

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

***CARACTERITZACIÓ MOLECULAR D'UNA COLECCIÓ D'ESPÈCIES  
SILVESTRES RELACIONADES AMB L'ALBERGÍNIA (*S. melongena*)  
EMPRANT LES NOVES TECNOLOGIES DE SEQÜENCIACIÓ.***

TREBALL FI DE GRAU EN BIOTECNOLOGIA

ALUMNE: DIONÍS BORRÀS PALOMARES

TUTOR: SANTIAGO VILANOVA NAVARRO

*Curs Acadèmic: 2013-2014*

VALENCIA, 1 DE SETEMBRE DE 2014

# CARACTERITZACIÓ MOLECULAR D'UNA COLECCIÓ D'ESPÈCIES SILVESTRES RELACIONADES AMB L'ALBERGÍNIA (*S. melongena*) EMPRANT LES NOVES TECNOLOGIES DE SEQÜENCIACIÓ.

## Abstract

The eggplant (*Solanum melongena*) has been cultivated for centuries all over the world and nowadays is one of the most economical important cultivars. The relationship between the wild and the cultivated version of *Solanum melongena* has been controversial. It is likely that the consumed eggplant today is the result of the domestication of wild species *Solanum incanum*. On the other hand the existence of a flux of forms makes unclear the limits between *Solanum melongena* and its wild relative taxons. The domestication of the cultivated species has ended with a genetic impoverishment and therefore making the eggplant susceptible to many diseases. In this context the wild related species have an interesting role as they are a source of genetic and allelic variation for different important traits. The detailed molecular characterization of germplasm collections will allow us to study the diversity and even identifying potentially interesting accessions for breeding and also to improve the conservation and handle germplasm strategies design. Here we have characterized 48 accessions belonging to the species *S. aethiopicum*, *S. anguivi*, *S. macrocarpon*, *S. dasyphyllum* and *S. incanum* by the use of 39 SNPs markers. The PCoA and cluster analysis are able to distinguish the species between and within them. Moreover, the obtained results also confirm that the SNPs selected from the transcriptomes of *S. incanum* and *S. aethiopicum* are indeed real, which in the future will allow us to use them in massive genotyping platforms such SNPplex.

## Resum

L'albergínia (*Solanum melongena*) ha sigut cultivada durant segles a tot arreu del món i actualment és un dels cultius amb més importància econòmica. La relació entre la versió salvatge, semi-domèstica i cultivada de *Solanum melongena* ha sigut sempre motiu de controvèrsia. És versemblant que l'albergínia que es consumeix en l'actualitat siga conseqüència de la domesticació de l'espècie silvestre *Solanum incanum*. Per una altra part, la existència d'una successió continua de formes fa que els límits entre taxons moltes vegades no siga massa clar entre albergínia i les seues espècies relacionades. La domesticació de les espècies cultivades ha provocat un empobriment genètic fins al punt en que l'albergínia d'avui dia és susceptible a nombroses malalties i plagues. És en aquest context on les espècies silvestres relacionades tenen un paper interessant, i és que aquestes han mostrat ser una reserva important de variabilitat genètica i variació al·lèlica per a caràcters d'interès agronòmic i característiques qualitatives tant de la planta com del fruit. La caracterització molecular detallada de col·leccions de germoplasma ens permetrà estudiar la diversitat a més de permetre'ns identificar accessions potencialment interessants per a la selecció i millora a banda de l'elaboració d'estratègies per a la conservació i maneig del germoplasma. En aquest treball s'han caracteritzat 48 accessions pertanyents a les espècies *S. aethiopicum*, *S. anguivi*, *S. macrocarpon*, *S. dasyphyllum* i *S. incanum* mitjançant l'ús de 39 marcadors SNPs. Els anàlisis de PCoA i clúster diferencien les espècies entre elles a més de mostrar la variabilitat genètica existent dins d'elles. D'altra banda, els resultats obtinguts en aquest treball també confirmen

que els SNPs seleccionats a partir dels transcriptomes de *S. incanum* i *S. aethiopicum* efectivament són reals, el que ens permetrà en un futur utilitzar-los en plataformes de genotipat massiu com pot ser SNPplex.

**Key words:** Eggplant, *Solanum melongena*, *Solanum aethiopicum*, *Solanum macrocarpon*, SNPs, genetic diversity, High Resolution Melting.

**Paraules clau:** Albergínia, *Solanum melongena*, *Solanum aethiopicum*, *Solanum macrocarpon*, SNPs, diversitat genètica, High Resolution Melting.

*Alumne:* Dionís Borràs Palomares

València, Setembre 2014

*Tutor:* Santiago Vilanova Navarro

# ÍNDEX

<b>1.INTRODUCCIÓ.</b>	1
<b>1.1.IMPORTÀNCIA DE L'ALBERGÍNIA.</b>	1
<b>1.2.ORIGEN, DOMESTICACIÓ I DIFUSIÓ.</b>	1
1.2.1.El complex albergínia.	2
1.2.2.Relació entre espècies.	3
1.2.2.1. <i>Solanum aethiopicum</i> .	3
1.2.2.2. <i>Solanum anguivi</i> .	4
1.2.2.3. <i>Solanum macrocarpon</i> .	4
1.2.2.4. <i>Solanum dasyphyllum</i> .	5
<b>1.3.IMPORTÀNCIA DE LES ESPÈCIES RELACIONADES EN LA MILLORA GENÈTICA.</b>	5
<b>1.4.CARACTERITZACIÓ MOLECULAR.</b>	6
<b>2.OBJECTIUS.</b>	10
<b>3.MATERIAL I MÈTODES.</b>	11
3.1.MATERIAL VEGETAL	11
3.2.EXTRACCIÓ D'ADN.	12
3.3.SELECCIÓ D'SNPS A PARTIR DE TRANSCRIPTOMES SEQÜENCIATS PER NGS.	12
3.4.DISSENY D'ENCEBADORS.	12
3.5.ANÀLISIS D'SNPS PER "HIGH RESOLUTION MELTING" (HRM).	13
3.6.ANÀLISIS DE DADES.	13
<b>4.RESULTATS I DISCUSSIÓ.</b>	16
4.1. CARACTERITZACIÓ D'SNPS: ESTADÍSTICS GENERALS/ ANÀLISI DE MARCADORS.	16
4.2.ANÀLISIS DE DISTÀNCIA GENÈTICA.	19
4.2.1.Anàlisi tipus multivariant PCoA.	19
4.2.1.1.PCoA amb tots els individus.	19
4.2.1.2.PCoA excloent <i>S. incanum</i> i <i>S. melongena</i> .	20

4.2.2.Anàlisi tipus clúster.	22
4.2.2.1.Dendograma amb tots els individus.	22
4.2.2.2.Dendograma excloent <i>S. incanum</i> i <i>S. melongena</i> .	22
<b>5.CONCLUSIONS.</b>	25
<b>6.BIBLIOGRAFIA.</b>	26

## ÍNDIX DE TAULES

**Taula 1.** Quadre d'identificació d'entrades que s'han emprat per a dur a terme els experiments.

**Taula 2.** Taula resum: Transcrit *S. incanum*, Marcador COSII, Grup de Lligament, Posició en el mapa genètic, Al·lels: *S. aethiopicum*, *S. incanum* i *S. melongena*.

**Taula 3.** Llista d'encebadors per a avaluar la diversitat genètica en *Solanum*.

**Taula 4.** Resum de la variació genètica dels 35 loci avaluats

## ÍNDIX DE FIGURES

**Figura 1.** Distribució de les formes del "complex Albergínia".

**Figura 2.** Fruit representatiu de cadascun dels grups que conformen *S. Aethiopicum*:  
Aculeatum , Gilo ,Kumba ,i Shum .

**Figura 3.** Fruit representatiu dels individus intermedis entre *S. aethiopicum* i *S. anguivi*, *S. anguivi* , *S. macrocarpon* i *S. dasyphyllum*.

**Figura 4.** Anàlisi HRM.

**Figura 5.** Càlcul del contingut d'informació polimòrfica (PIC)

**Figura 6.** Càlcul de l'heterozigocitat esperada o divergència genètica

**Figura 7.** Anàlisi de corbes d'HRM

**Figura 8.** PCoA de tots els individus

**Figura 9.** PCoA excloent *S. incanum* i *S. melongena*.

**Figura 10.** Dendrograma de tots els individus

**Figura 11.** Dendrograma excloent *S. incanum* i *S. melongena*.

## **ABREVIACIONS**

**ADN:** Àcid desoxiribonucleic

**AFLP:** Amplified Fragment Length Polymorphis

**COMAV:** l'Institut de Conservació i Millora de l'Agrodiversitat Valenciana

**CTAB:** Cetil-Trimetil Amonium Bromure

**HRM:** High Resolution Melting

**INRA:** l' Institut National de la Recherche Agronomique

**ISSR:** Intersimple Sequence Repeats

**NGS:** Next Generation Sequencing

**PCoA:** Principal Coordinates Analysis

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PIC:** Polymorphic Information Content

**RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism

**SCAR:** Sequence Characterized Amplified Region

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism

**SSR:** Simple Sequence Repeats o microsatèl·lits

**TGS:** Third Generation Sequencing

# **1.INTRODUCCIÓ**



## 1.1.IMPORTÀNCIA DE L'ALBERGÍNIA

L'albergínia (*Solanum melongena* L.) ha sigut cultivada durant segles a tot arreu del món i actualment és un dels cultius amb més importància econòmica. En els seus orígens es cultivava a camp obert sota condicions d'humitat i calor. Actualment és cultivada sota diferents condicions incloent hivernacles d'hivern en climes temperats.

Pel que fa al seu valor nutricional, l'albergínia és una bona font de Calci, Fòsfor, Ferro i vitamines del Grup B. A més a més és apropiada per a aquells que pateixen de problemes hepàtics així com problemes de colesterol ja que conté altes concentracions d'àcids poliinsaturats com ara l'àcid linoleic. D'altra banda, aquest vegetal té un elevat contingut de polifenols, en concret d'àcid clorogènic. Aquests són beneficiosos per a la salut humana a causa de les seues activitats biològiques conegudes com ara l'eliminació de radicals lliures, la regulació de l'activitat enzimàtica i la modulació de diverses rutes de senyalització (Sato i col., 2011; Flick i col., 1978; Lorenz i Maynard, 1988; Baixauli, 2000)

## 1.2.ORIGEN, DOMESTICACIÓ I DIFUSIÓ

L'origen de la majoria de Solanàcies i concretament les espècies domesticades del gènere *Solanum* es troba al continent americà. En canvi, l'albergínia i les seues espècies relacionades, no comparteixen aquest tret característic de la major part de Solanàcies sinó que com descriu Daunay i col. (2001a) tenen el seu origen en el Vell món.

La relació entre la versió salvatge, semi-domèstica i cultivada de *Solanum melongena* ha sigut sempre motiu de controvèrsia. És versemblant que l'albergínia que es consumeix en l'actualitat siga conseqüència de la domesticació de l'espècie silvestre *Solanum incanum* (Prohens i col., 2013). Ambdues espècies presenten moltes similituds morfològiques a més de ser possible l'obtenció d'híbrids entre les dues espècies completament fèrtils i amb meiosis regular (Anis i col., 1994). D'altres estudis com ara el de Behara i col. (2006), després d'haver dut a terme un anàlisi de diversitat mitjançant l'ús de marcadors microsatèl·lits entre diferents accessions de *S. melongena*, *S. incanum* i *S. insanum*, entre d'altres, van observar que *S. melongena* i *S. incanum* presentaven una elevada similitud la qual cosa recolzaria la hipòtesi de *S. incanum* com a avantpassat de *S. melongena*.

Respecte a l'evolució i patrons de migració d'aquest cultiu tampoc és massa clar. Recentment s'han obtingut evidències de que les albergínies van sorgir a Àfrica i es van dispersar al llarg de tot l'Orient Mitjà fins a Àsia (Weese i Bohs, 2010).

Hi han diverses hipòtesis al respecte de la migració de *S. incanum* i domesticació d'aquesta. Hi ha científics que proposen que *S. incanum* va seguir a l'ésser humà en el seu desplaçament des de l'Orient Mitjà fins a l'Índia (Lester i Hasan, 1990). D'altres en canvi creuen que les fruites d'espècies silvestres emparentades amb l'albergínia podrien haver arribat des d'Àfrica fins a l'Índia arrastrades per les corrents marines (D'Arcy i Pickett, 1991). La teoria més arrelada és la que considera l'Índia com a centre primari de variació. En aquesta regió es troba una abundant variació de formes cultivades, modernes, primitives i formes adventícies. Xina i la regió mediterrània serien centres secundaris de variació.

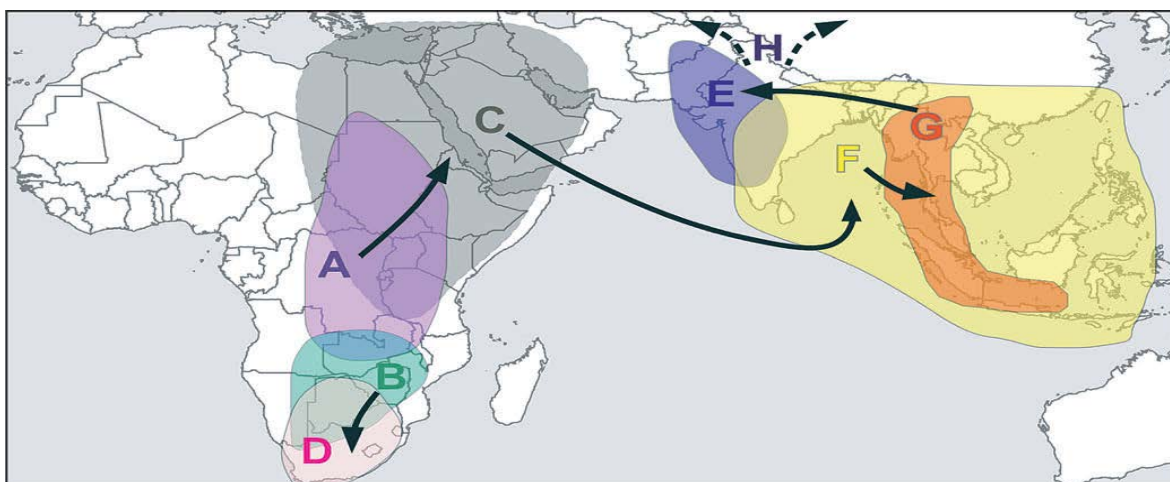
### 1.2.1.El complex albergínia

L'espècie cultivada *S. melongena* juntament amb les formes adventícies del sud-est asiàtic, conegudes com a *S. melongena* var. *insanum*, y l'espècie silvestre *S. incanum* formen el denominat "complex albergínia" (Pearce i Lester, 1979; Lestery i Hasan, 1991; Daunay *i col.*, 1997; Knapp *i col.* 2013; Plazas *i col.*, 2014). Les plantes silvestres, males herbes i els cultivars primitius que formen el complex albergínia es troben distribuïdes al llarg d'Àfrica, Orient mitjà, Índia i Xina.

Pel que fa a *S. Incanum*, la majoria de les seues formes primitives es van originar en les regions equatorianes de l'Est de la Sabana Africana (Lester i Hasan, 1991). La diversitat de topografies, climes i sòls va propiciar l'evolució dels distints ecotips existents en l'actualitat. Aquests taxons africans són morfològicament variables i estan ubicats en diferents hàbits ecològics que van des dels boscos equatorials de la sabana fins a proximitats de deserts, la qual cosa podria indicar que poblacions individuals s'han adaptat a les condicions ambientals locals (Weese i Bohs, 2010).

El complex albergínia es divideix en 8 grups dels quals 4 d'aquests (A, B, C i D) engloben l'espècie *S. incanum* considerada en sentit ampli. D'altra banda els altres quatre grups engloben l'espècie *S. melongena* incloent a la varietat *insanum*. Els grups A (comprèn l'espècie *S. campylacanthum*) i B (comprèn l'espècie *S. panduriforme*) estan formats per plantes silvestres que es troben en la regió de l'Est i el Sud d'Àfrica. D'altra banda, al grup C es troba *S. incanum* en sentit estricte. Per últim, al grup D s'engloben les formes corresponents a *Solanum lichtensteinii*.

Quant als grups que engloben l'espècie *S. melongena*, el grup E està format per plantes *Solanum melongena* var. *Insanum*. Aquestes plantes són molt punxoses i no tenen un creixement massa pronunciat. Pel que fa a la seua localització, es poden trobar de forma adventícia en camps oberts. El grup F en canvi, comprèn formes moderadament punxoses que creixen com a adventícies en horts, zones de vegetació modificada i vores de camins. El grup G correspon a cultivars primitius, però que encara es cultiven àmpliament en el Sud-est asiàtic. El grup H correspon amb cultivars moderns d'albergínia i es troben distribuïts per tot arreu (Figura 1).



**Figura 1.** Distribució de les formes del "complex Albergínia" (Weese y Bohs, 2010). El grup H no s'inclou ja que correspon a les varietats modernes d'albergínia amb distribució mundial.

### 1.2.2.Relació entre espècies

L'existència d'una successió continua de formes fa que els límits entre taxons moltes vegades no siga massa clar entre albergínia i espècies relacionades. Com ja s'ha dit anteriorment hi ha estudis que senyalen que *S. incanum* és l'espècie més estretament relacionada amb *S. melongena* (Prohens i col., 2013). Aquesta espècie es distribueix per l'Est d'Àfrica i l'Orient Mitjà. És punxosa, de grans flors hermafrodites o masculines, que produeixen baies arrodonides, groguenques en la maduresa i que es troben solitàries o en grups de 2 a 6 flors per inflorescència.

Entre les espècies emparentades amb l'albergínia hi ha dos africanes cultivades, *S. aethiopicum* i *S. macrocarpon* (Polignano i col., 2010; Sunseri i col, 2010). Aquestes no són massa conegudes a Europa però a l'Àfrica Occidental s'utilitzen tant per la seua fruita com per la seua fulla. Aquest materials són clau per a l'aportació de variabilitat genètica en els processos de millora de l'albergínia a més de permetre'ns l'ampliació de la base genètica d'aquest cultiu, doncs moltes de aquestes espècies presenten resistència a *Verticillium* i a nemàtods.

Pel que fa a les principals diferències entre aquestes tres espècies s'aprecia que *S. melongena* té vellositats a les fulles mentre que *S. macrocarpon* té les fulles glabres. Quant a les fulles de *S. aethiopicum* poden ser tant velloses com glabres (Schippers, 2001). D'altra banda les flors de *S. melongena* són morades a l'igual que *S. macrocarpon*, aquestes últimes solen ser allargades, mentre que les flors de *S. aethiopicum* presenta flors blanques i petites. Un altre tret interessant que varia entre aquestes espècies és el color de la fruita ja que *S. melongena* presenta fruites grogues en la maduresa, mentre que *S. aethiopicum* les presenta taronja que tendeix a roig. En canvi *S. macrocarpon* presenta unes fruites grogues que tendeixen a marró.

#### 1.2.2.1.Solanum aethiopicum

Taxonòmicament pertanyen al gènere *Solanum*, subgènere *Leptostemonum* i secció *Oliganthes* i compren quatre grups: shum, kumba, gilo i aculeatum (Polignano i col.2010; Adeniji et al. 2013) (Figura 2).

##### **El grup Gilo**

Aquest grup és el més comunament cultivat i es pot trobar en diferents formes depenent del criteri local de selecció. En anglès se'l coneix com a "ous de jardí". La majoria de les varietats són ovalades o esfèriques de color blanc o verd en la immaduresa.

##### **El grup Kumba**

Aquest grup es troba en la sabana i zones semiàrides de l'Oest i nord-Oest a països com Nigèria, Senegal o Mali entre d'altres. Les fruites són morfològicament acostellades de mida variant i de color blanc o verd. Algunes varietats són cultivades principalment per les seues fulles que sols poden consumir-se en les primeres etapes abans que s'endurisquen.

### El grup Shum

Aquest grup es troba en les zones més altes i plujoses de molts països de l'oest i del centre d'Àfrica. Les fruites són petites, poden estar solitàries o en grups de fins 8 fruites. Normalment mesuren entre 12-20 mm.

### El grup Aculeatum

Aquest grup es caracteritza per tindre fulles pubescents cobertes amb pèls estrellats. Les plantes són molt espinoses a la tija i les fulles. Pel que fa a les fruites són esfèriques amb 4 o més costelles i de 4 a 10 lòculs.



**Figura 2.** Fruit representatiu de cadascun dels grups que conformen *S. aethiopicum*: aculeatum(A), gilo(B), kumba(C) i shum(D) (Plazas i col., 2014).

#### 1.2.2.2. *Solanum anguivi*

Aquesta espècie pot trobar-se en molts llocs a les zones àrides d'Àfrica. Està considerada l'antecessora de *S. aethiopicum* (Sunseri i col., 2010). Es poden produir creuaments amb normalitat entre *S. anguivi* i tots els grups de *S. aethiopicum* tot i que les plantes obtingudes poden no sobreviure. Quant a la morfologia foliar i de la fruita, aquesta espècie presenta fulles pubescents cobertes amb pèls estrellats concretament en el revers de la fulla. Pel que fa als fruits són petits (1- 2 cm de diàmetre) esfèrics amb dos o tres lòculs.

#### 1.2.2.3. *Solanum macrocarpon*

Junt amb *S. aethiopicum*, *S. macrocarpon* és una de les espècies de albergínia més importants de les zones càlides i no àrides d'Àfrica on es consumeixen pel seu fruit i les seues fulles. És interessant destacar que també es poden trobar cultivars d'aquesta espècie a l'Amèrica del sud, El Carib i el Sud d'Àsia. Les flors de *S. macrocarpon* es distingeixen de *S. aethiopicum* pel fet que els pètals de *macrocarpon* estan soldats. En relació a les fulles, aquestes són brillants i glabres i poden tenir diferents formes i mides. Els fruits de *S. macrocarpon* són aplatats i

recoberts amb una gran part del calze. En la maduresa fisiològica poden variar entre groc i marró.

#### **1.2.2.4. *Solanum dasyphyllum***

Es tracta d'una espècie ancestral que es troba normalment a l'est d'Àfrica. Realment el nom correcte d'aquesta espècie es *S. macrocarpon subsp. dasyphyllum*. És més que probable que *S. sessilistellatum* siga el seu avantpassat silvestre. Aquesta espècie es caracteritza per ser una planta espinosa i pelosa.

*S. dasyphyllum* i *S. macrocarpon* creuen amb facilitat produint híbrids fèrtils, la qual cosa mostra que juntes formarien una espècie biològica (Schippers, R.R., 2000). Accessions amb característiques intermèdies es poden trobar en zones on ambdós cultius estan presents de manera conjunta.



**Figura 3.** Fruit representatiu dels individus intermedis entre *S. aethiopicum* i *S. anguivi* (E), *S. anguivi* (F), *S. macrocarpon* (G) i *S. dasyphyllum* (H) (Plazas i col., 2014).

### **1.3. IMPORTÀNCIA DE LES ESPÈCIES RELACIONADES EN LA MILLORA GENÈTICA**

Des de sempre l'home el que ha buscat mitjançant la domesticació de les espècies cultivades ha sigut plantes vigoroses amb major capacitat de producció, fruites més grans etc. Això ha provocat un empobriment genètic fins al punt en que l'albergínia d'avui dia és susceptible a nombroses malalties i plagues, particularment a bacteries, marceix per fongs i nematodes. Els insectes són els principals causants de la pèrdua de rendiment tant a camp obert com a l'hivernacle (Sihachakr i col., 1994).

És en aquest context on les espècies silvestres relacionades tenen un paper interessant, i és que aquestes han mostrat ser una reserva important de variabilitat genètica i variació al·lèlica per a caràcters d'interès agronòmic i característiques qualitatives tant de la planta com del fruit.

Per exemple, s'ha observat que *S. sisymbriifolium* i *S. torvum* són resistents a la majoria de malalties més severes que afecten a l'albergínia com puga ser la marceix bacterianes i fúngiques transmiseses pel sòl o als insectes *L. orbonalis* i *E. vigintioctopunctata*. O per exemple

*S. aethiopicum* grup gilo o *S. incanum* aporten resistència a *Phomopsis vexans* (Rao, 1981). Per una altra part s'ha observat que *S. aethiopicum* grup *aculeatum* és resistent a *Fusarium solani* i a *Ralstonia* (Daunay i col, 1991; Gousset i col, 2005). *S. macrocarpon* seria una font interessant de resistència a *Tetranychus urticae* (Schaff i col, 1982).

D'altra banda, algunes espècies silvestres han mostrat ser una important font de tolerància als estressos abiòtics. Per exemple s'ha observat que *S. macrocarpon* té elevada tolerància a la sequera, mentre que *S. linnaeanum* mostra tolerància a salinitat.

En el cas de l'albergínia, la controvertida identificació dels seus progenitors i del seu centre d'origen i domesticació (Weese i Bohs, 2010; Meyer i col., 2012) ha sigut un obstacle a l'hora de buscar variabilitat genètica útil pel que es refereix a germoplasma. De fet, tenint en compte l'enorme contribució de l'ús de les espècies silvestres i els progenitors en la millora genètica de solanàcies com la tomaca i el pebre, s'observa que per a l'albergínia el potencial que presenten les seues espècies relacionades no ha sigut quasi explotat.

La caracterització molecular detallada de col·leccions de germoplasma ens permetrà estudiar la diversitat a més de permetre'ns identificar accessions potencialment interessants per a la selecció i millora a banda de l'elaboració d'estratègies per a la conservació i maneig del germoplasma. A més, ja que les albergínies cultivades i les seues espècies silvestres relacionades formen part del "genepool" secundari, la informació de la diversitat genètica podria ser interessant per a millora genètica de l'albergínia comú i al revés, és a dir, introduir a l'albergínia comú caràcters que presenten les seues espècies silvestres relacionades a l'igual que es poden introduir a les espècies silvestres cultivades a l'Àfrica caràcters que presenten les albergínies comú com ara mida del fruit o manca de punxes.

#### 1.4. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR

És més que evident que la classificació botànica basada en aspectes fenotípics com ara la morfologia floral o del fruit, aspecte de les fulles, presència/absència d'espines etc. no és completament consistent. Açò ho podem comprovar revisant la literatura on es fa notar els problemes d'homonímia i sinonímia que donen com a resultat identifications errònies i assumpcions evolutives incoherents. A més, una diferència fenotípica gran no té perquè implicar llunyania genètica. Per exemple, en el cas de la mida del fruit o la forma d'aquest, el control genètic és dut a terme per uns pocs gens. És per tot això que des de fa anys s'han intentat desenvolupar una sèrie de tècniques moleculars amb la finalitat de realitzar anàlisis de diversitat genètica (molecular) i d'aquesta manera complementar aquest tipus de classificacions morfològiques. Aquesta combinació permetria obtenir classificacions molt més realistes que si sols s'utilitzaren aspectes botànics.

Les ferramentes moleculars o marcadors moleculars han anat evolucionant a mesura que la tecnologia ho permetia. A grans trets en aquesta evolució de què parlem es poden distingir tres etapes clares. En la primera trobem marcadors moleculars com els "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLPs). Aquests van ser els primers marcadors moleculars que es van desenvolupar en plantes (Botstein i col., 1980) i representaven un desafiament a més de

consumir molt de temps per a obtenir resultats propicis. Aquests no han sigut molt utilitzats en els estudis de variabilitat en albergínia. No obstant això s'ha demostrat la seua utilitat per a avaluar relacions filogenètiques a nivell interespecífic entre l'albergínia i les espècies relacionades del gènere *Solanum* (Isshiki i col., 2003; Frary i col., 2007)

Més endavant, l'any 1986 va donar inici la segona etapa. Aquest any Kary Mullis va desenvolupar una tècnica anomenada "Polymerase Chain Reaction" coneguda també com a PCR (Bartlett i Stirling, 2003) que va suposar una revolució pel que fa a la biologia molecular i les ferramentes que va generar.

Diferents estratègies van ser més endavant desenvolupades emprant diferents combinacions de PCRs, enzims de restricció i tècniques d'electroforesi.

En aquesta etapa les ferramentes moleculars que es van desenvolupar es poden dividir en dos grups. El primer engloba els marcadors "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) i els "Amplified Fragment Length Polymorphisms" (AFLP). Aquests marcadors tenen en comú que són anònims, és a dir, són marcadors que no requereixen informació prèvia del genoma.

Quant als RAPDs, aquests marcadors han sigut utilitzats principalment per a la construcció de mapes genètics (Nunome i col., 1998; Nunome i col., 2001; Sunseri i col., 2003). No obstant això Karihaloo i col. (1995) van realitzar amb RAPDs un estudi de diversitat genètica on avaluaven les relacions existents entre *S. incanum* i *S. insanum*. Com resultat d'aquest estudi, es va concloure que aquestes no haurien de ser considerades com a espècies distintes, a causa de la seua alta similitud genètica. D'altra banda Singh i col. (2006), amb l'ús de RAPDs van estudiar la diversitat genètica de 28 accessions pertanyents a cinc espècies relacionades amb albergínia. Aquests autors suggereixen l'existència d'un alt nivell de diversitat genètica dins de l'albergínia, així com una estreta relació entre *S. melongena* i *S. incanum*. Per un altre costat Sifau i col. (2014) van emprar aquesta tècnica per a descriure la similitud i diversitat genètica entre un conjunt d'accessions de *Solanum melongena*. Aquests autors van concloure que els anàlisis morfològics combinats amb els anàlisis moleculars podrien permetre una adequada classificació de *S. melongena* i altres espècies del gènere *Solanum*.

Els AFLPs, en canvi, són uns dels marcadors més emprats en estudis de variabilitat a causa de la seua capacitat d'obtindre un nombre elevat de polimorfismes en relativament poc de temps (García-Mas i col., 2000). Els marcadors AFLPs s'han utilitzat exitosament en albergínia per a estudiar la diversitat entre varietats tradicionals (Prohens i col., 2005), examinar les relacions existents entre les varietats cultivades i les seues espècies relacionades (Furini i Wunder 2004), construir mapes genètics (Nunome i col., 2001; Sunseri i col., 2003), en la selecció de parentals per a l'obtenció d'híbrids (Rodríguez-Burruezo i col., 2008) i fins i tot per a genotipar albergínies resistents a *Ralstonia solanacearum* (A. Lebeau i col., 2013).

D'altra banda, el segon grup compren aquells marcadors que sí que requereixen informació prèvia del genoma d'estudi tret que implica una major reproductibilitat. Dintre d'aquest bloc de marcadors trobem els "Sequence Characterized Amplified Region" (SCAR), "Intersimple Sequence Repeats" (ISSRs), els *Simple Sequence Repeats* (SSRs o microsatèl·lits) o els "*Single Nucleotide Polymorphism*" (SNPs).

Els SSRs van ser descrits per primera vegada per Hamada i col. (1982). Els microsatèl·lits, igual que els AFLPs, tenen una àmplia utilitat en diversos tipus d'estudis, però aquests presenten l'avantatge de ser codominants i altament reproduïbles (García-Mas i col., 2000). El primer estudi amb marcadors microsatèl·lits en albergínia va ser efectuat per Nunome i col. (2003a), en el que es va estudiar la idoneïtat de repeticions de dinucleòtids per a la detecció de polimorfisme en albergínia. Així mateix Nunome i col. (2003b), van determinar l'abundància, grandària i distribució de repeticions de tri nucleòtids en el genoma de l'albergínia, i l'eficiència d'aquests com a marcadors moleculars. Posteriorment s'han realitzat diversos estudis de variabilitat genètica en albergínia amb microsatèl·lits (Behera i col., 2006; H Ge i col., 2013).

Per un altra part els SNPs han sorgit com els marcadors més àmpliament utilitzats per al genotipat a causa de la seua abundància en el genoma i la relativa facilitat en la determinació de la seua freqüència de forma rendible i paral·lela en un conjunt d'individus.

Un SNP és una variació en la seqüència d'ADN que ocorre quan un nucleòtid difereix entre membres d'una espècie. Aquest tipus de marcador és co-dominant la qual cosa ens permet discriminar entre individus homocigots i heterocigots. La potència d'aquests marcadors ve donada per la gran quantitat de loci que permet avaluar. Un aspecte interessant dels SNPs és que permeten l'automatització d'alt rendiment la qual cosa permet un genotipat ràpid i eficient d'un gran nombre de mostres.

A diferència dels marcadors SSR, els quals són totalment accessibles per a albergínia, fins fa poc no hi havia cap marcador de tipus SNPs descrit per a l'albergínia (Barchi i col., 2011). Això juntament amb limitacions tècniques i econòmiques feia que l'aplicació de tecnologies d'anàlisi d'SNPs d'alt rendiment estigués limitada.

Cal destacar que en els últims 3 anys ha hagut un canvi de paradigma pel que fa a l'avaluació de variabilitat genètica, i és que s'ha passat d'utilitzar uns pocs marcadors moleculars i cars a aconseguir un genotipat complet dels individus a analitzar a preus assequibles. És a dir, ara és possible seqüenciar el genoma dels individus a analitzar a una velocitat considerable i a un preu raonable. Aquests avanços en les tècniques de seqüenciació massiva han donat inici a la tercera etapa de què parlàvem anteriorment i és gràcies a ells que els SNPs s'alcen com uns dels marcadors moleculars més interessants avui dia.

Aquests marcadors ens han permès dur a termes anàlisis sobre l'extensió i la distribució de la variació genètica al llarg del genoma de diferents espècies a fi d'estudiar la diversitat genètica (Corrado i col, 2013).

Aquests abordatges de seqüenciació massiva són coneguts com "Next-Generation Sequencing" (NGS) i es duen a terme en plataformes com ara Roche/454, Illumina o AB SOLiD. Són capaces de generar desenes de milions de lectures de seqüència a un cost relativament baix. Les NGS estan sent utilitzades d'entre altres aplicacions per a anàlisis tant de transcriptoma com de genoma complet. Recentment noves tècniques basades en les NGS conegudes com a "Third Generation Sequencing" (TGS) estan començant a estar disponibles. Aquestes permeten generar lectures més llargues, en menys temps i inclús més barat.



Una vegada analitzades i assemblades les seqüències mitjançant l'ús de programes informàtics, és possible detectar variants tant de tipus SNPs com microsatèl·lits comparant la informació de diferents individus. Per a confirmar que aquests passos han sigut realitzats correctament, és habitual avaluar un set de marcadors mitjançant altres tècniques.

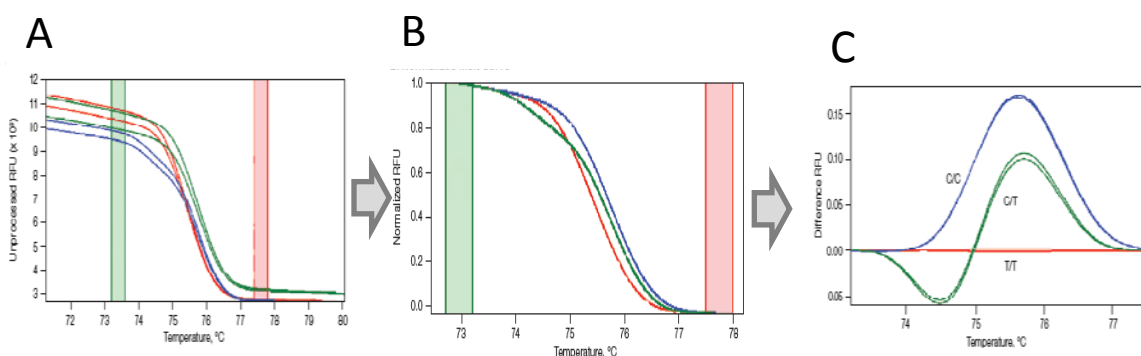
Pel que fa als estudis que empren NGS, no hi ha massa investigacions a dia d'avui dutes a terme en l'albergínia. Yang i col. (2014) han publicat recentment el transcriptoma de *S. melongena*. D'altra banda Delledone i col. (2014) han presentat el primer esborrany de *S. melongena*.

Actualment s'ha desenrotllat una nova tècnica d'anàlisi de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) anomenada "High Resolution Melting" (HRM). La tècnica de HRM pot ser utilitzada en l'anàlisi de SNPs i altres sistemes de marcadors co-dominants.

Aquesta tècnica consisteix en la desnaturalització o fusió gradual dels fragments de PCR i la detecció dels xicotets canvis en la fluorescència conseqüència de la unió del fluoròfor present en la reacció en l'ADN de doble cadena generat en el procés d'amplificació (Wittwer i col., 2003). La mesura es fa a temps real durant la PCR i en un sol pas. L'anàlisi permet una major adquisició de dades perquè l'instrument posseeix un control més precís de la temperatura el que permet una desnaturalització més lenta dels fragments. Tot açò permet detectar xicotetes variacions en les seqüències a través del decreixement de la fluorescència degut la dissociació del fluoròfor a la doble cadena d'ADN (Mackay i col., 2008).

Posteriorment l'anàlisi es basa en la forma de les corbes (Figura 4A) de fusió en compte de la Tm (temperatura de fusió) absoluta. Estes corbes es normalitzen al llarg de la temperatura de canvi per a facilitar la seua diferenciació (Figura 4.B). Açò permet associar-los un genotip a partir de la comparació amb les corresponents corbes dels parentals o referència certificats segons l'estudi (Figura 4.C) (Mackay i col., 2008). Aquesta tècnica ens ofereix els avantatges d'una visualització immediatament després de la PCR (Mader i col., 2008).

En conclusió HRM és una tècnica més eficaç, ràpida, senzilla i sensible que els protocols estàndard per a l'anàlisi d'SNPs (Mader i col., 2008). En aquest sentit, té un gran potencial en l'estudi dels loci que involucren SNPs ampliant el polimorfisme observat i així donant lloc a una percepció més profunda de l'estructura de la població (Kayser et al., 2004).



**Figura 4.** Anàlisi HRM: Corbes de fusió. Fluorescència inicial i final de totes les mostres (Figura 4A). Estes corbes es normalitzen al llarg de la temperatura de canvi per a facilitar la seua diferenciació (Figura 4.B). Açò permet associar-los un genotip a partir de la comparació amb les corresponents corbes dels parentals o referència certificats segons l'estudi (Figura 4.C).

## **2.OBJECTIUS**

1. Selecció de SNPs provinents de la seqüenciació de dos transcriptomes mitjançant NGS
2. Caracterització molecular d'una col·lecció d'entrades de diferents espècies silvestres relacionades amb l'albergínia
3. Optimització de la detecció de SNPs mitjançant la tècnica de "High Resolution Melting"
4. Anàlisi de diversitat genètica, en la col·lecció d'entrades abans anomenada, emprant mètodes multivariant.

### **3.MATERIAL I MÈTODES**

### 3.1.MATERIAL VEGETAL.

Les mostres analitzades corresponen a 48 accessions del gènere *Solanum* obtingudes del Banc de Germoplasma de l'Institut de Conservació i Millora de l'Agrodiversitat Valenciana (COMAV) de la Universitat Politècnica de València. Les entrades procedeixen en la seua majoria del Jardí Botànic de la Universitat de Birmingham (entrades amb el codi BBS), de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (entrades amb el codi MM) i del COMAV (la resta d'entrades). A la taula 1 es mostra la identificació de cadascuna de les entrades analitzades. A l'Annex I es presenten fitxes resumides de les característiques morfològiques de cada accessió.

**Taula 1.** Quadre d'identificació d'entrades que s'han emprat als experiments.

Espècie	Identificador
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "aculeatum"	MM 457-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "aculeatum"	RNL0187-3
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "aculeatum"	UPV29803-5
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	AN05-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	AN 39/1-3
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	AN 67-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	BBS135/A-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	BBS 140-3
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	BBS 142/A-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	BBS 147/G-1
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	BBS 151/A-1
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	BBS 159/B-3
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	BBS 181/A-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	IVIA 026-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	RARE GILO-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	RNL 0252-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	RNL0288-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	RNL0395-3
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "gilo"	UPV29014-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	BBS 107-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	BBS 110-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	BBS 111-1
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	INRA 4-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	MM 585-3
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	MM 1207-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	MM 1483-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "kumba"	PI 83-2
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "shum"	RNL0022-4
<i>Solanum aethiopicum</i> . Grup "shum"	RNL0340-2
<i>Solanum anguivi</i>	BBS 119-2
<i>Solanum anguivi</i>	BBS 125/B
<i>Solanum dasyphyllum</i>	BBS 178-2
<i>Solanum dasyphyllum</i>	MM 1153
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS 114-3
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS 116-5
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS 131/2-3
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS148-2
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS 170-4
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS 180-2
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS 184-3
Intermèdis <i>S. aethiopicum</i> - <i>S. anguivi</i>	BBS 192/E-1
<i>Solanum macrocarpon</i>	BBS 117-2
<i>Solanum macrocarpon</i>	BBS 168-2
<i>Solanum macrocarpon</i>	BBS 171/B-4
<i>Solanum macrocarpon</i>	BBS 178-1
<i>Solanum macrocarpon</i>	MM 1558-4
<i>Solanum macrocarpon</i>	RNL 0367-3
<i>Solanum incanum</i>	INCANUM

### 3.2. EXTRACCIÓ D'ADN.

L'ADN genòmic es va extraure a partir de fulles joves dels individus a estudiar. De cadascun d'ells es van prendre 75 mg de teixit vegetal. El protocol seguit pe a l'obtenció del material genòmic va ser el mètode CTAB (Doyle, 1987). La quantificació de l'ADN es va realitzar amb un espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) i la qualitat de l'ADN es va avaluar mitjançant les relacions d'absorbància a 260/280 nm i 260/230 nm. L'anàlisi d'integritat de l'ADN es va realitzar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 0.8%, utilitzant tinció amb GelRed i revelat amb llum UV en un analitzador d'imatges Gel Doc (BioRad) mitjançant el software Quantity One (BioRad).

### 3.3. SELECCIÓ D'SNPS A PARTIR DE TRANSCRIPTOMES SEQÜENCIATS PER NGS.

La selecció d'SNPs es va dur a terme a partir dels transcriptomes de *S. incanum* i *S. aethiopicum*, que actualment estan siguent desenvolupats al nostre laboratori. Aquests transcriptomes han sigut seqüenciats emprant les noves tecnologies de seqüenciació, concretament, mitjançant l'ús de la plataforma Illumina High Seq 2000.

El transcriptoma de *S. incanum* s'ha ensamblat mitjançant el programa Trinity De novo". D'altra banda, les lectures del transcriptoma de *S. aethiopicum* es van mapejar front a l'ensamblat de *S. incanum* mitjançant el software "Bowtie". D'aquesta manera, una vegada disponibles els dos transcriptomes, es va obtindre un conjunt d'SNPs comparant els dos transcriptomes.

Per a avaluar la diversitat genètica al llarg de tot el genoma es va haver de fer una selecció d'aquests SNPs, de manera que es disposara de almenys 3 SNPs per cromosoma.

Així doncs, per a seleccionar aquests SNPs ens vam basar en la sintènia entre albergínia i tomaca descrita per Wu i col. (2009). A més a més, ens vam haver d'assegurar que no hi hagueren introns prop de l'SNP en qüestió (mínim de 60 pb) ja que això ens complicaria la tasca de disseny d'encebadors que ens amplificaren bandes de la mida adient. Finalment 39 SNPs es van seleccionar com indica la taula 2. Per una altra banda, els SNPs de *S. melongena* van ser detectats en el transcriptoma publicat per Yang i col. (2014) mitjançant l'ús del programa BLAST.

### 3.4. DISSENY D'ENCEBADORS.

El desenvolupament d'encebadors es va dur a terme mitjançant el programa "Primer3" (Rozen i Skaletsky, 2000), fixant com a encebadors òptims aquells amb una temperatura d'annealing (Tm) de 60°C i una mida de 20 pb. Es va restringir el mida de l'amplicó a 90-150 pb ja que per a l'anàlisi d'SNPs mitjançant HRM es requereixen fragments com més petits millor. La taula 3 mostra els encebadors emprats.

### 3.5. ANÀLISIS D'SNPS PER "HIGH RESOLUTION MELTING" (HRM).

L'anàlisi d'SNPs mitjançant la tècnica del "High Resolution Melting" es va dur a terme en el LightCycler 480 (Roche). El mix de reacció va consistir en  $MgCl_2$  1.8mM; encebador directe i encebador revers a 0.3 $\mu$ M, Màster Mix 1X (Kit), 60ng d'ADN i aigua fins completar un volum final de reacció de 10 $\mu$ L. El protocol de reacció va consistir en una primera etapa de pre-incubació a 95°C durant 10 minuts; Una segona etapa constituïda per 55 cicles d'amplificació a 95°C durant 10 s, 55°C durant 15 s i 72°C durant 15 s; Una tercera etapa de fusió a 95°C durant 1 minut, 40°C durant 1 minut, 60°C durant 1 segon i 95°C. Per últim una quarta etapa de refredament de 10 minuts a 40°C. Finalitzada la PCR, l'amplificació era avaluada emprant el software "LightCycler® 480 Software 1.5" mitjançant dos anàlisis: "Tm calling" i "Gene scanning". A través del primer anàlisi es verificava l'absència d'amplificacions inespecífiques, en cas de que existiren es comprovava que no afectava la zona de detecció del polimorfisme. Mitjançant el "Gene scanning" es verificava el control negatiu i les corbes de fusió eren normalitzades a través dels paràmetres "melt slider" i "threshold" per a l'òptima diferenciació dels genotipats.

### 3.6. ANÀLISIS DE DADES.

L'anàlisi dels marcadors es va realitzar utilitzant el programa PowerMarker (Liu i Muse, 2005). En aquest es va calcular el nombre d'al·lels per locus, el contingut d'informació polimòrfica (PIC), l'heterozigocitat observada i esperada i la freqüència de l'al·lel principal.

El càlcul del PIC es va estimar mitjançant la fórmula desenvolupada per Botstein i col. (1980) (Figura 5)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

**Figura 5.** Càlcul del contingut d'informació polimòrfica (PIC) dels SNPs, on n és el nombre d'al·lels,  $p_i$  amb  $p_j$  les freqüències al·lèliques de l'i-èsim i j-èsim al·lel

L'heterozigocitat observada es va calcular com la proporció d'individus heterozigots en el total de les mostres. Mentre que l'heterozigocitat esperada o diversitat genètica, definida com la probabilitat de que al agafar dos al·lels a l'atzar en la població aquests siguin diferents, es va calcular mitjançant la fórmula de Nei (1973)(Figura 6)

$$He = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

**Figura 6.** Càlcul de l'heterozigocitat esperada o divergència genètica de Nei (1973). On n és el nombre d'al·lels i  $p_i$  la freqüència al·lèlica del i-èsim al·lel.

Una vegada obtingut estos resultats, es va realitzar una anàlisi d'agrupacions amb la finalitat de visualitzar i interpretar les relacions entre les accessions, estos es van estimar amb el mètode Neighbor-Joining. La distància genètica utilitzada va ser la descrita per Nei i col. (1983)

Els resultats derivats en esta anàlisi es van comparar amb un altre programa estadístic "GenALEx 6.5" (Peakall i Smouse, 2012) , amb el que es va obtindre l'anàlisi de coordenades principals (PCoA).

**Taula 2.** Taula resum on apareixen els transcrits de *S. incanum*, el seu marcador COSII associat, el grup de lligament on es troba aquest marcador, la posició en el mapa genètic i per últim els al·lels corresponents per a *S. aethiopicum*, *S. incanum* i *S. melongena*.

TRANSCRIT <i>S. incanum</i>	Marcador COSII	GL	Posició mapa cM	Al·lel <i>S. aethiopicum</i>	Al·lel <i>S. incanum</i>	Al·lel <i>S. melongena</i>
SIUC29531_TC01	C2_At5g51970	1	21.7	G	T	G
SIUC00676_TC02	C2_At3g18860	1	142.8	A	C	C
SIUC01360_TC03	C2_At4g00740	1	91.7	GT	AA	AA
SIUC01600_TC01	C2_At5g09580	1	130.4	T	C	A
SIUC10686_TC01	C2_At3g51510	2	17.8	A	G	G
SIUC11564_TC01	C2_At3g27310	2	104.8	G	A	G
SIUC19191_TC03	C2_At1g11430	2	54.	T	C	C
SIUC14015_TC01	C2_At3g14075	3	159.2	G	A	A
SIUC14499_TC01	C2_At4g18230	3	2.6	C	T	T
SIUC00907_TC04	C2_At1g67700	3	58.0	C	T	C
SIUC15567_TC01	C2_At3g13235	4	0	T	C	C
SIUC17586_TC01	C2_At1g47830	4	117.0	C	A	C
SIUC39035_TC01	TG386	4	60.2	G	A	A
SIUC23081_TC01	C2_At2g46580	5	0	C	A	C
SIUC23613_TC02	C2_At5g21170	5	117.6	T	C	C
SIUC19562_TC02	C2_At1g79790	5	53.0	T	C	C
SIUC27060_TC05	C2_At3g46780	6	30.7	A	G	G
SIUC30643_TC05	C2_At1g20050	6	121.1	C	T	?
SIUC32044_TC02	C2_At1g21640	6	52.0	C	T	T
SIUC32294_TC04	C2_At1g56050	7	115.0	A	C	C
SIUC34715_TC01	C2_At4g30580	7	24.6	GAGG	GCAG	ACAA
SIUC23399_TC02	C2_At2g42750	7	81.0	A	G	A
SIUC37940_TC01	C2_At5g41350	8	110.4	C	T	C
SIUC02438_TC01	C2_At5g47010	8	77.0	G	A	G
SIUC38393_TC01	T1065	9	112.4	G	T	G
SIUC38436_TC01	C2_At3g09920	9	11.7	A	G	A
SIUC13910_TC01	C2_At3g63190	9	50.9	C	T	C
SIUC38959_TC01	C2_At3g25690	10	28.0	A	G	G
SIUC38971_TC01	C2_At3g08760	10	85.3	CT	TC	TC
SIUC39817_TC01	C2_At4g11120	10	48.8	T	C	C
SIUC14306_TC01	C2_At3g54840	11	28.4	C	T	A
SIUC29844_TC04	C2_At2g28600	11	34.5	G	A	?
SIUC39475_TC01	C2_At3g62940	11	52.5	G	A	G
SIUC30456_TC03	TG36	12	116.1	C	T	T
SIUC18551_TC01	cLET-8-K4	12	35.9	C	T	T
SIUC14718_TC01	C2_At5g60600	12	71.8	G	T	G
SIUC31222_TC01	HQT	7		A	G	G
SIUC13379_TC02	HCT	3		T	C	C
SIUC38905_TC01	C3H	1		A	G	G



**Taula 3.** Llista d'encebadors per a avaluar la diversitat genètica en *Solanum*.

Transcrit <i>S. incanum</i>	Codi	Encebador directe(5' →3')	Encebador revers (5' →3')
SIUC29531_TC01	9531	TGCAAATGTTGGTCTGAGA	CGTCCACAATAACAATTCTTGG
SIUC00676_TC02	0676	CTCGGGGTCCAGAACTAGAA	CCTACTCCAGGGCTTCTTC
SIUC01360_TC03	1360	TTGAGCTGGTAACTTAGCATGG	TTCTTCTTGTGGCCAAAGC
SIUC01600_TC01	1600	GGGAGGGTGGTAAAGGAGTG	GGTTTTCACTCAGCCGCTAC
SIUC10686_TC01	0686	GCACAATTAGCTGGTGTGG	AAGAGATTGTTGAAGAAAGACGTG
SIUC11564_TC01	1564	AGGAGAATTGCAGAGTGATGC	TCGCAGCTCATAGCCATATTC
SIUC14015_TC01	4015	TGCCCCATTTCTTCAACTTC	CAGCCATCTTCTCCTGGTAG
SIUC14499_TC01	4499	CGGAACAAAAGCTTTCAACC	ATGCTTCTTTGGGGTAGAG
SIUC15567_TC01	5567	TCAAATGAATGTGAGGAACAGG	TGGAAGAGGAAGAGGCTGAG
SIUC17586_TC01	7586	CTCCGGAATAATGCAAACC	CCTGTCAATGGAGATGTTGCG
SIUC23081_TC01	3081	AAGTACCTCTGCAGCAACAGC	TCATCACCAAATCTCCATCG
SIUC23613_TC02	3613	AAATCCAATTCACAGACATTGC	TGTTGATATCACCGACAACG
SIUC27060_TC05	7060	TGTTCTCACTCAATGTGTCG	AGGTGCACCGATTCTTTCC
SIUC30643_TC05	0643	CACGGTCACTGCTTTCTCTG	AGATGGTGAGCCTTCTACG
SIUC32294_TC04	2294	TAGCAAGCTTACGGCTGGTC	CAACTGAAGTGGCATGATGG
SIUC34715_TC01	4715	CTAAGGGGCAGAGCTTCTTG	GACGCCAATAGTTAATAGAAGTGC
SIUC37940_TC01	7940	CGGCTATGTACTTCATAACAGC	CCCAGAAATGATTGCGAAG
SIUC38393_TC01	8393	GCTGCAGATAGGAATTCAGGAC	CAACACCAGAATCACCCAATAG
SIUC38436_TC01	8436	TTGATGCAATAAAGGAAGTGG	AGGCAGATGGGACTCTTGC
SIUC38959_TC01	8959	TGTGTGACTAGGACTTCATCCTC	GCCCTAGAAGGAGCTTTCATC
SIUC38971_TC01	8971	GATGGTGGTCTGCGGTATC	TAGGTTCAACAGGCTCCATC
SIUC14306_TC01	14306	TGGCATCAGCAGTCGTTG	CATGGGGAATTGAATTTTGG
SIUC29844_TC04	29844	GCTCGCTTAGGATGAATTTCC	GCATATGGTGGAGGTGGTTC
SIUC18551_TC01	18551	TGAGTCCAAAGCTGATGCTG	GGAGACCTCAACAACCTTGC
SIUC14718_TC01	14718	TCATGGGTTGCATTGTGAAC	TGCCGACGTAAAGGTCAATC
SIUC19191_TC03	19191	AACCTCCCTAAAACCCCAAC	TGGCTCTGACAACTGGAAATC
SIUC00907_TC04	00907	GGGAAAGAAAGGAGGAATGG	AAATTTTGGATTTCCATCATCTTC
SIUC39035_TC01	39035	CCCGTTACTTCAAGGGGATG	CACTGCCTTTCAAATGAGG
SIUC19562_TC02	19562	GCATCTCAATGTAAAAGCTTCC	GCCTTTGAGTCCGAGTTCAG
SIUC32044_TC02	32044	GACCTAGGCAAGAACGAAGG	TGTAGGACGCTATCCCATTG
SIUC23399_TC02	23399	TAGAGATGGCTCGGGAAG	GGAAGATAGATCAAACGAGCTG
SIUC02438_TC01	02438	GAGACAGGGGATGATGAAGG	GATGGCACATTGCACCTAAC
SIUC13910_TC01	13910	CCCATAAGGTCGCGTAATTC	TCACCCGCAAACCTACTCTC
SIUC39817_TC01	39817	TGTTGTGGACACGGCTACTC	CAAATGTTCTAGGCCATTCC
SIUC39475_TC01	39475	CACATTGGTGAAAGCCATTG	CTGGCTGCCTCTTGTGAG
SIUC30456_TC03	30456	ACTGGCCAAGCTTTTGCTAC	GTGTGGGCTCTAAGGGAATG
SIUC31222_TC01	31222	CCTCCACTACCTCAACTC	AAGAAGCGCGAGTTGTTAG
SIUC13379_TC02	13379	CTTCTCTCCACCAGGCTAC	TGGCAGCATACCAAATAGGC
SIUC38905_TC01	38905	TGAAGGAGAAGGACCAGCAG	TCAGCCCATATCAGATCTTGC

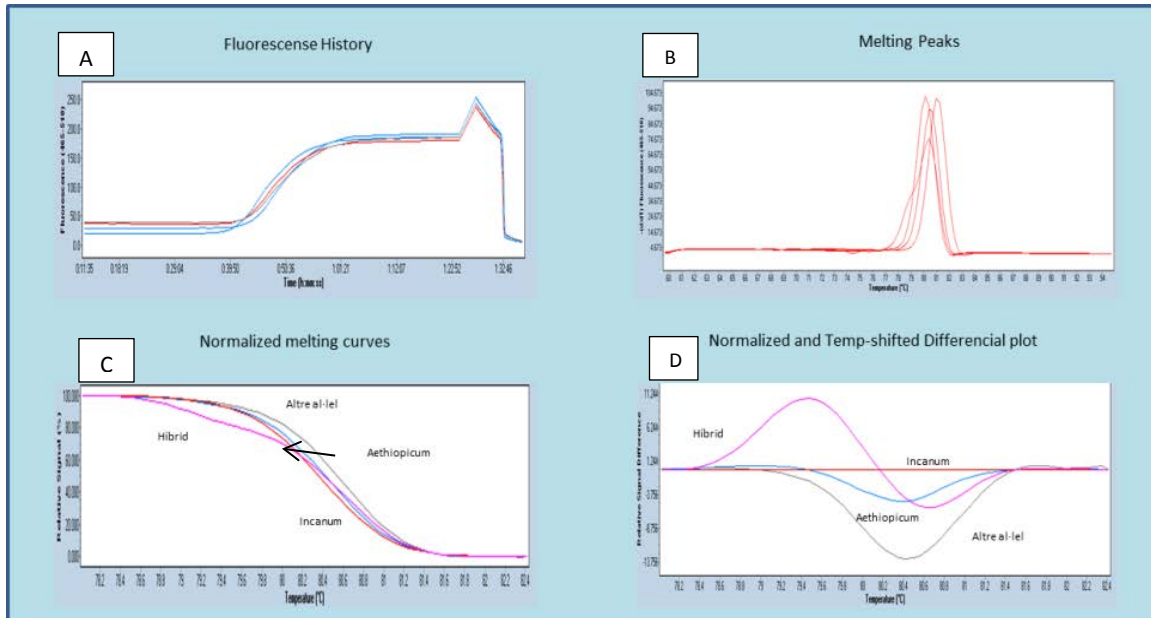
## **4.RESULTATS I DISCUSSIÓ**

#### 4.1. CARACTERITZACIÓ DELS SNPs: ESTADÍSTICS GENERALS I ANÀLISI DE MARCADORS.

Els SNPs han sorgit recentment com a uns dels marcadors moleculars més prometedors que existeixen, però no ha sigut fins a 2011 que han començat a estar disponibles per a albergínia. En aquest treball s'ha disposat d'una selecció de 39 SNPs obtinguts a partir de la comparació dels transcriptomes de *S. incanum* i *S. aethiopicum* amb la finalitat de validar dits SNPs i emprar-los per a determinar la diversitat genètica d'un conjunt d'espècies silvestres relacionades amb l'albergínia (*S. melongena*).

Dels 39 marcadors avaluats, quatre no van poder ser caracteritzats (9531, 1360, 8393 i 18551) ja que en el cas dels marcadors 1630, 8393 i 18551 els resultats dels anàlisis amb HRM eren massa ambigus i aleshores era massa complicat assignar correctament els al·lels als diferents individus. D'altra banda, el que va ocórrer amb el marcador 9531 és que a l'hora de dissenyar els encebadors els vam dissenyar massa dins de l'intró de forma que era impossible que la PCR amplifacara apropiadament el segment que ens interessava.

Una vegada fets els anàlisis amb HRM es van assignar els al·lels corresponents en cada individu i per a cada marcador comparant les corbes generades per cada accessió amb les corbes de *S. incanum* i *S. aethiopicum* (individu BBS 135/A) com a referència per a cada marcador. Les accessions que per a un marcador concret presentaven una corba diferent a la que presentava *S. incanum* o *S. aethiopicum* eren tractats com a heterozigots o portadors d'un al·lel diferent al de *S. incanum* o *S. aethiopicum* depenent de la corba (Figura 7).



**Figura 7.** Anàlisi de corbes d'HRM. La imatge A fa referència a l'amplificació en temps real. La imatge B fa referència a les corbes de fusió. La imatge C fa referència a les corbes de fusió normalitzades. Per últim, la imatge D fa referència al "Differential Plot", que és un gràfic normalitzat a partir de la senyal relativa diferenciada.

Després, reunides aquestes dades, es va calcular el nombre d'al·lels per locus, el contingut d'informació polimòrfica (PIC), l'heterozigocitat observada i esperada i la freqüència de l'al·lel principal mitjançant l'ús dels programes PowerMarker (Liu i Muse, 2005) i GenAlex 6.5 (Peakall i col, 2012) (Taula 4).

En total es van trobar 82 al·lels, amb una mitjana de 2 al·lels per locus per a les 49 accessions analitzades. El rang d'al·lels va ser de 2 per a la majoria de marcadors i fins a 4 al·lels per al marcador "0676". Aquestes dades són totalment coherents, ja que per la simple naturalesa d'aquest tipus de marcadors sols es poden observar com a màxim 4 al·lels diferents corresponents als quatre nucleòtids Adenina, Guanina, Citocina o Timina, tot i que de vegades es poden detectar altres al·lels a causa de dobles SNPs i indels. D'altra banda, més de la mitat dels loci (54%) van presentar una freqüència de l'al·lel principal major que el 90%. Corrado i col. (2013) en un estudi similar al present treball, en el qual pretenien estudiar la diversitat genètica mitjançant l'ús d'SNPs en unes varietats de tomaca van observar que el 49% dels loci avaluats van presentar una freqüència de l'al·lel principal major que el 90%.

Un altre dels paràmetres obtinguts va ser tant l'heterozigocitat esperada per locus ( $H_e$ ) com l'observada ( $H_o$ ) (Taula 4). Pel que fa a l'heterozigocitat esperada, els seus valors anaven des de 0.02 fins a 0.5, amb una mitjana de 0.22. En canvi l'heterozigocitat observada per locus ( $H_o$ ) no va superar el 8% en cap dels loci estudiats (mitjana de 0.02).

Corrado i col. (2013) van obtenir una heterozigocitat esperada ( $H_e$ ) mitjana de 0.215 els valors dels quals oscil·laven entre 0.01 i 0.5. Pel que fa a l'heterozigocitat observada ( $H_o$ ) van obtenir un valor mitjà de 0.095 i el conjunt de valors oscil·laven entre 0.005 i 0.305.

Aquests valors tan baixos encaixen perfectament ja que les espècies amb què hem treballat són espècies autógames, la qual cosa fa que hi haja una alta homozigocitat (Pessaraki i Dris, 2004). Per un altre costat Vilanova i col. (2012), mitjançant l'ús de marcadors SSR també van observar aquest fenomen, doncs es van apercebre que la heterozigocitat observada en *S. melongena* era baixa. Per tant, independentment del tipus del marcador emprat aquest fenomen d'endogàmia s'observa en l'albergínia i les seues espècies relacionades.

Per altra banda, un altre paràmetre avaluat va ser el "Contingut d'Informació Polimòrfica" (PIC) (Taula 4). En aquest treball, el valor mig del PIC va ser del 0.19 sent el marcador "1564" el més informatiu amb un valor de 0.39. Corrado i col. (2013) per a les seues accessions també van obtenir resultats pareguts, doncs el valor mig del PIC va ser 0.177 sent 0.375 el valor del PIC per al SNP més informatiu. Per una altra banda Vilanova i col. (2012), van obtenir un valor mig del PIC de 0.47, sent 0.85 el valor del PIC per al marcador més informatiu.

A grans trets es compleix que el PIC és més baix per als marcadors SNPs, la qual cosa significa que aquest tipus de marcadors són menys informatius que els microsatèl·lits. Tot i això els SNPs presenten diversos avantatges que els fan atractius a l'hora de realitzar estudis de diversitat genètica i és que permeten l'automatització dels anàlisis, són més abundants (1 per 1000 pb), estan més homogeniament distribuïts pel genoma i no canvien al llarg del temps tant ràpidament.

**Taula 4.** Resum de la variació genètica dels 35 loci avaluats. S'indica la freqüència dels al·lels principals (p), el nº d'al·lels per locus (Na), l'heterozigocitat esperada per locus (He), l'heterozigocitat observada (Ho) i el Contingut d'Informació polimòrfica (PIC).

<b>Marcador</b>	<b>p</b>	<b>Na</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>PIC</b>
<b>8959</b>	0.93	2	0.14	0.02	0.13
<b>8971</b>	0.95	2	0.10	0.02	0.09
<b>7940</b>	0.74	2	0.38	0.02	0.31
<b>8436</b>	0.93	3	0.14	0.02	0.13
<b>0686</b>	0.89	4	0.21	0.06	0.20
<b>1600</b>	0.75	3	0.38	0.04	0.32
<b>5567</b>	0.70	2	0.42	0.02	0.33
<b>4499</b>	0.99	2	0.02	0.02	0.02
<b>4715</b>	0.96	3	0.08	0.00	0.08
<b>2294</b>	0.95	2	0.10	0.02	0.10
<b>0643</b>	0.97	2	0.06	0.02	0.06
<b>7060</b>	0.74	2	0.39	0.04	0.31
<b>3613</b>	0.85	2	0.25	0.04	0.22
<b>7586</b>	0.95	2	0.10	0.02	0.09
<b>3081</b>	0.53	2	0.50	0.04	0.37
<b>1564</b>	0.72	3	0.43	0.04	0.39
<b>4015</b>	0.79	2	0.33	0.04	0.28
<b>0676</b>	0.70	2	0.42	0.04	0.33
<b>00907</b>	0.91	3	0.16	0.00	0.16
<b>39035</b>	0.72	3	0.43	0.02	0.37
<b>13910</b>	0.97	2	0.07	0.02	0.06
<b>02438</b>	0.97	2	0.06	0.02	0.06
<b>13379</b>	0.95	2	0.10	0.02	0.09
<b>32044</b>	0.74	2	0.38	0.02	0.31
<b>19191</b>	0.93	3	0.13	0.02	0.13
<b>14306</b>	0.88	3	0.22	0.08	0.20
<b>29844</b>	0.95	2	0.10	0.02	0.09
<b>14718</b>	0.95	3	0.10	0.02	0.10
<b>31222</b>	0.92	3	0.15	0.00	0.15
<b>30456</b>	0.51	2	0.50	0.00	0.37
<b>23399</b>	0.98	2	0.04	0.00	0.04
<b>39475</b>	0.98	2	0.04	0.00	0.04
<b>38905</b>	0.71	2	0.41	0.04	0.32
<b>39817</b>	0.95	2	0.10	0.02	0.09
<b>19567</b>	0.72	2	0.40	0.02	0.32
<b>Mitjana</b>	0.85	2	0.22	0.02	0.19

## 4.2. ANÀLISIS DE DISTÀNCIA GENÈTICA.

És essencial tenir coneixement sobre la diversitat del germoplasma de què disposem a més de la relació genètica entre aquests materials a l'hora d'abordar un nou programa de millora genètica. En aquest treball, per a poder establir la relació genètica entre les diferents accessions es van utilitzar dues metodologies.

Per una banda es va dur a terme un anàlisi de PCoA ("Principal Coordinates Analysis"). Aquest és un mètode d'ordenació que té com a objectiu produir un gràfic de tal manera que les distàncies entre els punts estan prop de la distància genètica entre ells reduint al màxim la distorsió. D'aquesta manera les agregacions revelaran grups d'individus genèticament similars.

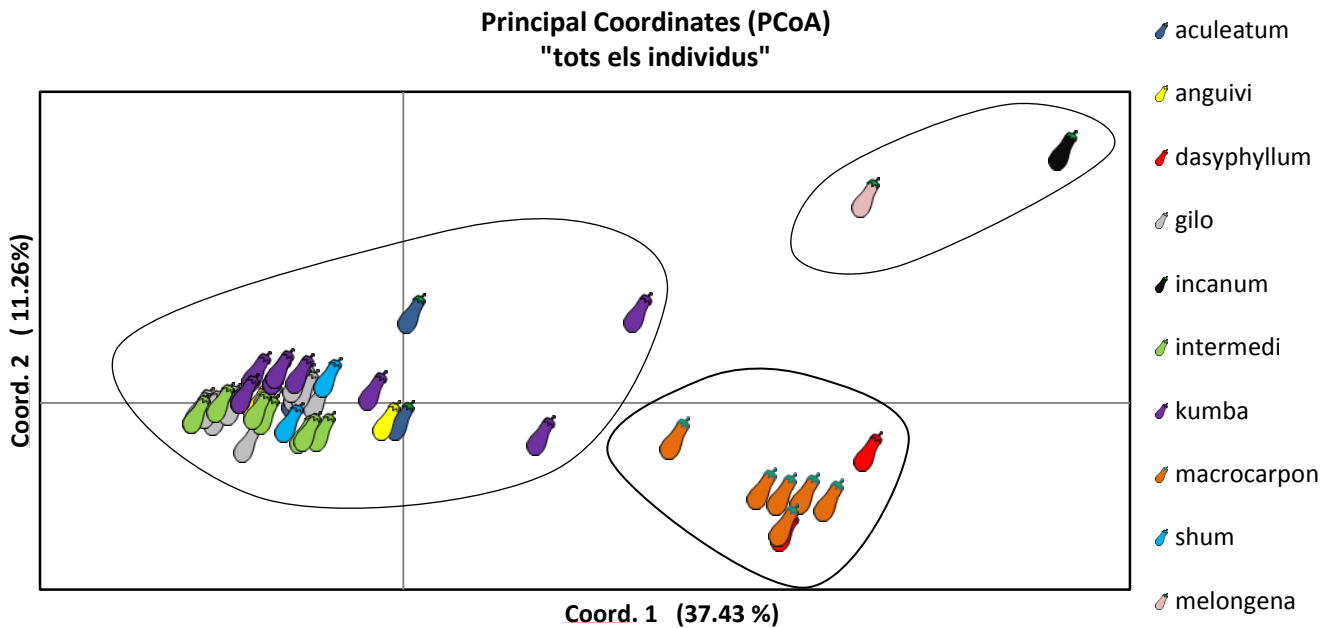
Per una altra banda es va dur a terme un anàlisi tipus Clúster jeràrquic d'aglomeració basat en la distància genètica. Per a efectuar aquest anàlisi es va emprar el mètode Neighbor-Joining. D'aquesta manera els individus amb elevada similitud són agrupats en el mateix clúster.

Així doncs, la informació obtinguda mitjançant l'anàlisi de PCoA es complementarà amb la informació aportada pels anàlisis clúster.

### 4.2.1. Anàlisi tipus multivariant PCoA.

#### 4.2.1.1. PCoA amb tots els individus.

Les tres primeres coordenades de l'anàlisi de PCoA amb SNPs expliquen el 58.53% de la variació total. La projecció de les accessions en el gràfic de dues dimensions del PCoA mostra que es formen diferents grups en diferents àrees del gràfic (Figura 8). S'observen a grans trets 3 grups. En primer lloc s'observa clarament que *S. incanum* i *S. melongena* queden separats dels demés grups (dalt a la dreta). D'altra banda baix a la dreta apareix un grup amb baixa dispersió on s'agrupen els individus de l'espècie silvestre *S. dasyphyllum* juntament amb els dos individus de la seua espècie cultivada relacionada *S. macrocarpon*. Per últim a la part centre esquerra del gràfic s'agrupen les accessions corresponents als intermedis entre *S. anguivi* i els *S. aethiopicum* juntament amb *S. anguivi* i els individus de la seua espècie relacionada cultivada *S. aethiopicum* (grups gilo, shum, aculeatum i kumba), sent kumba el grup més dispers. Plazas i col. (2014), en canvi, basant-se en dades obtingudes mitjançant la caracterització morfològica de les mateixes accessions, van reportar que el grup kumba no era un grup massa divers. D'ací s'extrau que tot i no ser massa diverses morfològicament, genèticament els individus del grup kumba, si que ho semblen. Això sí, s'hauria de confirmar si efectivament aquesta alta diversitat és real o més bé és una coincidència amb els 35 SNPs analitzats.



**Figura 8.** Similitud genètica basada en 49 accessions i 35 marcadors SNPs representada en les dues primeres components de PCoA. La primera i la segona component expliquen el 37.43 i el 11.26% de la variació total respectivament. Els deu grups considerats estan representats per símbols de diferent color: *S. anguivi* (groc), *S. dasyphyllum* (roig), *S. macrocarpon* (taronja), *S. aethiopicum* grup Gilo (gris), *aculeatum* (blau obscur), *kumba* (morat) i *Shum* (blau claret). Els intermedis entre *S. aethiopicum* i *S. anguivi* (verd), *S. incanum* (negre) i *S. melongena* (rosa).

#### 4.2.1.2. PCoA exclouent *S. incanum* i *S. melongena*.

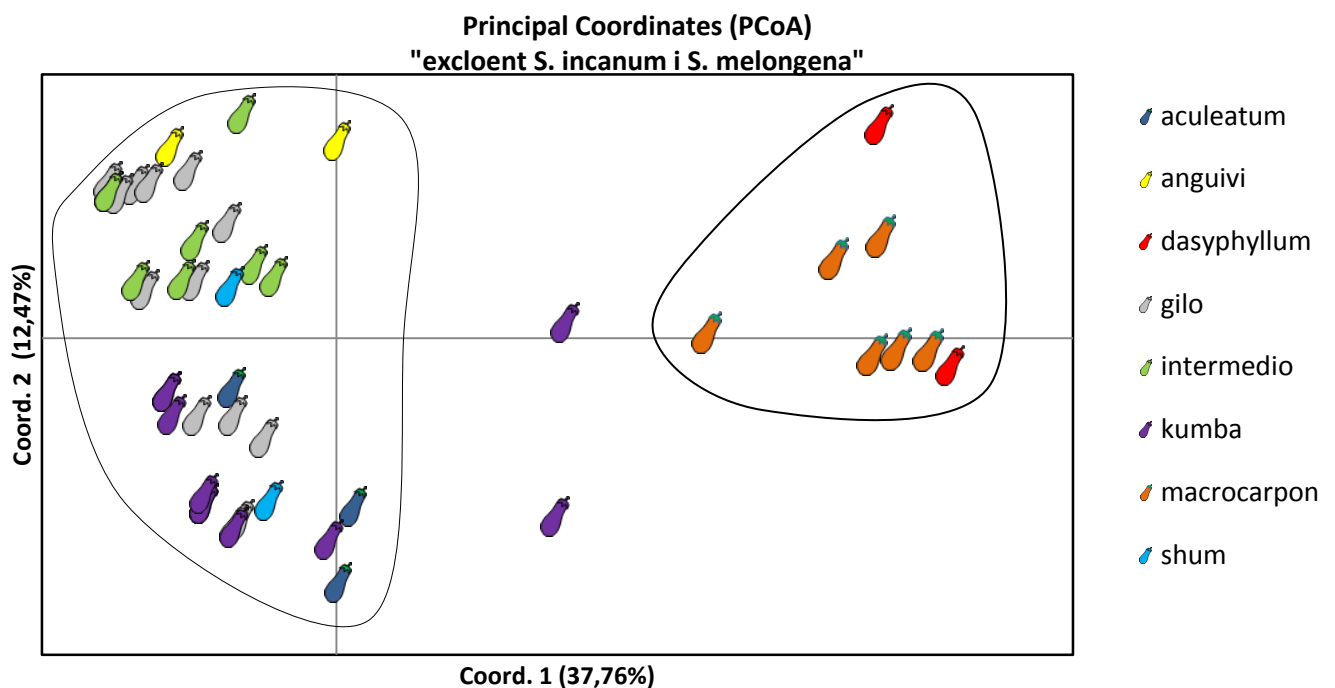
Aquest anàlisi es va dur a terme per a intentar esclarir més apropiadament la relació que existia entre tots els grups de *S. aethiopicum*, el grup intermedi, *S. dasyphyllum* i *S. macrocarpon*. Les tres primeres coordenades de l'anàlisi de PCoA amb SNPs expliquen el 56.41% de la variació total. La projecció de les accessions en el gràfic de dues dimensions del PCoA mostra que es formen diferents grups en diferents àrees del gràfic (Figura 9).

En primer lloc s'observa que tret de dos individus pertinents al grup *kumba*, apareixen dos grups principals separats per la primera coordenada principal. De nou *S. dasyphyllum* i *S. macrocarpon* formen un grup (dalt a la dreta del gràfic). A més a més, el grup *kumba* segueix apareixent com el grup més dispers. D'altra banda en aquest cas sí que s'observa d'una forma més clara que els intermedis efectivament queden entre els individus de *S. anguivi* i *S. aethiopicum*. Açò encaixa amb els estudis morfològics que asseguren que els individus intermedis morfològicament són una barreja entre caràcters que presenta *S. anguivi* i caràcters que presenta *S. aethiopicum* (Plazas i col, 2014). Aquestes formes intermèdies podrien representar formes primitives o semi domèstiques que són formades per la hibridació ocasional ja que l'àrea natural de distribució de *S. anguivi* presenta un alt grau de solapament amb l'àrea de distribució de *S. aethiopicum*. Es podria dir que aquestes formes intermèdies molt probablement afavoreixen el flux genètic entre *S. anguivi* i la seua espècie relacionada cultivada *S. aethiopicum*.

Plazas i col. (2014) van observar que el grup més dispers era gilo i que tot i això sols solapava amb unes poques accessions d'individus corresponents al grup d'intermedis, en canvi, en aquest treball el grup gilo tot i aparèixer bastant dispers i solapar amb individus del grup intermedi, també ho fa amb individus del grup kumba i shum. D'açò es pot suggerir que algunes formes considerades com a gilo podrien haver sigut híbrids en algun moment i per tant estiguen més a prop de *S. anguivi*. A més a més, la gran diversitat observada indica que un gran nombre d'accessions s'haurien de conservar en els bancs de germoplasma per a d'aquesta manera tindre una bona representació de la variació present.

Per una altra part Plazas i col. (2014) van observar que el grup aculeatum s'agrupava bastant compactament i se separava dels altres grups, mentre que ací este tret no s'observa tant clarament. Per últim, Plazas i col. (2014) van observar que el grup kumba es diferenciava bastant bé dels altres grups. En canvi, en aquest treball s'observa que el grup kumba solapa amb el grup aculeatum i en alguns individus del grup gilo i shum.

D'ací es dedueix que l'anàlisi de PCoA indica que hi ha diversitat a nivell genètic però no s'observa una diferenciació tant clara com ocorre a nivell morfològic. A nivell genètic *S. aethiopicum* no es diferencia tant com ho fa a nivell morfològic, la qual cosa suporta que tots els grups; kumba, aculeatum, shum i gilo, s'hagen considerat com una única espècie



**Figura 9.** Similitud genètica basada en 47 accessions i 35 marcadors SNPs representada en les dues primeres components de PCoA. La primera i la segona component expliquen el 37,76 i el 12,47% de la variació total respectivament. Els deu grups considerats estan representats per símbols de diferent color: *S. anguivi* (groc), *S. dasyphyllum* (roig), *S. macrocarpon* (taronja), *S. aethiopicum* grup Gilo (gris), aculeatum (blau obscur), kumba (morat) i Shum (blau claret). Els intermedis entre *S. aethiopicum* i *S. anguivi* (verd).



#### 4.2.2. Anàlisi tipus clúster.

Les relacions genètiques entre genotips van ser calculades utilitzant la distància genètica proposta per Nei i Li, (1983).

##### 4.2.2.1. Dendrograma amb tots els individus.

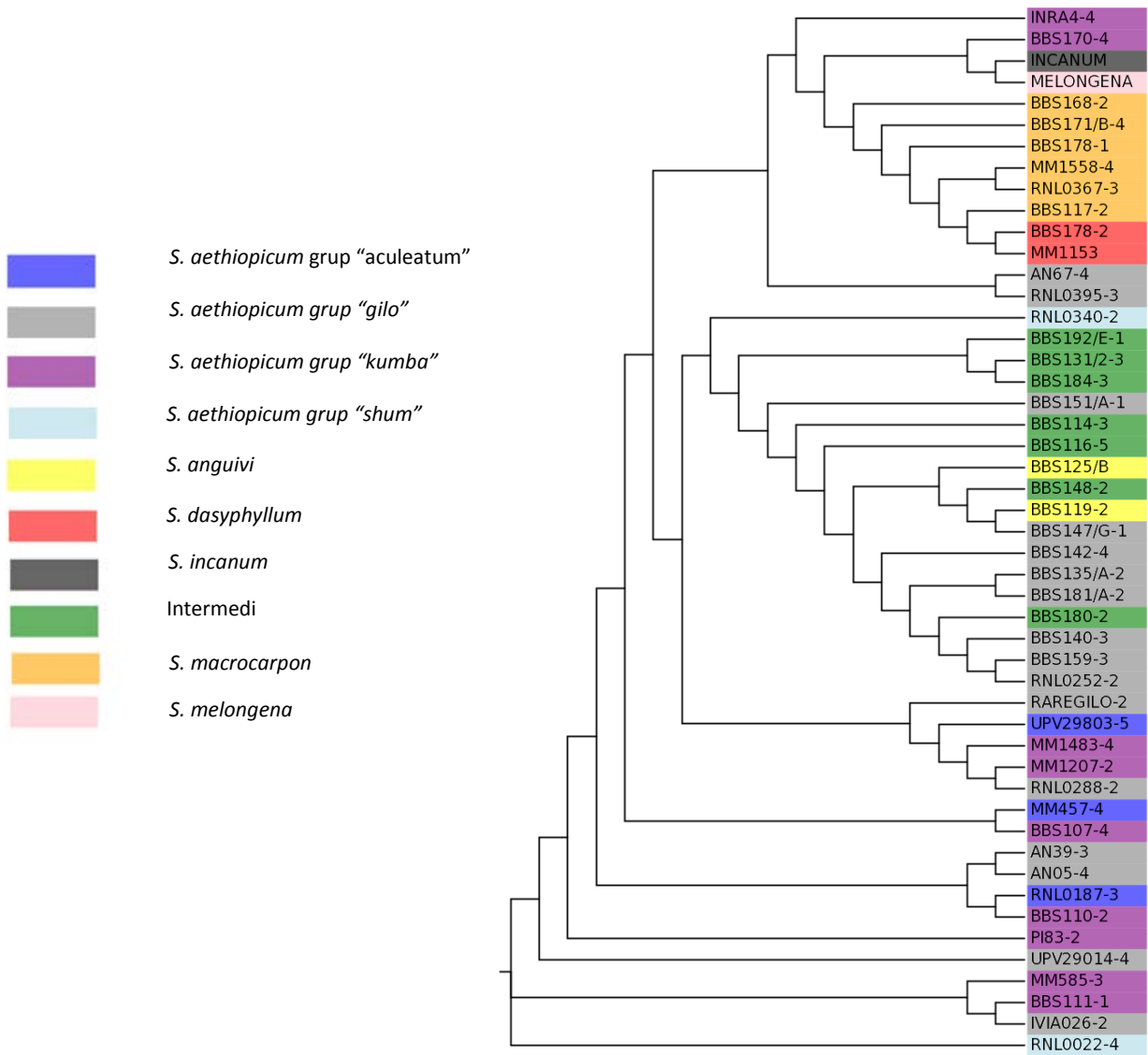
El dendrograma obtingut mitjançant l'anàlisi de clúster per Neighbor-joining de la informació generada pels 35 marcadors SNPs amb les 49 accessions estudiades ve donat a la Figura 10. El dendrograma clarament distingeix *S. melongena* i *S. incanum* de la resta d'individus a l'igual que ho feia l'anàlisi de PCoA. Una vegada més tots els individus de *S. macrocarpon* i *S. dasyphyllum* són categoritzats com a un únic grup. Isshiki i col. (2008), mitjançant l'ús de ISSRs també van observar al seu dendrograma que *S. macrocarpon* estava totalment separada de *S. melongena* i *S. incanum* la qual cosa indica que la posició taxonòmica de *S. macrocarpon* deuria ser fora de la secció *melongena* que és on ha pertangut fins ara juntament amb *S. incanum* i *S. melongena*. També s'observa que com a l'anàlisi de PCoA, incloent a l'individu *S. incanum* i *S. melongena*, l'anàlisi no és massa capaç d'esclarir les relacions entre tots els grups de *S. aethiopicum*, el grup intermedi, *S. dasyphyllum* i *S. macrocarpon*.

##### 4.2.2.2. Dendrograma excloent *S. incanum* i *S. melongena*.

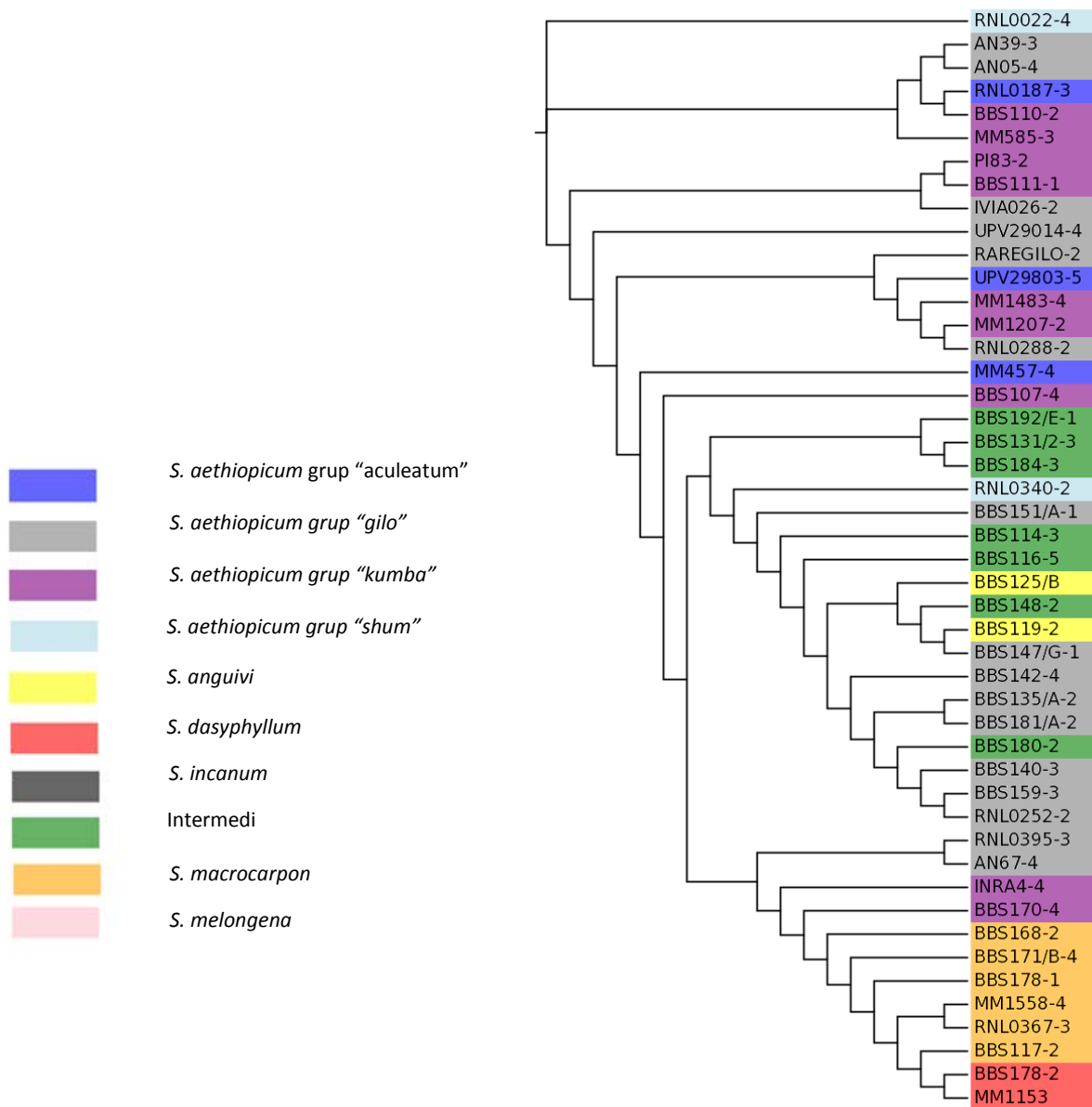
Aquest dendrograma, al igual que ocorria amb l'anàlisi de PCoA, es va dur a terme per a intentar entendre més apropiadament la relació que existeix entre tots els grups de *S. aethiopicum*, el grup intermedi, *S. dasyphyllum* i *S. macrocarpon*. La Figura 11 mostra el dendrograma obtingut llevant de l'anàlisi *S. melongena* i *S. incanum*. En aquest cas s'observa, a banda del grup *S. macrocarpon* - *S. dasyphyllum* (taronja i roig), que la major part dels individus corresponents al grup gilo (gris) s'agrupen conjuntament amb els individus intermedis (verd), els individus de *S. anguivi* (groc) i un individu del grup shum (blau claret). Açò coincideix amb els resultats obtinguts per Isshiki i col. (2008) que van observar una gran afinitat entre *S. aethiopicum* grup gilo i *S. anguivi*. Tot açò suporta l'assumpció de que *S. aethiopicum* es el resultat de la domesticació de *S. anguivi* (Lester i Niakan, 1986; Isshiki i col., 2008). Una vegada més les dades senyalen que a nivell genètic aquestes formes no són tant diferents com a nivell morfològic ho són.

D'altra banda també s'observa que els dos individus kumba (individus INRA4-4 i BBS 170-4) que a l'anàlisi de PCoA es queden entre el grup *S. macrocarpon* - *S. dasyphyllum* i els altres individus, al dendrograma apareixen una vegada més entre el clúster *S. macrocarpon* - *S. dasyphyllum* i la resta d'individus. Per tant els anàlisis clúster ens estan confirmant el que ja havíem vist als PCoAs.

A la vista dels anàlisis es dedueix que els marcadors SNPs emprats si que són capaços de diferenciar bé entre espècies diferents, així com detectar la variabilitat genètica existent dins d'elles. Els resultats obtinguts també confirmen que els SNPs seleccionats a partir dels transcriptomes de *S. incanum* i *S. aethiopicum* efectivament són reals, el que ens permetra en un futur utilitzar-los en plataformes de genotipat massiu com pot ser SNPplex.



**Figura 10.** Dendrograma obtingut mitjançant l'anàlisi de clúster per Neighbor-joining de la informació generada pels 35 marcadors SNPs amb les 49 accessions



**Figura 11.** Dendrograma obtingut mitjançant l'anàlisi de clúster per Neighbor-joining de la informació generada pels 35 marcadors SNPs amb totes les accessions excepte *S. melongena* i *S. incanum*.

## 5.CONCLUSIONS

1. S'han seleccionat 39 SNPs provinents de dos transcriptomes seqüenciats mitjançant NGS. D'aquests, 35 han pogut ser satisfactòriament analitzats per la caracterització molecular d'una col·lecció d'entrades de diferents espècies silvestres relacionades amb l'albergínia .
2. La tècnica de "High Resolution Melting" ha sigut apropiada per a la detecció d'SNPs ja que ens han permès detectar els al·lels de manera clara i en un temps reduït.
3. L'anàlisi de PCoA incloent tots els individus ha sigut capaç de diferenciar clarament les espècies entre elles així com la variabilitat genètica existent dins d'elles. L'anàlisi de PCoA excloent a *S. melongena* i *S. incanum* ha mostrat una clara diferenciació entre espècies però no tant clara diferenciació entre els grups que conformen l'espècie *S. aethiopicum*.
4. Els anàlisis clúster han confirmat el que prèviament s'havia vist als PCoA donant així major consistència als nostres resultats.
5. Les dades ací obtingudes ens ha permès dur a terme un anàlisi de diversitat genètica el qual ens ha aportat informació de gran utilitat per a la selecció i millora d'individus potencialment interessants.
6. La validació dels SNPs provinents dels transcriptomes seqüenciats mitjançant NGS fa que el gran nombre de SNPs generats en aquestos tipus de projecte puga ser utilitzada en un futur en plataformes de genotipat massiu.

## 6.BIBLIOGRAFIA

1. ADENIJI, O. T.; KUSOLWA, P.; REUBEN S.W.O.M. (2013). Morphological descriptors and micro satellite diversity among scarlet eggplant groups. *African Crop Science Journal*, 21: 37-49.
2. ALESSANDRO, A. D.; BACCHI, P.; FIORE, M. C.; RICCIARDI, L. (2010). Genetic diversity and analysis in eggplant (*Solanum melongena* L.) and allied species.
3. ANIS, M.; BAKSH, S.; IBAL, M. (1994). Cytogenetic studies on the F1 hybrid *Solanum. incanum* x *Solanum melongena* var. American Wonder. *Cytologia*, 59: 443-436.
4. BARCHI L.; LANTERI S.; PORTIS E.; ACQUARDRO A.; VALÈ G.; TOPPINO L.; ROTINO G.L. (2011). Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing. *BMC Genomics*. 12: 304.
5. BARTLETT J.M.; STIRLING D.(2003). A short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 226, pp 3-6.
6. BEHERA T.K.; SHARMA P; SINGH B.K.; KUMAR G.; KUMAR R.; MOHAPATRA T.; SINGH N.K. (2006). Assessment of genetic diversity and species relationships in eggplant (*Solanum melongena* L.) using STMS markers. *Scientia Horticulturae*, 107:352-357.
7. BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W. (1980). Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
8. BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W. (1980). Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
9. CORRADO G.; PIFFANELLI P.; CARAMANTE M.; COPPOLA M.; RAO R. (2013). SNPs genotyping reveals genetic diversity between cultivated landraces and contemporary varieties of tomato. *BMC Genomics*. 14:835
10. D'ARCY, W. G., AND K. PICKETT (1991). "Salt water floatation of *Solanum* fruits and possible dispersal of eggplant." *Solanaceae Newsl* 3.3.
11. DAUNAY MC, LESTER RN, LATERROT H (1991). The use of wild species for the genetic improvement of Brinjal (eggplant) (*Solanum melongena*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). In: Hawks JC, Lester RN, Nee M, Estrada N (eds) *Solanaceae III, taxonomy, chemistry, evolution*, vol 27. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Soc, London, pp 389–413.
12. DAUNAY, M. C., R. N. LESTER, AND G. ANO(1997). "Les aubergines." *L'amélioration des plantes tropicales*. CIRAD-ORSTOM, Paris 83-107.
13. DAUNAY, M.C.; LESTER, R.N.; ANO, G. (2001a). Eggplant, en: *Tropical plant breeding*. Science Publishers. Montpellier, 199-222.
14. DELLEDONNE M.; ACQUADRO A.; ZAMPERIN G.; TONONI P.; MINIO A.; DAL MOLIN A.; TOPPINO L.; SALA T.; FANTINI E.; SCAGLIONE D., PORTIS E.; BARCHI L.; LANTERI S.; GIULIANO G.; ROTINO G.L. (2014). An eggplant (*Solanum melongena*) high quality genome draft. *Plant & animal genome XXII conference*.
15. DOYLE J.J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19, 11-15.
16. FRARY A., DOGANLAR S., DAUNAY M.C.( 2007). Eggplant. *Genome mapping and molecular breeding in plants, volume V: vegetables II*. Springer, Heidelberg, Germany. pp. 287-313.
17. FURINI A.; WUNDER J. (2004). Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretation and germplasm utilization. *Theoretical and Applied genetics*. Vol. 108, pp 197-208.

18. GARCÍA MAS E.G., ARANZANA M.J., MONFORTE A., BALLESTER J., VIRUEL M.A., ARÚS P. (2000). Marcadores de ADN. Conceptos, tipos, protocolos. pp. 91-151. En: Nuez F., Carrillo J.M. (eds.). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
19. GE H.; LIU Y.; JIANG M.; ZHANG J.; HAN H.; CHEN H. (2013). Analysis of genetic diversity and structure of eggplant populations (*Solanum melongena* L.) in China using simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*. Vol. 162, pp 71-75.
20. GEORGE J. FLICK JR., FLORENCE S. BURNETTE , LOUIS H. AUNG , ROBERT L. ORY , ALLEN J. ST. ANGELO (1978). Chemical composition and biochemical properties of mirlitons (*Sechium edule*) and purple, green, and white eggplants (*Solanum melongena*). *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26 (5), pp 1000–1005.
21. GOUSSET C, COLLONNIER C, MULYA K, MARISKA I, ROTINO GL, BESSE P, SERVAES A, SIHACHAKR D (2005). *Solanum torvum* , as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant ( *S. melongena* L.). *Plant Sci* 168:319–327.
22. GRAMAZIO, P.; STOMMEL, J.R. (2013). Genetic diversity in morphological characters and phenolic acids content resulting from an interespecific cross between eggplant, *Solanum melongena*, and its wild ancestor (*S. incanum*). *Annals of Applied Biology*, ISSN 0003-4746: 242-257.
23. HAMADA H.; PETRINO M.G.; KAKUNAGA T. (1982). A novel repeated element with ZDNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 79:6465-6469.
24. ISSHIKI S., SUZUKI S., YAMASHITA K. (2003). RFLP analysis of mitochondrial DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50:133-137.
25. ISSHIKI S.; IWATA N.; KHAN M.R. (2008). ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *Scientia Horticulturae*. Vol. 117, pp 189-190
26. K, LESTER RN. (1979). Chemotaxonomy of the cultivated eggplant - a new look at the taxonomic relationships of *Solanum melongena* L. In: Hawkes, J, G, , Lester, R, N, , Skelding, A, D ed(s). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. London, Academic Press for the Linnean Society. 615 - 627.
27. KARIHALOO J.L., BRAUNER S., GOTTLIEB L.D. (1995). Random amplified polymorphic variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (*Solanaceae*). *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 767-770.
28. KARIHALOO, J.L., GOTTLIEB, L.D. (1995). Allozyme variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (*Solanaceae*). *Theoretical and Applied Genetics*, 90:578-583.
29. KAYSER, M.; KITTLER, R.; ERLER, A.; HEDMAN, M.; LEE, A.C.; MOHYUDDIN, A. (2004). A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *American Journal of Human Genetics*, 74:1183-1197.
30. LEBEAU A.; GOUY M.; DAUNAY M.C.; WICKER E.; CHIROLEU F.; PRIOR P.; FRARY A.; DINTINGER J. (2013). Genetic mapping of major dominant gen for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theoretical and applied genetics*. Vol.126, pp 143-158.
31. LESTER RN, HASAN SMZ. (1991). Origin and domestication of the brinjal egg-plant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. In: Hawkes, J, G, , Lester, R, N, , Nee, M, , Estrada, N ed(s). *Solanaceae III. Taxonomy, chemistry, evolution*. . Roy. Bot. Gard.: Kew & Linnean Soc.: London. pp. 369-87.
32. LESTER, R.N.; HASAN, S.M.Z. (1991). Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia, en: *Solanaceae III*:



- Taxonomy, chemistry, evolution. Eds.: J.G. Hawkes; Lester; M. Nee, N Estrada. The Linnean Society of London, London: 369-387.
33. LESTER, R. N.; NIAKAN, L. (1986). Origin and domestication of the scarlet eggplant, *Solanum aethiopicum*, from *S. anguivi* in Africa. *Solanaceae: Biology and systematics*, p. 433-456.
  34. LIU K.; MUSE S.V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. Vol. 21, pp 2128-2129.
  35. MACKAY, J.; WRIGHT, C.; BONFIGLIOLI, R. (2008). A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods*, 4:8.
  36. MADER, E.; LUKAS, B.; NOVAK, J. (2008). A Strategy to Setup Codominant Microsatellite Analysis for High-Resolution-Melting-Curve-Analysis (HRM). *BMC Genetics*, 9:69.
  37. MEYER, R.S.; KAROL K.G.; LITTLE, D.P.; NEE M.H.; LITT, A. (2012). Phylogeographic relationship among Asia eggplants and new perspectives on eggplant domestication.
  38. NEI M. (1973). Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Science*. Vol. 70 nº 12.
  39. NEI .; TAJIMA F.; TATENO Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Molecular evolution*, 19: 153-170.
  40. NUNOME T., ISHIGURO K., YOSHIDA T., HIRÍA M. (2001). Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breed Sci.*, 51:19-26.
  41. NUNOME T., ISHIGURO K., YOSHIDA T., HIRÍA M. (2001). Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breed Sci.*, 51:19-26.
  42. NUNOME T., YOSHIDA T., HIRAI M. (1998). Genetic linkage map of eggplant. *Proceedings of the 10th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*, 239-242.
  43. NUNOME T.; SUWABE K.; IKETANI H.; HIRAI M. (2003b). Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*, 122:256-262.
  44. NUNOME T.; SUWABE K.; OHYAMA A.; FUKUOKA H.(2003a). Characterization of trinucleotide microsatellites in eggplant. *Breed Sci*, 53:77-83.
  45. PEAKALL, R. AND SMOUSE P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
  46. PESSARAKLI M.M.; DRIS R. (2003). Pollination and breeding of eggplant. *Food, Agriculture & Environment* Vol. 2 (1): 218-219.
  47. PLAZAS M.; ANDUJAR I.; VILANOVA S.; GRAMAZIO P.; HERRAIZ F.J.; PROHENS J. (2014). Conventional and phenomics characterization provides insight into the diversity and relationship of hypervariable scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) and gboma (*S. macrocarpon* L.) eggplant complexes. *Frontiers in PLANT SCIENCE*. Vol. 5, article 318.
  48. POLIGNANO, G.; UGGENTI, P.; BISIGNANO, V.; GATTA, C. D. (2010). Genetic divergence analysis in eggplant (*Solanum melongena* L.) and allied species. *Genet Resour Crop Evol.*, 57: 171-181.
  49. PROHENS J.; BLANCA J.; NUEZ F. (2005), Morphological and molecular variation in a collection of eggplant from a secondary center of diversity: implications for conservation and breeding. *Proceedings of the Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130:54-63.

50. PROHENS, J.; WHITAKER, B.D.; PLAZAS, M.; VILANOVA, S.; HURTADO, M.; BLASCO, M.; GRAMAZIO, P.; STOMMEL, J.R. (2013). Genetic diversity in morphological characters and phenolic acids content resulting from an interespecific cross between eggplant, *Solanum melongena*, and its wild ancestor (*S. incanum*). *Annals of Applied Biology*, ISSN 0003-4746: 242-257.
51. RAO GR (1981). Investigations on cytogenetics and development of improved pest-resistant egg-plant germplasm: proceedings. *Plant Sci* 90:9–69.
52. RODRÍGUEZ BURRUEZO A.; PROHENS J.; NUEZ, F. (2008). Performance of hybrids between local varieties of eggplant (*Solanum melongena*) and its relation to the mean of parents and morphological and genetic distances among parents. *European Journal of Horticultural Science*, 73:76-83.
53. SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.*, 403: 136-138.
54. SCHAFF DA, JELENKOVIC G, BOYER CD, POLLACK BL (1982) Hybridization and fertility of híbrids derivatives of *Solanum melongena* L. and *S. macrocarpon* L. *Theor Appl Genet* 62:149–153.
55. SCHIPPERS, R.R. (2000). African indigenous vegetables: an overview of the cultivated species. *African indigenous vegetables: an overview of the cultivated species* 2000pp. 221pp.
56. SIFAU M.O.; OGUNKANMI L.A.; ADEKOYA K.O.; OBOH B.O.; OGUNDIPE O.T. (2014). Partition and Distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among eggplant *Solanum* L. In Southwest Nigeria. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. Vol6(1), pp1-7.
57. SIHACHAKR D, DAUNAY MC, SERRAF I (1994) Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L.) with its close and wild relatives. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, somatic hybridization in crop improvement*, vol I. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 255–278.
58. SINGH A.K., SINGH M., SINGH R., KUMAR S., KALLOO G. (2006). Genetic diversity within the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. *Current Science*, 90(5):711-716.
59. SUNSERI F., SCIANCALEPORE A., MARTELLI G., ACCIARRI N., ROTINO G.L., VALENTINO D., TAMIETTI G. (2003). Development of RADP-AFLP map of eggplant and improvement of tolerante to *Verticillium* wilt. In Hammerschlad FA, Saxena P (eds.) *Proceedings of the 26th IHC Biotechnology in Hort Crop Improvement*. *Acta Hort* 625 ISHS, 107-115.
60. SUNSERI F.; SCIANCALEPORE A.; MARTELLI G.; ACCIARRI N.; ROTINO G.L.; VALENTINO D.; TAMIETTI G. (2003). Development of RADP-AFLP map of eggplant and improvement of tolerante to *Verticillium* wilt. In Hammerschlad FA, Saxena P (eds.) *Proceedings of the 26th IHC Biotechnology in Hort Crop Improvement*. *Acta Hort* 625 ISHS, 107-115.
61. SUNSERI, F.; POLIGNANO G. B.; ALBA, V.; LOTTI, C.; BISIGNANO, V.; MENELLA, G.; ALESSANDRO A. D.; BACCHI P.; FOIRE M.; RICCARDI L. (2010). Genetic diversity an characterization of African eggplant germoplasma collection. *African Journal of Plant Science*, 4(7): 231-241.
62. UNTERGRASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115 Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10):1289-91.

63. VILANOVA S.; MANZUR J.P.; PROHENS J. (2012) Development and characterization of genòmic simple sequence repeat markers in eggplant and their application to the study of diversity and relationships in a collection of diferent cultivar types and origins. *Molecular Breeding*. Vol. 30, pp 647-660.
64. WEESE, T.L. y BOHS, L. (2010). Eggplant origins: Out of Africa, into the Orient, en: *Weese and Bohs: Origins of the domesticated eggplant (Solanum melongena)*. *Taxon* 59 (1): 49-56.
65. WITTEWER C.T.; REED, G.H.; GUNDRY, C.N.; VANDERSTEEN, J.G.; PRYOR, R.J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting análisis using LCGreen. *Clin Chem*, 49:853-60.
66. WU F.; EANNETTA N.T.; XU Y.; TANSKLEY S.D. (2009). A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II ( COS II) markers. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 118, pp 927-935.
67. YANG X.; CHENG Y.F.; DENG C.; MA Y.; WANG Z.W.; CHEN X.H.; XUE L.B. (2014). Comparative transcriptome analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) and turkey Berry (*Solanum torvum* Sw.): phylogenomics and disease resistance analysis. *BCM Genomics*, 15: 412

## ANNEX 1

## ENTRADA 170 BBS

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 102.5



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines Fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència: 5.3

Color corol·la: porpra

Nombre de pètals: 5.2



### FRUIT

Pes (g) 3,225

Alçada (cm) 1,505

Amplada (cm) 1,740

Perímetre (cm) 3,896



## ENTRADA MM1153

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 104.00



### FULLA

Fulla lobulades: molt fort

Espines fulla: més de 200

Fulla superfície: Abullonada



### FLOR

Flors per la inflorescència: 5,333

Color corol·la: llum violeta

Nombre de pètals: 5.000



### FRUIT

Pes (g) 21,854

Alçada (cm) 2,968

Amplada (cm) 3,828

Perímetre (cm) 11,919



### ENTRADA BBS 119

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 150.000

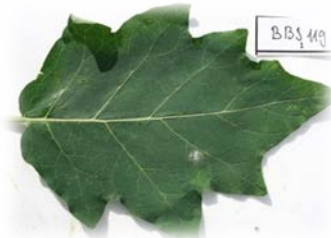


#### FULLA

Fulla superfície: Lisa

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 7.500

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5.000



#### FRUIT

Pes (g) 1,037

Alçada (cm) 1.100

Amplada (cm) 1,160

Perímetre (cm) 3,986



### ENTRADA BBS 178

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 60.000



#### FULLA

Fulla superfície: nivell intermedi

Fulla lobulades: feble

Espines fulla:-



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.600

Color corol·la: porpra

Nombre de pètals: 5.000



#### FRUIT

Pes (g) 75,119

Alçada (cm) 5,980

Amplada (cm) 5,350

Perímetre (cm) 13,355



## ENTRADA RNL0022

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 110,000

### FULLA

Fulla superfície: nivell intermedi

Fulla lobulades: molt feble

Espines fulla: absents

### FLOR

Flors per la inflorescència: 2.800

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,333

### FRUIT

Pes (g) 1860

Alçada (cm) 1,187

Amplada (cm) 1,520

Perímetre (cm) 4,721



## ENTRADA PI 83

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 113,750

### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi

### FLOR

Flors per la inflorescència: 4,100

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 7.000

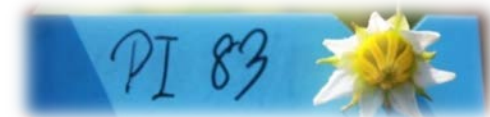
### FRUIT

Pes (g) 152,006

Alçada (cm) 4,519

Amplada (cm) 8,744

Perímetre (cm) 19,181



## ENTRADA BBS 135/A

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 151,000



### FULLA

Full superfície: Lisa

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

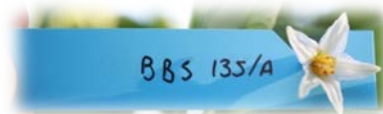


### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.600

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5.100



### FRUIT

Pes (g) 11.151

Alçada (cm) 3.600

Amplada (cm) 2,595

Perímetre (cm) 10,418



## ENTRADA MM 45 7

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 144,000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: 3-5

Fulla superfície: Lisa

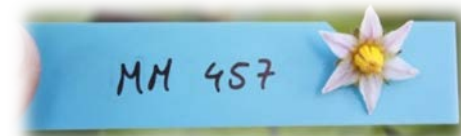


### FLOR

Flors per la inflorescència: 7,400

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 6.000



### FRUIT

Pes (g) 27,106

Alçada (cm) 2,668

Amplada (cm) 4,804

Perímetre (cm) 13,988





## ENTRADA BBS151/A-1

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 132,000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 7,067

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 4,933



### FRUIT

Pes (g) 14,164

Alçada (cm) 4,808

Amplada (cm) 2,568

Perímetre (cm) 12,829



## ENTRADA AN 67

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 135.000

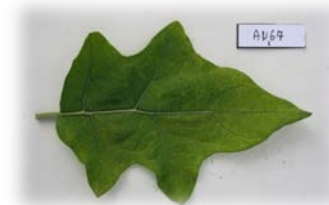


### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Inflorescència de flors: 1,688

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 7.000



### FRUIT

Pes (g) 48,209

Alçada (cm) 4,815

Amplada (cm) 5,080

Perímetre (cm) 16,588



## ENTRADA IVIA 026

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte  
Alçada (cm): 194,000



### FULLA

Fulla lobulades: feble  
Espines fulla: absents  
Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.950  
Color corol·la: blanc  
Nombre de pètals: 5.500



### FRUIT

Pes (g) 29,698  
Alçada (cm) 5,671  
Amplada (cm) 3,767  
Perímetre (cm) 16,265



## ENTRADA AN 39

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte  
Alçada (cm): 162,000



### FULLA

Fulla lobulades: fort  
Espines fulla: absents  
Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència:  
2.000  
Color corol·la: blanc  
Nombre de pètals: 5,667



### FRUIT

Pes (g) 37,590  
Alçada (cm) 4,800  
Amplada (cm) 4,660  
Perímetre (cm) 15,298



## ENTRADA RNL 0252

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 158,000



### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lis



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1,467

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,091



### FRUIT

Pes (g) 6,598

Alçada (cm) 2,500

Amplada (cm) 2,305

Perímetre (cm) 8,141



## ENTRADA UPV 29014

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 191,000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.650

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 6.000



### FRUIT

Pes (g) 65,014

Alçada (cm) 7,652

Amplada (cm) 5,184

Perímetre (cm) 20,143



## ENTRADA BBS 107

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte Alçada (cm): 138,000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.800

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 6.500



### FRUIT

Pes (g) 89,889

Alçada (cm) 3,605

Amplada (cm) 7,200

Perímetre (cm) 18,950



## ENTRADA RNL 0395

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 158,000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa

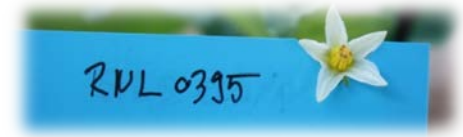


### FLOR

Flors per la inflorescència: 3,833

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,333



### FRUIT

Pes (g) 14,480

Alçada (cm) 2,664

Amplada (cm) 3,408

Perímetre (cm) 10,362



## ENTRADA RNL 0288

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 140.000



### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.100

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,667



### FRUIT

Pes (g) 34,503

Alçada (cm) 4,940

Amplada (cm) 4,265

Perímetre (cm) 16,265



## ENTRADA MM585

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 150.000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi

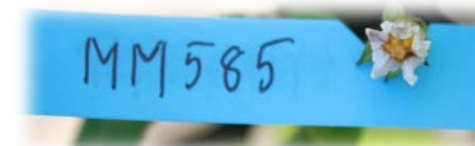


### FLOR

Flors per la inflorescència: 2.600

Corol·la color: blanc verdós

Nombre de pètals: 6.000



### FRUIT

Pes (g) 42,130

Alçada (cm) 2,716

Amplada (cm) 5,208

Perímetre (cm) 15,018



## ENTRADA 1207 MM

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 108,000

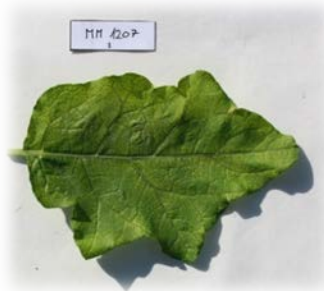


### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.500

Corola color: blanc verdós

Nombre de pètals: 6,667



### FRUIT

Pes (g) 351,489

Alçada (cm) 6,167

Amplada (cm) 11.000

Perímetre (cm) 28,842



## ENTRADA BBS 181/A

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 148,000



### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.000

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,400



### FRUIT

Pes (g) 45,608

Alçada (cm) 3,944

Amplada (cm) 5,376

Perímetre (cm) 16,002



### ENTRADA RNL 0367

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 60.000



#### FULLA

Fulla lobulades: fort

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 3.400

Color corol·la: llum violeta

Nombre de pètals: 6.000



#### FRUIT

Pes (g) 176,518

Alçada (cm) 5,580

Amplada (cm) 8,460

Perímetre (cm) 24,339



### ENTRADA 1558 MM

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 128,750



#### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 2.000

Color corol·la: llum violeta

Nombre de pètals: 5,571



#### FRUIT

Pes (g) 151,100

Alçada (cm) 5,607

Amplada (cm) 7,807

Perímetre (cm) 23,576



### ENTRADA BBS 168

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 112,500

#### FULLA

Fulla lobulades: fort

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi

#### FLOR

Flors per la inflorescència: 4,750

Color corol·la: llum violeta

Nombre de pètals: 5,167

#### FRUIT

Pes (g) 157,851

Alçada (cm) 5,835

Amplada (cm) 7,750

Perímetre (cm) 25,222



### ENTRADA RNL 0340

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 159,000

#### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi

#### FLOR

Flors per la inflorescència: 3,867

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,214

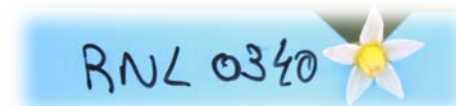
#### FRUIT

Pes (g) 5,970

Alçada (cm) 1,672

Amplada (cm) 2,524

Perímetre (cm) 7,145





## ENTRADA BBS 117

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 65.000

### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: 3-5

Fulla superfície: nivell intermedi

### FLOR

Flors per la inflorescència: 3.000

Color corol·la: porpra

Nombre de pètals: 5,333

### FRUIT

Pes (g) 160,704

Alçada (cm) 5,380

Amplada (cm) 7.500

Perímetre (cm) 22,028



## ENTRADA BBS 111

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 134,000

### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

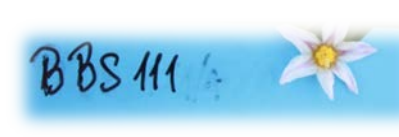
Fulla superfície: nivell intermedi

### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.000

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 6.000



## ENTRADA BBS 171/B

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 78,000

### FULLA

Fulla lobulades: molt fort

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència: 5,400

Color corol·la: llum violeta

Nombre de pètals: 5.000



### FRUIT

Pes (g) 132,042

Alçada (cm) 5,395

Amplada (cm) 7,186

Perímetre (cm) 21,773



## ENTRADA BBS 116

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 155,000

### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 4,400

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,333



### FRUIT

Pes (g) 4,999

Alçada (cm) 1.725

Amplada (cm) 2369

Perímetre (cm) 7.108



### ENTRADA BBS 147/G

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 161,250



#### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.300

Color corol·la: blanc

Nombre de pètal: 5, 769



#### FRUIT

Pes (g) 6,159

Alçada (cm) 1,867

Amplada (cm) 2,513

Perímetre (cm) 6,965



### ENTRADA BBS 125/B

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 180.000

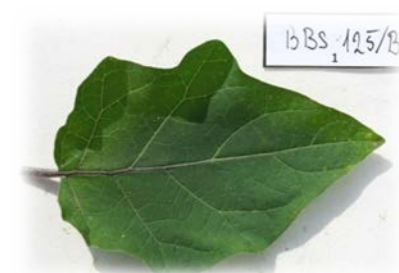


#### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 11,400

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 5.000



#### FRUIT

Pes (g) 1,522

Alçada (cm) 1,520

Amplada (cm) 1.300

Perímetre (cm) 4,845



### ENTRADA BBS 192/E

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 200.000



#### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 3.000

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 4.923



#### FRUIT

Pes (g) 5,974

Alçada (cm) 3,112

Amplada (cm) 2,112

Perímetre (cm) 8,161



### ENTRADA BBS 148/D

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 112,500



#### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi

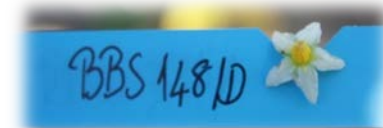


#### FLOR

Flors per la inflorescència: 7.100

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5.000



#### FRUIT

Pes (g) 6,211

Alçada (cm) 1.950

Amplada (cm) 2.420

Perímetre (cm) 7,840



### ENTRADA BBS 131/C

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 131,250



#### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: 6-10

Fulla superfície: Lisa

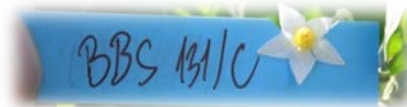


#### FLOR

Flors per la inflorescència: 7,150

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5.000



#### FRUIT

Pes (g) 3,778

Alçada (cm) 1,940

Amplada (cm) 2.100

Perímetre (cm) 6,474



### ENTRADA BBS 178

#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 60.000



#### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines Fulla:-

Fulla superfície: nivell intermedi



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.600

Color corol·la: porpra

Nombre de pètals: 5.000



#### FRUIT

Pes (g) 75,119

Alçada (cm) 5,980

Amplada (cm) 5,350

Perímetre (cm) 13,355



### **ENTRADA BBS 140/B**



#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 188,000

#### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla de superfície: Lisa

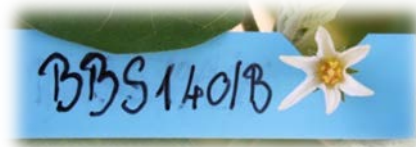


#### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.100

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,533



#### FRUIT

Pes (g) 13,854

Alçada (cm) 2,648

Amplada (cm) 3,222

Perímetre (cm) 10,151



### **ENTRADA UPV 29803**



#### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 158,000

#### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: 3-5

Fulla superfície: Lisa



#### FLOR

Flors per la inflorescència: 8450

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 5.786



#### FRUIT

Pes (g) 29,319

Alçada (cm) 2,544

Amplada (cm) 4,688

Perímetre (cm) 13,555



## ENTRADA BBS 159/B

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte  
Alçada (cm): 175.000 habitants



### FULLA

Fulla lobulades: feble  
Espines fulla: absents  
Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.250  
Color corol·la: blanc  
Nombre de petalo:5, 625



### FRUIT

Pes (g) 22,870  
Alçada (cm) 4,608  
Amplada (cm) 3,340  
Perímetre (cm) 13,691



## ENTRADA 170 BBS

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte  
Alçada (cm): 102,500



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi  
Espines fulla: absents  
Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència: 5,333  
Color corol·la: porpra  
Nombre de pètals: 5,167



### FRUIT

Pes (g) 3,225  
Alçada (cm) 1,505  
Amplada (cm) 1,740  
Perímetre (cm) 3,896



## ENTRADA 110 BBS

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 118,000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.250

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 6.000



### FRUIT

Pes (g) 345,113

Alçada (cm) 4,979

Amplada (cm) 11,137

Perímetre (cm) 29,204



## ENTRADA BBS 142/A

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 168,750

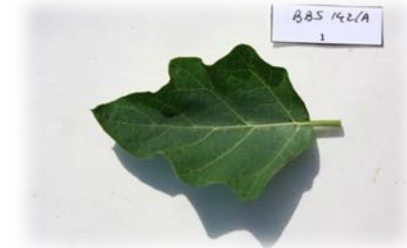


### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.000

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 4, 833



### FRUIT

Pes (g) 10,022

Alçada (cm) 3,415

Amplada (cm) 2,595

Perímetre (cm) 9,853





**ENTRADA de 1483 MM**

PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 150.000



FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: del 7 al 20

Fulla superfície: Lisa



FLOR

Flors per la inflorescència: 6,750

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 5,944



FRUIT

Pes (g) 25,051

Alçada (cm) 2,584

Amplada (cm) 4,360

Perímetre (cm) 12,870



**ENTRADA BBS 180/A**

PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 180.000



FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa

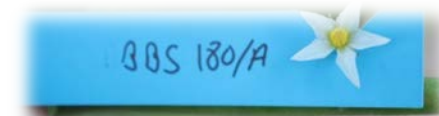


FLOR

Flors per la inflorescència: 12,267

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5.000



FRUIT

Pes (g) 5.786

Alçada (cm) 2,796

Amplada (cm) 2.144

Perímetre (cm) 7,791



## ENTRADA BBS 114

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 168,000



### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 8.200

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5.000



### FRUIT

Pes (g) 4,658

Alçada (cm) 2,476

Amplada (cm) 1,848

Perímetre (cm) 7,587



## ENTRADA AN 05

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 174,000



### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi



### FLOR

Flors per la inflorescència: 1.700

Color corol·la: blanc

Nombre de pètals: 5,833



### FRUIT

Pes (g) 44,990

Alçada (cm) 4,688

Amplada (cm) 4,932

Perímetre (cm) 16,267



## ENTRADA RNL 0187

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 148,000

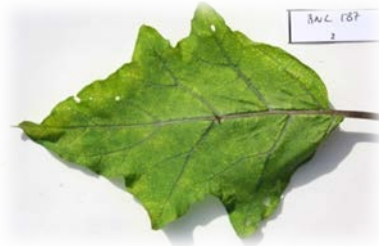


### FULLA

Fulla lobulades: nivell intermedi

Espines fulla: 6-10

Fulla superfície: Lisa



### FLOR

Flors per la inflorescència: 5,800

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 6,071



### FRUIT

Pes (g) 28,592

Alçada (cm) 2,552

Amplada (cm) 4,624

Perímetre (cm) 13,092



## ENTRADA INRA 4

### PLANTA

Hàbit de creixement: erecte

Alçada (cm): 112,000



### FULLA

Fulla lobulades: feble

Espines fulla: absents

Fulla superfície: nivell intermedi

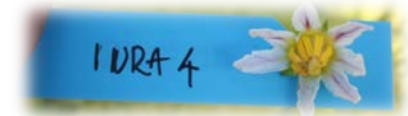


### FLOR

Flors per la inflorescència: 1,933

Color corol·la: blanca amb línia lila

Nombre de pètals: 6,200



### FRUIT

Pes (g) 105,091

Alçada (cm) 3,833

Amplada (cm) 7,300

Perímetre (cm) 22,622

