. 637–646. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.008>.
- Dubos, C. *et al.* (2010) 'MYB transcription factors in Arabidopsis', *Trends in Plant Science*, 15(10), pp. 573–581. doi: 10.1016/j.tplants.2010.06.005.
- Eich, E. (2008) 'Classification and System in Solanales BT - Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)', in Eich, E. (ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 11–31. doi: 10.1007/978-3-540-74541-9_2.
- FAO (2023) *Crops and livestock products, Faostat*. Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (Accessed: 02 February 2024).
- Fitter, D. W. *et al.* (2002) 'GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species', *Plant Journal*, 31(6), pp. 713–727. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01390.x.
- Gajewski, M., Katarzyna, K. and Bajer, M. (2009) 'The influence of postharvest storage on quality characteristics of fruit of eggplant cultivars', *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(2), pp. 200–205.
- Gonzali, S., Mazzucato, A. and Perata, P. (2009) 'Purple as a tomato: towards high anthocyanin tomatoes', *Trends in Plant Science*, 14(5), pp. 237–241. doi: 10.1016/j.tplants.2009.02.001.
- Gramazio, P. *et al.* (2019) 'Whole-Genome Resequencing of Seven Eggplant (*Solanum melongena*)

and One Wild Relative (*S. incanum*) Accessions Provides New Insights and Breeding Tools for Eggplant Enhancement’, *Frontiers in Plant Science*, 10(October), pp. 1–17. doi: 10.3389/fpls.2019.01220.

Gürbüz, N. *et al.* (2018) ‘Health benefits and bioactive compounds of eggplant’, *Food Chemistry*, 268(June), pp. 602–610. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.093.

He, Y. *et al.* (2019) ‘Comparative transcription analysis of photosensitive and non-photosensitive eggplants to identify genes involved in dark regulated anthocyanin synthesis’, *BMC Genomics*, 20(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12864-019-6023-4.

Hichri, I. *et al.* (2011) ‘Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway’, *Journal of Experimental Botany*, 62(8), pp. 2465–2483. doi: 10.1093/jxb/erq442.

Hirakawa, H. *et al.* (2014) ‘Draft Genome Sequence of Eggplant (*Solanum melongena* L.): the Representative *Solanum* Species Indigenous to the Old World’, *DNA Research*, 21(6), pp. 649–660. doi: 10.1093/dnares/dsu027.

Hortoinfo (2023a) *España es el mayor Exportador Mundial de Berenjena*, Hortoinfo. Available at: <https://hortoinfo.es/espana-es-el-mayor-exportador-mundial-de-berenjena-al-vender-el-3323-del-total/> (Accessed: 02 February 2024).

Huang, Z. *et al.* (2007) ‘Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States’, *Food Chemistry*, 103(4), pp. 1395–1402. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.077>.

Jia, T. *et al.* (2020) ‘Progress on understanding transcriptional regulation of chloroplast development in fleshy fruit’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms21186951.

Jiang, M. *et al.* (2016) ‘Novel insight into the mechanism underlying light-controlled anthocyanin accumulation in eggplant (*Solanum melongena* L.)’, *Plant Science*, 249, pp. 46–58. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.04.001.

Kim, N. *et al.* (2023) ‘Shade represses photosynthetic genes by disrupting the DNA binding of GOLDEN2-LIKE1.’, *Plant physiology*, 191(4), pp. 2334–2352. doi: 10.1093/plphys/kiad029.

Lezama-Dávila, C. M. *et al.* (2016) ‘A new antileishmanial preparation of combined solamargine and solasonine heals cutaneous leishmaniasis through different immunochemical pathways’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), pp. 2732–2738. doi: 10.1128/AAC.02804-15.

Li, J. *et al.* (2018) ‘Correction: Transcriptome profiling of genes related to light-induced anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) before purple color becomes evident [BMC Genomics., 19, (2018) (201)] DOI: 10.1186/s12864-018-4587-z’, *BMC Genomics*, 19(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12864-018-4693-y.

Li, J. *et al.* (2023) ‘RNA-sequencing analysis reveals novel genes involved in the different peel color formation in eggplant’, *Horticulture Research*, 10(10). doi: 10.1093/hr/uhad181.

Li, S. *et al.* (2022) ‘New insights on the regulation of anthocyanin biosynthesis in purple Solanaceous fruit vegetables’, *Scientia Horticulturae*, 297(January), p. 110917. doi:10.1016/j.scienta.2022.110917.

Liu, Y. *et al.* (2018) ‘Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: A review’, *Frontiers in Chemistry*, 6(MAR). doi: 10.3389/fchem.2018.00052.

- Lobo, V. *et al.* (2010) 'Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health', *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), pp. 118–126. doi: 10.4103/0973-7847.70902.
- Lupi, A. C. D. *et al.* (2019) 'Solanum lycopersicum GOLDEN 2-LIKE 2 transcription factor affects fruit quality in a light- and auxin-dependent manner', *PLoS ONE*, 14(2), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0212224.
- Ma, Y. *et al.* (2021) 'Light induced regulation pathway of anthocyanin biosynthesis in plants', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20). doi: 10.3390/ijms222011116.
- Mangino, G. *et al.* (2022) 'Newly Developed MAGIC Population Allows Identification of Strong Associations and Candidate Genes for Anthocyanin Pigmentation in Eggplant', *Frontiers in Plant Science*, 13(March), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2022.847789.
- Meyer, R. S. *et al.* (2014) 'Comparing Medicinal Uses of Eggplant and Related Solanaceae in China, India, and the Philippines Suggests the Independent Development of Uses, Cultural Diffusion, and Recent Species Substitutions', *Economic Botany*, 68(2), pp. 137–152. doi: 10.1007/s12231-014-9267-6.
- Nisha, P., Abdul Nazar, P. and Jayamurthy, P. (2009) 'A comparative study on antioxidant activities of different varieties of Solanum melongena', *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), pp. 2640–2644. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.026>.
- Pojer, E. *et al.* (2013) 'The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), pp. 483–508. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12024>.
- Powell, ann I. t. *et al.* (2012) 'Uniform ripening Encodes a Golden 2-like Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development', *Science*, 336(June), pp. 1711–1715. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3967027&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Qiao J, Liu J, Li S, W. L. (2022) 'Prediction of fruit color genes under the calyx of eggplant based on genome-wide resequencing in an extreme mixing pool.', *Acta Horticulturae Sinica*. *Acta Horticulturae Sinica*, pp. 613–621. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2021-0018.
- Santiago Jimenez, J. (2012) 'Factores de Transcripcion Myb : Reguladores de Sistemas Genomicos', 4(1), pp. 27–30.
- Stommel, J. R. and Dumm, J. M. (2015) 'Coordinated regulation of biosynthetic and regulatory genes coincides with anthocyanin accumulation in developing eggplant fruit', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 140(2), pp. 129–135. doi: 10.21273/jashs.140.2.129.
- Sudheesh, S. *et al.* (1997) 'Hypolipidemic effect of flavonoids from Solanum melongena', *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(4), pp. 321–330. doi: 10.1023/A:1007965927434.
- Sun, L. *et al.* (2011) 'Solamargine, a steroidal alkaloid glycoside, induces oncosis in human K562 leukemia and squamous cell carcinoma KB cells', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(4), pp. 813–821. doi: 10.1007/s00280-010-1387-9.
- Swarup, V. (1995) 'GENETIC RESOURCES AND BREEDING OF AUBERGINE (SOLANUM MELONGENA L.)', pp. 71–79.

- Taher, D. *et al.* (2017) 'World vegetable center eggplant collection: Origin, composition, seed dissemination and utilization in breeding', *Frontiers in Plant Science*, 8(August), pp. 1–12. doi: 10.3389/fpls.2017.01484.
- Tigchelaar, E. C., Janick, J. and Erickson, H. T. (1968) 'Genetics of Anthocyanin Coloration in Eggplant (*Solanum Melongena L.*)', *Genetics*, 60(3), pp. 475–491. doi: 10.1093/genetics/60.3.475.
- Toppino, L. *et al.* (2016) 'Mapping quantitative trait loci affecting biochemical and morphological fruit properties in eggplant (*Solanum melongena L.*)', *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016), pp. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2016.00256.
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2015) 'Anthocyanins. Advances in Nutrition', *American Society for Nutrition*, (8), pp. 620–622. doi: 10.3945/an.115.009233.Clinical.
- Yang, G. *et al.* (2022) 'SmMYB113 Is a Key Transcription Factor Responsible for Compositional Variation of Anthocyanin and Color Diversity Among Eggplant Peels', *Frontiers in Plant Science*, 13(March), pp. 1–10. doi: 10.3389/fpls.2022.843996.
- Zhang, Y. *et al.* (2014) 'Anthocyanin Accumulation and Molecular Analysis of Anthocyanin Biosynthesis-Associated Genes in Eggplant (*Solanum melongena L.*)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), pp. 2906–2912. doi: 10.1021/jf404574c.
- Zhou, X. *et al.* (2021) 'Extensive transcriptome changes underlying the fruit skin colour intensity variation in purple eggplant', *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(3), pp. 1–14. doi: 10.15835/nbha49312434.
- Zhou, X. *et al.* (2022) 'Integrated Metabolome and Transcriptome Analysis Reveals a Regulatory Network of Fruit Peel Pigmentation in Eggplant (*Solanum melongena L.*)', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21). doi: 10.3390/ijms232113475.

8. ANEXO I.

8.1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.		X		
ODS 2. Hambre cero.		X		
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.	X			
ODS 5. Igualdad de género.		X		
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.		X		
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.			X	
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.			X	

Tabla 21. Grado de relación del trabajo final de máster con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).