

Disseny de marcadors moleculars per a l'estudi de l'herència materna en albergínia (*Solanum melongena*) i espècies silvestres relacionades.



Treball Final de Grau

Alba Marina Trigo Cortés

Tutor: Santiago Vilanova Navarro

Cotutor: Mariola Plazas Ávila

Director experimental: Edgar García Fortea

Curs Acadèmic: 2018-2019
València, 29 de Juliol de 2019



Licència Creative Commons "Reconocimiento no comercial-Sin Obra derivada"

Disseny de marcadors moleculars per a l'estudi de l'herència materna en albergínia (*Solanum melongena*) i espècies silvestres relacionades.

Alumna: Alba Marina Trigo Cortés

València, Juliol de 2019

Tutor: Santiago Vilanova Navarro

Cotutora: Mariola Plazas Ávila

Director experimental: Edgar García Fortea

Resum: L'objectiu d'aquest treball és l'estudi de l'herència materna del cloroplast en l'espècie *Solanum melongena* i altres espècies silvestres relacionades, més o menys properes, amb les quals és creuada per la seva millora. S'ha descobert que l'herència materna pot afectar principalment a l'esterilitat masculina, així com a altres característiques fenotípiques, per la qual cosa és interessant el desenvolupament de marcadors que permeten determinar quin parental aporta aquest tipus de material.

Es pretén dissenyar marcadors moleculars a partir de seqüències d'ADN no codificants del cloroplast, pertanyents a diferents regions. Per a això, es recol·lectarà l'ADN de les diferents espècies a estudiar i serà amplificat i seqüenciat per obtenir les seqüències per al seu estudi. Amb aquesta informació s'obtiniran les seqüències consens, necessàries per al desenvolupament de marcadors, mitjançant l'ús de diferents programes informàtics. Posteriorment es dissenyaran CAPS mitjançant la recerca d'enzims de restricció que permetin diferenciar l'herència materna entre les espècies silvestres i melongena *Solanum*. D'altra banda, els canvis nucleotídics que no donen lloc a diferents llocs de tall de restricció es comprovaran mitjançant la tècnica de HRM.

Aquests marcadors seran comprovats en individus F1 on s'ha utilitzat *Solanum melongena* o espècies silvestres relacionades com a mare, així com en poblacions de millora on s'ha utilitzat algun parental silvestre.

Paraules clau: *Solanum*, Herència Materna, Genoma del cloroplast, CAPS, SNPs, High Resolution Melting.

Design of molecular markers for the study of maternal inheritance in eggplant (*Solanum melongena*) and related wild species.

Alumna: Alba Marina Trigo Cortés

València, July 2019

Tutor: Santiago Vilanova Navarro

Cotutora: Mariola Plazas Ávila

Director experimental: Edgar García Fortea

Abstract: The objective of this work is the study of the maternal inheritance of the chloroplast in *Solanum melongena* and other related wild species, more or less close, with which it is crossed for its improvement. It has been discovered that maternal inheritance can mainly affect male sterility, as well as other phenotypic characteristics, so it is interesting to develop markers to determine which parent contributes with this type of material.

The aim is to design molecular markers from DNA sequences that are not coding for the chloroplast, belonging to different regions. To do this, the DNA of the different species to be studied will be collected and will be amplified and sequenced, to obtain the sequences for its study. With this information, the consensus sequences necessary for the development of markers will be obtained through the use of different computer programs. Subsequently, CAPS will be designed through the search for restriction enzymes that allow to differentiate maternal inheritance between wild species and *Solanum melongena*. On the other hand, nucleotide changes that do not result in different restriction cleavage sites will be checked by the HRM technique.

These markers will be tested in F1 individuals where *Solanum melongena* or wild as a mother has been used, as well as in breeding populations where a wild parent has been used.

Keywords: *Solanum*, CAPs, SNPs, High Resolution Melting, Chloroplastic DNA, Maternal Inheritance

Agraïments:

Gràcies a totes les persones que m'han ajudat a treure endavant aquest treball i a creure un poc més en mi mateixa. Sobretot a ma mare i la meva germana per sempre recolzar-me, sent el pilar fonamental de la meva vida.

També al meu tutor, Santi, i companys de laboratori, pel bon rotllo, la germanor i tota l'ajuda oferida.

Gràcies Edgar, per la paciència.

Índex

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 Importància de l'albergínia.....	1
1.2 Origen, domesticació i difusió: l'albergínia cultivada.....	1
1.3 Relació de les espècies silvestres amb l'albergínia cultivada: "Genepools".....	2
1.4 Les espècies silvestres com a recursos genètics per al seu ús en millora.....	3
1.5 L'herència materna del cloroplast i els seus efectes en plantes derivades de l'encreuament amb espècies silvestres. Esterilitat citoplasmàtica masculina (CMS).....	5
2. OBJECTIUS	7
2.1 Objectiu general	
2.2 Objectius específics	
3. MATERIALS I MÈTODES	7
3.1 Material Vegetal.....	7
3.2 Extracció i dilució de l'ADN.....	9
3.3 Amplificació de l'ADN.....	10
3.4 Seqüenciació i tractament informàtic de les seqüències.....	12
3.5 Disseny de marcadors CAPS (Cleave Amplified Polymorphic Sequences).....	12
3.6 Disseny d'encebadors i anàlisi d'SNPs mitjançant HRM.....	13
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	13
4.1 Extracció i dilució de l'ADN.....	13
4.2 Amplificació de l'ADN.....	14
4.3 Seqüenciació i tractament informàtic de les seqüències.....	16
4.4 Disseny de marcadors CAPS mitjançant SolGenomics.....	18
4.5 Digestió enzimàtica.....	19
4.6 Disseny d'encebadors i anàlisi dels SNPs mitjançant HRM.....	22
5. CONCLUSIONS	29
6. BIBLIOGRAFIA	31
7. ANNEXOS (PDFs adjunts)	

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Quadre d'identificació de les espècies silvestres relacionades i *S.melongena* utilitzades a l'experiment.

Taula 2. Quadre d'identificació dels encreuaments entre *S. melongena* i espècies silvestres relacionades utilitzats a l'experiment.

Taula 3. Nom i característiques dels encebadors utilitzats en l'amplificació (PCR).

Taula 4. Condicions i fases de l'amplificació mitjançant PCR.

Taula 5. Marcadors CAPS candidats obtesos de l'anàlisi amb SolGenomics i les seves característiques.

Taula 6. Encebadors dissenyats per a la tècnica de l'HRM.

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Fenotip del fruit de les diferents accessions de *S. melongena* utilitzades com a parentals i de l'espècie relacionada *S. insanum* pertanyent al "pool" o patrimoni genètic primari de l'albergínia.

Figura 2. Imatge comparativa del fenotip de les plantes silvestres del gènere *Solanum* estudiades.

Figura 3. Posició i direcció dels encebadors universals utilitzats per amplificar les tres regions no codificants del cpDNA. Les puntes de les fletxes representen els extrems 3' dels encebadors. Imatge dissenyada a partir de l'article "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA" (Pierre Taberlet et al., 1991).

Figura 4. Marcador "DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder" (Nippon Genetics).

Figura 5. Visualització en gel d'agarosa 1% de l'ADN extret.

Figura 6. Visualització en gel d'agarosa 1% dels resultats de l'amplificació mitjançant Sanger d'espècies silvestres relacionades, *S. melongena* i encreuament BC1M3xEL2.

Figura 7. Visualització en gel d'agarosa 1% dels resultats de l'amplificació dels encreuaments entre plantes silvestres relacionades i *S. melongena* (Taula 2).

Figura 8. Cromatograma de la lectura obtesa en sentit directe per a la regió amplificada pels encebadors trnT_a i trnL_d mitjançant Seqüenciació Sanger per a l'espècie *S. campylacanthum* 7.1.

Figura 9. BLASTn de la seqüència consens de l'espècie *S. campylacanthum* 7.1 de la regió amplificada pels encebadors trnT_e i trnL_f contra el genoma complet del cloroplast de *S. melongena* per a trobar els canvis nucleotídics.

Figura 10. Visualització en gel d'Agarosa 2% de la digestió amb BamHI de *S. melongena* i espècies silvestres relacionades.

Figura 11. Visualització en gel d'agarosa 2% de la digestió amb AflIII de *S. melongena* i espècies silvestres relacionades.

Figura 12. Visualització en gel d'agarosa 2% de la digestió amb els enzims BamHI i AflIII de la F1 resultat dels encreuaments en ambdós sentits de l'espècie *S. melongena* amb espècies silvestres relacionades.

Figura 13. Comprovació in silico dels resultats de la digestió amb BamHI i AflIII en l'espècie *S. insanum*.

Figura 14. SNP candidat elegit per al disseny d'encebadors per a la tècnica d'HRM a partir de les espècies *S. linnaeanum* i *S. campylacanthum*.

Figura 15. Alineament múltiple de les espècies silvestres relacionades estudiades i *S. melongena* per a observar els dos al·lels del polimorfisme C/T i el genotip de cadascuna de les espècies.

Figura 16. HRM de poblacions F1 derivades d'encreuaments entre *S. melongena* i espècies silvestres relacionades amb els encebadors CAM7.1(ad)_48608.

Figura 17. Comprovació dos a dos de les corbes d'HRM dels anàlisis "Tm calling" i "Gene Scanning" de poblacions F1 derivades d'encreuaments entre *S. melongena* i espècies silvestres relacionades.

Figura 18. Perfils representatius de les corbes de fusió de la regió amplificada pels encebadors trnT_a i trnL_d per als encreuaments amb mare *S. melongena*.

Figura 19. Anàlisi “Tm calling” de l’HRM de 16 poblacions segregants MAGIC amb citoplasma de l’espècie *S. melongena* o *S. incanum*.

Figura 20. Corbes d’HRM normalitzades de l’anàlisi “Gene Scanning” de poblacions segregants tipus MAGIC.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Importància de l'albergínia

L'albergínia (*Solanum melongena* L., $2n = 2x = 24$) també coneguda com a *eggplant*, *brinjal* o *aubergine* arreu del món, pertany al clade *Leptostemonum* dins del gènere *Solanum*. Aquest és un dels deu gèneres més rics en espècies de plantes amb flors i té aproximadament 1400 espècies que es produeixen a tots els continents, excepte l'Antàrtida, en una àmplia varietat d'hàbitats des del deserts fins a zones d'alta muntanya (Knapp et al., 2013). És una de les dotze espècies de Solanàcies que han estat seleccionades i desenvolupades com a plantes alimentàries humanes. Altres que s'inclouen són la tomaca (*Solanum lycopersicum* L.), la patata (*S. tuberosum* L.) i el xili (*Capsicum spp.*), (Weese and Bohs, 2010) grup en el qual és el segon cultiu més important de producció total després de la tomaca (*S. lycopersicum* L.) (FAOSTAT, 2015).

A nivell mundial les albergínies es classifiquen com la sisena producció vegetal, després de la tomaca (*Solanum lycopersicum*), la síndria (*Citrullus lanatus*), la ceba (*Allium cepa*), la col (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) i el cogombre (*Cucumis sativus*), en producció mundial amb 49,4 milions de tones produïdes el 2013 (Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació (2015) (Syfert et al., 2016). La major part de la producció d'albergínies es concentra a la Xina, Índia, Iran, Egipte i Turquia, amb Itàlia i Espanya com a productors més importants de la Unió Europea (FAOSTAT, 2016). A més a més, ha estat un dels cultius amb el major increment de producció en els últims anys, amb una producció total que ha augmentat en un 59% en una dècada, passant de $31,0 \cdot 10^6$ t el 2004 a $49,3 \cdot 10^6$ t el 2013 (FAO, 2016).

És un vegetal important en regions tropicals i subtropicals a tot el món, on és una font de fibra dietètica, micronutrients i compostos bioactius (Kaushik et al., 2016) i és considerada generalment com una "verdura baixa en calories". No obstant això, el valor nutritiu de l'albergínia és comparable a la majoria de les altres hortalisses comunes. Conté vitamines, minerals, proteïnes, fibra, i també fitonutrients importants com els compostos fenòlics i els flavonoides, molts dels quals tenen activitat antioxidant. A més, s'ha utilitzat l'albergínia en els medicaments tradicionals. Els seus extractes de teixits s'utilitzen per al tractament de l'asma, la bronquitis, el còlera i la disúria i els fruits i les fulles són beneficiosos per reduir el colesterol sanguini. Recentment, s'ha demostrat que les albergínies també tenen propietats antimutagèniques (Rajam et al., 2008).

1.2 Origen, domesticació i difusió: l'albergínia cultivada.

A diferència de la tomaca, la patata i el xili, l'albergínia és una espècie nativa del Vell Món (*Old World*) i va ser independentment domesticada a partir de l'espècie *S. insanum* L., espècie estesa a l'Àsia tropical desde Madagascar fins les Filipines, a la regió d'Àsia incloent la Xina, l'Índia i Tailàndia (Syfert et al., 2016). El cultiu es va distribuir del sud-est asiàtic cap a l'Àfrica occidental i septentrional, a la Conca del Mediterrani i Europa durant les incursions àrabs en aquestes regions a partir del segle VII.

Es coneixen en total tres varietats d'albergínia cultivada, totes elles pertanyents al clade *Leptostemonum*, taxonòmicament difícil d'estudiar. Incloues al gènere *Solanum* L., tenen origen en el Vell Món (Weese and Bohs, 2010). Aquestes espècies són l'albergínia Gboma (*Solanum macrocarpon* L.) i l'albergínia Escarlata (*Solanum aethiopicum* L.) que es conrea principalment a l'Àfrica, però també en altres llocs com a cultius menors i l'albergínia Brinjal (*S. melongena*)

es conrea a tot el món, especialment a la Mediterrània i Àsia (Syfert et al., 2016), (Acquadro et al., 2017), (Polignano et al., 2009). Les dues primeres tenen el seu origen en els ancestres silvestres *Solanum anguivi* i *Solanum dasyphyllum* respectivament (Sunseri et al., 2010).

L'albergínia Escarlata és un cultiu important de l'Àfrica Central i Occidental, però també és cultivada en el Carib i en Brasil així com en algunes àrees del Sud d'Itàlia (Plazas et al., 2014). És, juntament amb la tomaca, la ceba, el pebre i el okra, un dels cinc vegetals més importants a l'Àfrica central i occidental (Plazas et al., 2014). Lester i Niakan a l'any 1986, tenint com a base les característiques morfològiques, van classificar-la en quatre grups varietals: Aculeatum, Gilo, Kumba i Shum que són explotats de forma diferent: Aculeatum s'utilitza com a ornamental, Gilo pels seus fruits, Kumba per a fruits i fulles, mentre que Shum només per les seves fulles (Sunseri et al., 2010). A causa de la considerable afinitat filogenètica i de l'analogia en el nivell de ploidia amb *S. melongena*, es podria utilitzar per a la millora genètica de l'albergínia en diferents camps com els encreuaments interespecífics, l'hibridació somàtica o la transformació genètica (Sunseri et al., 2010). Per la seva banda, l'albergínia Gboma (*S. macrocarpon* L.) és una espècie de cultiu menys estès però és molt important en alguns països, com Benin o les regions de selva tropical del litoral d'Àfrica i del riu Congo (Plazas et al., 2014). També es tracta d'una espècie morfològicament variable cultivada per l'interès en els seus fruits, fulles o ambdòs (Acquadro et al., 2017). Aquestes espècies són molt interessants per l'aportació al coneixement de la variabilitat genètica en els processos de millora de l'albergínia i a més permeten ampliar la base genètica, degut a que contenen resistències d'interès.

Cadascuna de les tres albergínies conreades juntament amb els seus avantpassats salvatges i els parents salvatges més propers es coneixen comunment com els complexos d'albergínia brinjal, escarlata i gboma (Knapp et al., 2013).

1.3 Relació de les espècies silvestres amb l'albergínia cultivada: "Genepools"

Basant-se en dades d'encreuament i biosistemàtica, nou espècies silvestres, juntament amb *S. melongena*, formen el "complex de l'albergínia", que inclou l'albergínia brinjal cultivada i els seus familiars silvestres més propers (Knapp et al., 2013). Per altra banda, segons van explicar Harlan i Wet al 1971, les espècies silvestres es poden classificar en funció de la seva capacitat d'encreuament amb èxit amb espècies conreades en "genepools" o patrimonis gènics primaris, secundaris i terciaris (Taher et al., 2017).

Amb l'albergínia i les espècies relacionades, la delimitació de *genepools* biològicament significatius és un repte a causa de les dades limitades sobre la capacitat d'encreuament enregistrades, així com al gran nombre de possibles membres del genepool. Tenint en compte les dades disponibles sobre la capacitat d'encreuament, es va suggerir la inclusió de l'espècie *S. insanum* en el *genepool* primari, quaranta vuit-espècies amb les quals es pot interrelacionar les albergínies amb diferents graus de dificultat en el segon *genepool* i per últim, les espècies silvestres i males herbes originàries del Nou Món en el tercer *genepool*, amb les quals només es poden obtenir híbrids altament estèrils a través del rescat embrionari (Acquadro et al., 2017).

Per tant, el *genepool* primari de l'albergínia consisteix en les espècies cultivades i el seu ancestre silvestre *S. insanum*, que es distribueix de forma natural al Sud-est Asiàtic, a Madagascar i Maurici on es troba freqüentment com a mala herba (Kaushik et al., 2016). Les espècies del *genepool* primari poden ser encreuades fàcilment i produir fèrtils híbrids (Plazas et al., 2016).

El *genepool* secundari està format per espècies espinoses d'Àfrica i el Sud-Est d'Àsia. Inclou espècies de: 1) el clade albergínia estretament relacionat, com *Solanum campylacanthum*, *S. lichtensteinii* i *S. linnaeanum*; 2) Del clade anguivi: amb *S. anguivi* i *S. dasyphyllum*, que com ja hem dit són els ancestres de les albergínies cultivades Escarlata i Gboma i les espècies endèmiques de les Illes Canàries: *Solanum lidii* i *Solanum vespertilio*, *S. violaceum* i *Solanum tomentosum*; i 3) del clade Madagascar, més distant, amb espècies com: *S. pyracanthos*. Aquest és un grup d'elevada importància en els programes de millora deguda a l'elevada diversitat de mida, forma i composició del fruit, així com a la seva distribució en diferents ambients el que dona lloc a diferents toleràncies i resistències a estressos abiòtics, pesticides i enfermetats (Plazas et al., 2016). En aquest grup també es troba inclosa l'espècie *S. incanum*, la qual va ser considerada durant molt de temps l'ancestre de *Solanum melongena* i part del *genepool* primari junt a l'espècie *S. insanum* (Plazas et al., 2016). A diferència del *genepool* primari, el grau d'èxit de l'hibridació interespecífica sexual entre l'albergínia i les espècies del *genepool* secundari, així com la fertilitat dels híbrids resultants varien en funció de les espècies implicades i de la direcció de l'encreuament (Kaushik et al., 2016).

Finalment, el *genepool* terciari és una mescla d'espècies del subgènere *Leptostemonum*, incloent espècies tant del Vell Món com del Nou Món, amb les quals ocasionalment pot ser possible obtenir híbrids amb baixa fertilitat mitjançant el rescat d'embrions o amb hibridació somàtica. En aquest grup, les espècies *S. torvum* i *S. sisymbriifolium* són les de major interès en millora, degut a la seva resistència a un gran nombre d'enfermetats. Per altra banda, *S. elaeagnifolium*, una herba invasiva, ho és degut a la seva elevada tolerància a la sequera (Plazas et al., 2016).

1.4 Les espècies silvestres com a recursos genètics per al seu ús en millora

Les albergínies cultivades han demostrat ser susceptibles a diversos factors d'estrès, biòtic i abiòtic, que donen lloc a pèrdues considerables i afecten a la qualitat dels fruits (Rajam et al., 2008). En particular, els problemes relacionats amb el sòl (la mustiguesa del terra deguda a bacteris i fongs, la presència de nematodes) i els insectes són la causa més greu de pèrdues de rendiment tant en cultius de camp obert com en hivernacle. S'ha trobat resistència/tolerància parcial a la majoria dels patògens dins del complex genètic de l'albergínia, però la seva baixa eficàcia, sovint, va dificultar una aplicació efectiva en els programes de reproducció (Rotino et al., 2016).

La selecció i la reproducció de l'albergínia durant anys s'han centrat principalment en la millora de les característiques dels fruits com ara la mida, el pes, el color i la forma, la picor i més recentment, les propietats organolèptiques, nutricionals i bioactives. Això ha provocat el desenvolupament d'una gran quantitat de varietats d'albergínia, la forma dels fruits de les quals varia en mida i forma, des d'allargades a planes. No obstant això, com en molts altres cultivars domèstics, la selecció antropogènica ha donat lloc a una reducció dràstica de la variació genètica del genoma de l'albergínia, a causa de l'efecte de coll d'ampolla resultant del procés de mostreig d'un nombre limitat de plantes silvestres escollides per a la domesticació (Acquadro et al., 2017).

Tant les espècies cultivades interfèrtils de l'albergínia així com els parents silvestres ("crop wild relatives" o CWR) són una font de variació per a molts trets d'interès i representen un objectiu evident per ajudar a millorar l'albergínia (Acquadro et al., 2017). Les espècies silvestres produeixen fruits petits, amargs, gairebé sempre comestibles, i la planta generalment és molt espinosa. Algunes d'elles tenen nivells elevats d'àcid clorogènic i altres compostos bioactius, que poden tenir un interès potencial per a la salut humana (Taher et al., 2017). A més a més, creixen en un ampli rang de condicions ambientals, incloent condicions extremes com zones

desèrtiques, zones amb temperatures nocturnes baix zero o amb canvis de temperatura grans, el que fa que presenten major diversitat genètica que les espècies cultivades (Kaushik et al., 2016).

L'estudi individual de les espècies silvestres ha suggerit la importància d'algunes espècies silvestres com *S. anguivi*, *S. campylacanthum*, *S. pyracanthos* i *S. violaceum* que són d'interès per a augmentar el vigor de les albergínies cultivades o per al seu ús directament com a portaempelts (també coneguts com a patró). *S. torvum* ha demostrat alta resistència a la sal i una baixa transferència de cadmi, així com la seva alta resistència a enfermetats relacionades amb el sòl pel que s'ha utilitzat com a portaempelt. Per la seva banda, les espècies *S. linneanum* i *S. tomentosum* han sigut utilitzades per obtenir híbrids parcialment fèrtils que s'han encreuat amb les espècies cultivades per a la millora de la qualitat del fruit (Kaushik et al., 2016).

Tot i que els familiars silvestres són valuosos i útils per a la millora genètica de l'albergínia cultivada a través de mètodes convencionals de reproducció i biotecnologia, l'explotació d'aquestes espècies silvestres en els programes de reproducció s'ha de dur a terme amb cautela. Alguns d'ells poden tenir trets indesitjables com l'alta susceptibilitat a *Colletotrichum gloeosporioides* trobada en *S. torvum*, el sabor amarg a causa d'un alt nivell de l'esteroid saponina present en *S. linnaeanum* o a nivell de tamany de fruit petit, espinositat etc. Aquestes característiques han de ser eliminades en el procés de millora, per tant les espècies silvestres més desitjables són aquelles més similars a l'espècie de cultiu en aquestes característiques (Rajam et al., 2008).

És possible que els familiars silvestres juguen un paper significatiu en la seguretat alimentària del segle XXI. Això es deu al seu potencial ús en la millora vegetal per produir varietats de cultiu que resisteixen els impactes adversos del canvi climàtic, la creixent escassetat de nutrients, aigua i altres aportacions, i noves plagues i malalties (Syfert et al., 2016), (Plazas et al., 2016). En aquest sentit, la identificació de parents salvatges amb interès per a la millora de les collites i la conservació de la variació genètica i la comprensió de la identitat i les relacions d'aquests taxons a nivell d'espècies són àrees clau per abordar la seguretat alimentària en el futur (Ranil et al., 2016).

Encara que s'ha demostrat el seu interès per a la millora i contràriament a altres cultius vegetals importants; com la tomaca, la qual al ser l'espècie de cultiu model més propera amb ferramentes genòmiques molt desenvolupades s'ha utilitzat de referència en molts estudis de l'albergínia (Gramazio et al., 2018), s'ha descuidat en gran mesura el potencial de les espècies silvestres l'estudi del qual ha estat molt limitat, a vegades amb interès purament acadèmic (Gramazio et al., 2018), (Kaushik et al., 2016). A més a més, els esforços per a introduir les resistències presents a les espècies silvestres en cultivars han aconseguit un èxit limitat a causa de les incompatibilitats sexuals. No obstant això, els desenvolupaments recents en biotecnologia de l'albergínia, incloent-hi la regeneració in vitro, l'ús de protoplast, l'androgènesi i els transgènics han facilitat la producció d'híbrids somàtics útils i cíbrids, així com plantes transgèniques amb valors afegits (Rajam et al., 2008). Per altra banda, també ha ajudat la disponibilitat d'una gran varietat de marcadors moleculars obtinguts en els últims anys mitjançant tècniques genòmiques el que permet una selecció assistida per marcadors molt eficient (MAS), seleccionant els gens o locis de trets quantitius (QTLs) d'interès i facilitant l'eliminació de trets indesitjables dels parents salvatges i l'estalvi temps i recursos en comparació amb l'enfocament convencional de la cria. Avui en dia, molts SNPs i microsatèlits es troben disponibles per a l'estudi de l'albergínia, pel que la selecció assistida amb marcadors moleculars combinada amb la fenotipació permetrà la selecció eficient del material vegetal amb gens desitjables introgressats

desde les espècies silvestres sense trets desfavorables, així com per obtenir col·leccions de línies d'introgressió (Plazas et al., 2016).

1.5 L'herència materna del cloroplast i els seus efectes en plantes derivades de l'encreuament amb espècies silvestres. Esterilitat citoplasmàtica masculina (CMS)

Durant els programes de millora és fonamental conèixer el grau de compatibilitat sexual de les espècies o varietats que s'estàn emprant. Un dels problemes més habituals derivat de l'encreuament amb espècies silvestres és l'esterilitat, la qual pot ser de diferents tipus. L'esterilitat masculina implica que les plantes no produïsquen antereres funcionals, pol·len o gàmetes masculins, tot i que el potencial de reproducció femení es manté. Pot deure's a una esterilitat masculina de tipus nuclear, la qual es deu a mutacions recesives que afecten a diverses funcions: per exemple a les proteïnes implicades en la meiosi masculina, el metabolisme de les hormones vegetals, la biosíntesi de molècules complexes o de metabolits secundaris. O a una esterilitat masculina citoplasmàtica (CMS) la que es defineix com “deficiència hereditària materna per a produir polen viable” i les mitocondries són les responsables d'aquest fenomen (Budar and Pelletier, 2001).

L'esterilitat masculina citoplasmàtica (CMS) és una espècie d'esterilitat a les plantes causada per interaccions nuclears i mitocondrials específiques. És un tret hereditari matern, que facilita la producció de llavors híbrides de molts cultius i permet als criadors aprofitar els avantatges de rendiment associats al vigor híbrid de l'encreuament amb espècies silvestres relacionades (Khan and Isshiki, 2010).

La CMS ha sorgit de forma natural en poblacions de plantes silvestres com a resultat de la recombinació mitocondrial o s'ha obtés a través de manipulacions intencionals com els encreuaments interespecífics. Aquest últim tipus es denomina CMS aloplasmàtic on normalment el citoplasma d'una planta conreada és substituït per un espècie relativa silvestre. (Yoshimi et al., 2013). La substitució del citoplasma de l'albergínia amb la de les espècies silvestres de *Solanum* s'ha descrit anteriorment com a conseqüència d'esterilitat masculina citoplasmàtica en diversos estudis. Fins ara, el citoplasma de *Solanum gilo* (Fang et al. 1985), *Solanum violaceum* (Isshiki i Kawajiri 2002), *Solanum virginianum* (Khan i Isshiki, 2008), *Solanum kurzii* (Khan i Isshiki, 2009), *Solanum aethiopicum* (Khan i Isshiki, 2010a), *Solanum anguivi* (Khan i Isshiki, 2010b) i *Solanum grandifolium* (Saito et al., 2009) han estat utilitzats per a observar aquest fenomen. A més, s'ha observat que el fenotip de l'esterilitat masculina difereix segons el tipus de citoplasma: l'esterilitat masculina amb el citoplasma de *S. violaceum*, *S. virginianum* i *S. kurzii* és del tipus antera indehiscent, mentre que la del citoplasma de *S. aethiopicum*, *S. anguivi*, i *S. grandifolium* són del tipus de producció no pol·len (Yoshimi et al., 2013).

Aquesta diferenciació en l'expressió fenotípica de l'esterilitat masculina aloplasmàtica ha portat als investigadors a inferir que hi ha una variació en els genomes citoplasmàtics de les espècies de *Solanum* silvestres (Yoshimi et al., 2013). A més a més, s'ha descobert que la fertilitat masculina es pot restaurar mitjançant uno o vàrios gens restauradors de la fertilitat (Rf), codificats al nucli, que tenen un paper clau en el control genètic nuclears de CMS (Khan and Isshiki, 2010).

Per tant, si el que es vol és obtenir plantes fèrtils amb les característiques d'interès de les espècies silvestres, és preferible utilitzar *S. melongena* com a parental femenina, ja que permet la recuperació en la primera generació del citoplasma de *S. melongena*. Així s'evita possibles

problemes d'esterilitat en les generacions d'encreuament que s'ha observat en les línies d'albergínies amb citoplasma silvestre. A més, la fruita de *S. melongena* té més llavors que les espècies silvestres de petits fruits i, en conseqüència, teòricament és possible obtenir més llavors per encreuament quan s'utilitza *S. melongena* com a parental femení. Finalment, les llavors extretes de la fruita de *S. melongena* tampoc tenen latència o tenen una latència feble, mentre que les llavors de fruits d'espècies silvestres poden tenir una forta latència, cosa que pot dificultar la seva germinació.

Per altra banda, l'obtenció de línies amb esterilitat citoplasmàtica masculina pot ser d'interès. La majoria dels cultius comercials d'albergínia són híbrids F1, degut al seu vigor híbrid considerable. Les línies estèrils masculines obteses en estudis anteriors s'han caracteritzat per l'expressió estable de l'esterilitat masculina funcional, que contenia pol·len viable útil per a la propagació de línies estèrils masculines com per a la producció de línies pures a través del cultiu d'anteres, el que és potencialment valuós per a la producció de llavors híbrides (Hasnunnahar et al., 2012). La producció tradicional de llavors de cultivars híbrids d'albergínia és laborosa, ja que requereix un gran nombre de plantes masculines estèrils com a parentals femenins les quals s'obtenen manualment mitjançant l'emmasculació per a evitar que s'autofecunden. Aquest mètode és car i es requereix una línia de manteniment. Si s'estableixen sistemes masculins estèrils, es podria reduir la mà d'obra per produir llavors híbrides F1 (Isshiki and Kawajiri, 2002), (Khan and Isshiki, 2010) ja que les plantes amb CMS són més convenientes per a la producció degut a la menor demanda de manteniment que requereixen i a la capacitat de restauració de la fertilitat. A més a més, sha observat que les plantes amb CMS que s'han seleccionat amb èxit en poblacions naturals són menys propenses a associar-se amb caràcters no desitjables per a la producció de llavors (Budar and Pelletier, 2001).

Per tant, aquesta informació recopilada denota que un aspecte important en la hibridació interespecífica amb espècies silvestres per a la millora de l'albergínia és la direcció de l'encreuament ja que això pot afectar la seva taxa d'èxit, el nombre de llavors produïdes, així com la latència de les llavors a causa d'efectes materns. Aquestes característiques poden ser desitjades o no com s'ha vist segons el tipus de material vegetal que es vol desenvolupar, per tant queda patent l'interès del desenvolupament de marcadors moleculars que permeten determinar de quina espècie prové el material genètic del cloroplast.

Per totes aquestes raons queda justificat l'interès del següent treball, on es tractarà de comprendre millor l'herència a l'esterilitat citoplasmàtica en albergínia. Amb açò, es preten desenvolupar marcadors per tal de dirigir d'una forma més eficient els programes de millora en aquesta direcció. Per tal d'aconseguir-ho, es presenten el següents objectius.

2. OBJECTIUS

Objectiu general: desenvolupament de marcadors moleculars basats en SNPs que permeten l'estudi de l'herència materna en *S. melongena* i espècies silvestres relacionades.

1. Selecció de SNPs provinents de la seqüenciació d'espècies silvestres relacionades amb *S. melongena*.
2. Disseny de marcadors moleculars basats en PCR.
3. Validació de SNPs mitjançant marcadors de tipus CAPS.
4. Validació de SNPs mitjançant la tècnica d'HRM.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Material vegetal

El material vegetal es va obtenir en la col·lecció de germoplasma de l'Institut de Conservació i Millora de l'Agrodiversitat Valenciana (COMAV) de la Universitat Politècnica de València. Per a aquest experiment es va extreure material vegetal de l'espècie *Solanum melongena* i d'espècies silvestres relacionades pertanyents als pool genètics primari, secundari i terciari de l'albergínia (Taula 1) (Fig. 2) i de plantes derivades de l'encreuament en ambdòs sentits entre les espècies relacionades i *S. melongena*, les quals es van gastar per a estudiar els polimorfismes presents al genoma de l'ADN cloroplàstic.

Per a obtenir els encreuaments desitjats es van utilitzar les llavors proporcionades pel banc del germoplasma COMAV i es va realitzar la seva germinació amb el protocol desenvolupat per Ranil et al. (2015). A més a més es van utilitzar diferents accessions de l'espècie *S. melongena* com a parentals en els entrecreuaments per a obtenir les plantes F1 (*S. melongena* 1, 3 i 5) (Fig. 1). En els encreuaments la planta mare sempre és la primera que s'anomena (Taula 2).

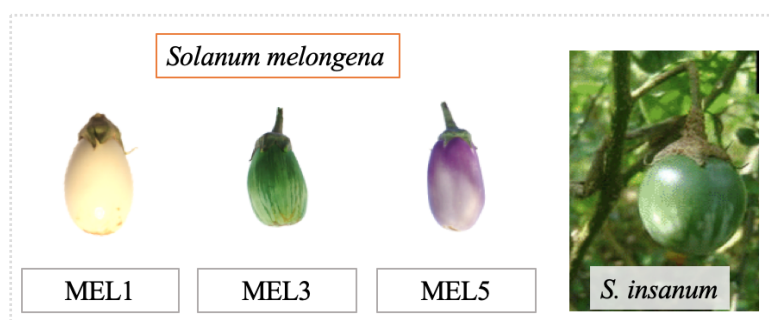


Figura 1. Fenotip del fruit de les diferents accessions de *S. melongena* utilitzades com a parentals i de l'espècie relacionada *S. insanum* pertanyent al “genepool” o patrimoni genètic primari de l'albergínia.

Com a control en els experiments amb les espècies silvestres es va utilitzar l'híbrid, BC1M3xEL2, derivat del retroencreuament de la F1 de l'encreuament *S. melongena* x *S. elaeagnifolium* amb *S. melongena*.

Per altra banda, es van utilitzar 16 individus d'una població segregant tipus MAGIC, els quals tenen com a planta mare les espècies *S. melongena* o *S. incanum*.

Taula 1. Quadre d'identificació de les espècies silvestres relacionades i *S.melongena* utilitzades a l'experiment.

Espècies
<i>Solanum anguivi</i>
<i>Solanum bonariense</i>
<i>Solanum campylacanthum</i>
<i>Solanum dasyphyllum</i>
<i>Solanum elaeagnifolium</i>
<i>Solanum incanum</i>
<i>Solanum insanum</i>
<i>Solanum lichtensteinii</i>
<i>Solanum lidii</i>
<i>Solanum linnaeanum</i>
<i>Solanum melongena</i>
<i>Solanum tomentosum</i>
<i>Solanum torvum</i>
<i>Solanum violaceum</i>

Figura 2. Imatge comparativa del fenotip de les plantes silvestres del gènere *Solanum* estudiades.



Taula 2. Quadre d'identificació dels encreuaments entre *S. melongena* i espècies silvestres relacionades utilitzats a l'experiment.

Encreuaments
<i>S. anguivi</i> 1.1 x <i>S. melongena</i> 5.3
<i>S. melongena</i> 5.2 x <i>S. anguivi</i> 2.2
<i>S. insanum</i> 1 x <i>S. melongena</i> 3
<i>S. melongena</i> 1.2 x <i>S. insanum</i> 2.1
<i>S. lichtensteinii</i> 3.1 x <i>S. melongena</i> 1.3
<i>S. melongena</i> 1.3 x <i>S. lichtensteinii</i> 2.2
<i>S. dasyphyllum</i> 1.1 x <i>S. melongena</i> 1.3
<i>S. melongena</i> 3.3 x <i>S. dasyphyllum</i> 1.3
<i>S. incanum</i> 1 x <i>S. melongena</i> 1.5

3.2 Extracció i dilució de l'ADN

Per a l'extracció de l'ADN genòmic es van utilitzar fulles joves, de les espècies anteriorment anomenades, recolectant uns 70 g de teixit vegetal per a cada mostra. Es va extreure l'ADN mitjançant el protocol del mètode mixte CTAB-Sílca d'extracció de DNA desenvolupat al laboratori de *Solanáceas* del Centre de Conservació i Millora de l'Agrodiversitat Valenciana (COMAV) (Alonso D., Gramazio P., Plazas M., Villanueva G., García-Fortea E., Díez M.J., Prohens J., Vilanova S., 2018, Protocolo innovador para la obtención de ADN genómico vegetal de alta calidad, Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias, Almería). Per a la seva quantificació es va fer servir espectrofotòmetre Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Es van utilitzar les relacions d'absorbància 260/280 i 260/230 de l'espectrofotòmetre per a determinar-ne la qualitat.

La integritat i quantificació de l'ADN es va comprovar mitjançant gel d'agarosa a l'1%, fent servir marcatge amb GelRed, el marcador molecular d'àcids nucleics Lambda/HindIII i revelat amb llum UV en l'analitzador d'imatges GelDocX del software Quantity One (BioRad).

Posteriorment es van utilitzar els valors de concentració obtesos de la quantificació amb Nanodrop per a diluir l'ADN a 30 i a 50 ng/μl per als posteriors anàlisis d'amplificació per PCR i de High Resolution Melting (HRM) respectivament.

3.3 Amplificació de l'ADN

L'amplificació de les zones d'interès del DNA del cloroplast es va realitzar mitjançant PCR utilitzant quatre dels sis encebadors dissenyats a l'article "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA" (Pierre Taberlet et al., 1991).

Es van utilitzar els encebadors trnT_a, trnL_d, trnT_e i trnL_f per tal de cobrir les tres regions no-codificants que s'esmenten a l'article. A la Taula 3 es troben les característiques. A la Figura 3 es mostra la posició i direcció dels encebadors i les regions que amplifiquen de forma esquematitzada.

Taula 3. Nom i característiques dels encebadors utilitzats en l'amplificació (PCR).

Nom	Seqüència	Contingut GC (%)	Tm (°C)
trnT_a	5'- CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT -3'	40.0	51.0
trnL_d	5'- GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC -3'	55.0	54.4
trnT_e	5'- GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC -3'	55.0	54.4
trnL_f	5'- ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG -3'	45.0	52.8

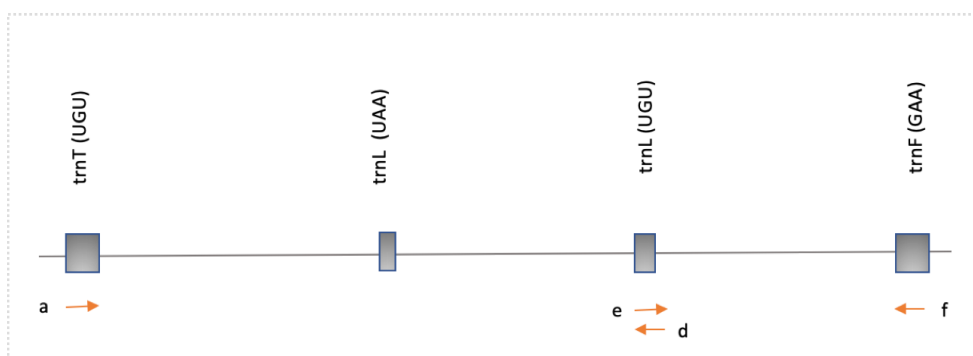


Figura 3. Posició i direcció dels encebadors universals utilitzats per amplificar les tres regions no codificants del cpDNA. Les puntes de les fletxes representen els extrems 3' dels encebadors. Imatge dissenyada a partir de l'article "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA" (Pierre Taberlet et al., 1991).

Per a l'amplificació es va utilitzar el mix *FastGene Optima HotStart mix with dye (2X)* (Nippon Genetics Europe, GmbH). L'amplificació es va dur a terme amb l'aparell *MasterCycler nexus* (Eppendorf Ibérica) amb un volum final de 25 µl per mostra i els següents volums de reactius: 2µl de DNA a 30ng/µL, 0.3 µL a 10µM dels encebadors directe i invers de cada parell de primers per a les dues regions a estudiar (es van realitzar així dues amplificacions: la de la regió coberta pels encebadors trnT_a i trnL_d, que cobreix la regió entre trnT (UGU) i l'intró 3' trnL (UAA), i la dels encebadors trnT_e i trnL_f que cobreix la regió entre l'intró trnL (UAA) i trnF (GAA)), i 12.5 µL de 2XBuffer (FastGene) que conté; FastGene Optima DNA polimerasa (0.625 U per 25 µl de reacció), FastGene Optima Buffer (1X), MgCl₂ (2.0 mM a 1X), dNTPs (0.3 mM de cadascun 1X) i estabilitzadors. Les condicions d'amplificació es troben descrites a la Taula 4.

Taula 4. Condicions i fases de l'amplificació mitjançant PCR.

Pas	Fase	Temperatura °C	Temps (min)	Cicles
1	Desnaturalització inicial	95	3	1
2	Desnaturalització	95	0.5	30
3	Alineament	62/55	0.5	
4	Elongació	72	1	
5	Elongació final	72	10	1
6	Conservació	10	-	-

Els productes de PCR van ser visualitzats amb gel d'electroforesi d'agarosa a l'1%, marcatge amb GelRed i detecció amb llum UV mitjançant el software Quantity One (BioRad). Per a determinar visualment el tamany dels productes de PCR es va utilitzar el marcador DNA Molecular Weight (Fig. 4) (Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder, <https://www.nippongenetics.eu/en/product/100-bp-dna-ladder/>).

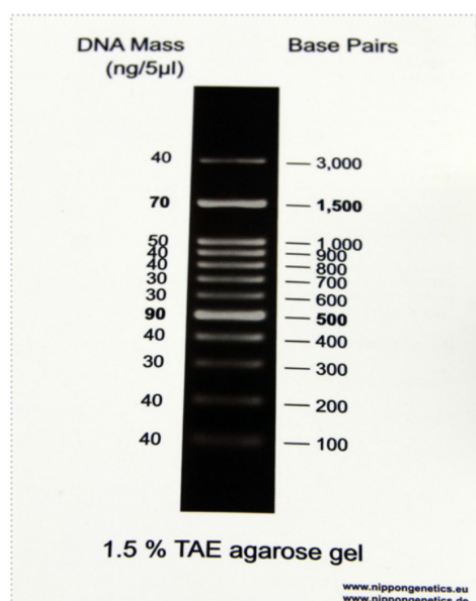


Figura 4. Marcador “DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder” (Nippon Genetics)

Els resultats de la PCR es van purificar mitjançant el mètode de Precipitació i purificació de producte de PCR amb acetat amònic (Green and Sambrook, et al.). Es va preparar acetat amònic a 7.5 M que es va afegir al producte de PCR, prèviament diluït amb 50 µl d'aigua. Es van afegir 16,66 µl d'acetat amònic per a arribar a una concentració final de 2.5 M. Es va afegir 1 volum d'etanol absolut i es va deixar reposar 10 min. Es va centrifugar (13.000 rpm, 10 min) i descartar el sobrenedant. Es va afegir de nou 1 volum d'etanol ara al 70% i es va centrifugar (13.000 rpm, 5 min). Finalment es va deixar secar el “pellet” que es va resuspendre en 25 µl d'aigua.

Es van observar de nou els resultats de la purificació mitjançant un gel d'agarosa a l'1% i amb el programa Quantity One (BioRad).

3.4 Seqüenciació i tractament informàtic de les seqüències

La seqüenciació es va realitzar mitjançant el mètode Sanger al Servei de seqüenciació d'ADN i anàlisi de l'expressió gènica de l'IBMCP (Institut de Biologia Molecular i Cel·lular de Plantes), ubicat a la Ciutat Politècnica de la Innovació del campus de la Universitat Politècnica de València. Obteses les seqüències van ser analitzades i ensamblades mitjançant l'ús de programes informàtics. Les seqüències directa i inversa de cada espècie es van tractar, mitjançant el programa Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>), amb les funcions "Trim low quality" per a eliminar zones de la seqüència de baixa qualitat i "reverse" per a donar la volta a les seqüències reverse. Les dues seqüències que superposen de cada espècie van ser combinades mitjançant el programa Merger (EMBOSS). Així com el BLAST (Altschul et al., 1990) per a reconèixer els polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) presents a les espècies silvestres i que permeten la seva diferenciació de *S. melongena*.

3.5 Disseny de marcadors CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Amb les seqüències consens obteses a partir de la seqüenciació (en format FASTA) es va utilitzar el programa CAPS Designer (SolGenomics, 2008) per a predir enzims de restricció que reconeixen i tallen regions de polimorfisme, creant un patró de bandes específic per a cadascuna de les espècies. L'anàlisi es va realitzar dos a dos, de cadascuna de les espècies silvestres amb *S. melongena*. Es va utilitzar la ferramenta BLAST de l'NCBI (Altschul et al., 1990) alineant les seqüències consens finals, obteses de la seqüenciació, contra el genoma complet del cloroplast de *Solanum melongena*. D'aquest alineament es va obtenir per a la seqüència consens de cada espècie silvestre aquella zona del genoma complet del cloroplast de *S. melongena* (accésió MH283711.1 *Solanum melongena* var. *insanum* voucher MH<IND>: *Sampath Kumar et al. 941 chloroplast, complete genome*) amb el que alinea, que és junt a la seqüència consens la informació a introduir en el programa per a la búsqueda de marcadors.

Per a la búsqueda de CAPS es van tenir en compte diferents paràmetres a l'hora de buscar els enzims candidats: es va demanar al programa que busqués enzims amb un preu inferior a 65\$/1000u, no mostrara enzims que tallen més de 4 vegades en ambdós parentals i per últim l'exclusió de 20 pb a ambdós extrems de les seqüències.

El mix de la reacció de digestió va consistir en un volum final de 25 µl per a cada mostra amb les següents quantitats de reactius: 10 µl de producte de PCR, 2.5 µl del tampó especificat per a cada enzim especificat per la seva casa comercial, 0.5 µl de l'enzim i 12 µl d'H₂O pura.

Ambdues digestions es van realitzar en l'aparell Mastercycler Eppendorf nexus (Hamburg, 2012) amb un programa de dos pasos: una incubació d'una hora a la temperatura adient i una etapa d'inactivació de 15 min a les temperatures especificades per la casa comercial per a cadascun dels enzims.

Per a observar els productes de les digestions es va fer servir electroforesi en gel d'agarosa al 2%. El marcador de pesos moleculars emprat es va seleccionar en funció del tamany dels fragments de PCR, de mode que es va utilitzar el mateix que a la visualització de l'amplificació: "DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder" (Nippon Genetics). Per a visualitzar els resultats de nou s'utilitza revelat amb llum UV a l'analitzador d'imatges GelDocX del software Quantity One (BioRad).

3.6 Disseny d'encebadors i anàlisi d'SNPs per a la tècnica d'HRM.

Per a dissenyar els encebadors es va utilitzar el programa "Primer 3" (Rozen i Skaletsky, 2000) considerant com a encebadors òptims aquells amb una Temperatura de fusió (T_m) de 60°C i una mida d'uns 20-25 pb. Es va restringir la mida de l'amplicó a uns 90-150 pb ja que per a l'anàlisi d'SNPs mitjançant HRM es requereixen fragments com més petits millor per a obtenir els resultats òptims.

L'anàlisi d'SNPs mitjançant High Resolution Melting es va dur a terme en l'aparell *LightCycler 480* (Roche). El mix de reacció va consistir en un volum final de reacció de 10µl amb les següents quantitats de reactius: 0.3µl dels encebadors directe i invers dissenyats diluïts 1:10, 2µl de *MasterMix qPCR No-ROx PyroTaq EvaGreen 5x para HRM 2 ml (500 rxn)* i 2 µl d'ADN a 50 ng/ µl.

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.

Els resultats de l'amplificació van ser evaluats emprant el software *LightCycler 480 Software 1.5* mitjançant dos tipus d'anàlisi: "T_m calling" i "Gene scanning".

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Es van realitzar dos assajos diferents per tal d'aconseguir marcadors que permeten estudiar i reconèixer els polimorfismes presents a *Solanum melongena* i espècies silvestres relacionades per a l'estudi de l'Herència materna. En primer lloc, es va abordar un estudi mitjançant enzims de restricció per a obtenir marcadors de tipus CAPS i en segon lloc mitjançant el disseny d'encebadors específics per a detectar polimorfismes amb la tècnica de High Resolution Melting (HRM).

4.1 Extracció i dilució de l'ADN

Una vegada extret l'ADN de les espècies i encreuaments de les taules 1 i 2 es va analitzar la seva qualitat i integritat. Es va obtenir una banda clara en el gel d'agarosa per a totes les espècies i encreuaments, com es pot observar en l'exemple de gel d'extracció de la Figura 5. Per estudiar la qualitat es van utilitzar les relacions d'absorbància 260/280 i 260/230 de l'espectrofotometre, en les quals un valor aproximat de 2 significa un ADN d'alta qualitat, on es van obtenir uns valors propers a 1'8 per a les nostres mostres el que indica que l'ADN extret era de qualitat.

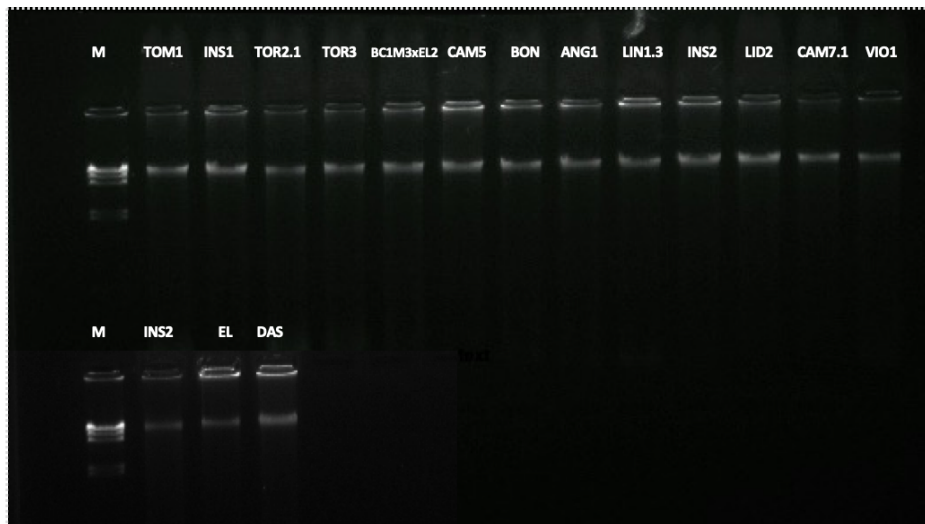


Figura 5. Visualització en gel d'agarosa 1% de l'ADN extret. S'ha utilitzat per a la visualització el marcador molecular d'àcids nucleics Lambda/HindIII. ADN de les espècies silvestres relacionades a estudiar

4.2 Amplificació de l'ADN

Els encebadors utilitzats per a l'amplificació de l'ADN es van basar en la informació present a l'article "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA" (Pierre Taberlet et al., 1991). Aquests encebadors van ser dissenyats per a coincidir amb seqüències altament conservades dels gens del tRNA presents al DNA del cloroplast, evitant seqüències palindròmiques. En concret, amplifiquen tres regions no-codificants: (i) un espaiador intergènic entre trnT (UGU) i l'exó 5' trnL (UAA), (ii) l'intró trnL (UAA) i (iii) altre espaiador intergènic entre l'exó 3' trnL (UAA) i trnF (GAA).

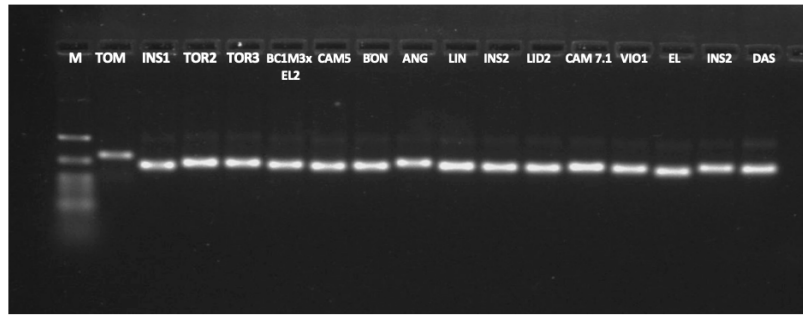
El fet de que estiguin dissenyats a partir d'aquestes seqüències significa que ofereixen oportunitats per estudiar la població i la biologia evolutiva de diverses espècies de plantes, degut a la baixa taxa de divergència de les seqüències dels gens d'ARNt. A més a més, s'ha comprovat que els encebadors dissenyats a l'experiment funcionen per a la majoria de les espècies provades incloent algues, briòfits, pteridòfits, gimnospermes i angiospermes (Pierre Taberlet et al., 1991), el que els fa útils per al nostre estudi de les diferents espècies de *Solanum* ja que són plantes angiospermes dicotiledònies.

Es va realitzar, en primer lloc, l'amplificació d'11 de les 14 espècies silvestres que apareixen a la Taula 1: *S. anguivi*, *S. bonariense*, *S. campylacanthum*, *S. dasyphyllum*, *S. elaeagnifolium*, *S. insanum*, *S. lidii*, *S. linnaeanum*, *S. tomentosum*, *S. torvum*, *S. violaceum*. Per a tres d'aquestes espècies es van utilitzar diferents accessions: *S. campylacanthum* 5, *S. campylacanthum* 7.1, *S. insanum* 1, *S. insanum* 2, *S. torvum* 2.1 i *S. torvum* 3. També es va incloure en l'amplificació el retroencreuament BC1M3xL2.

En segon lloc, es va realitzar l'amplificació dels encreuaments especificats en la Taula 2 per al posterior estudi d'aquestes seqüències mitjançant marcadors moleculars.

Per últim, es va realitzar l'amplificació de les espècies *S. melongena* i *S. incanum*, per a utilitzar-les en els anàlisis posteriors com a controls.

A



B

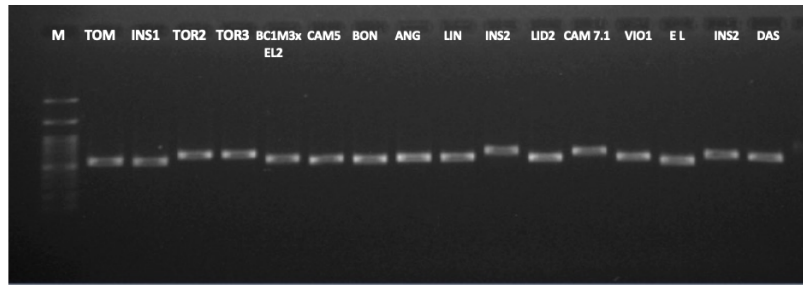


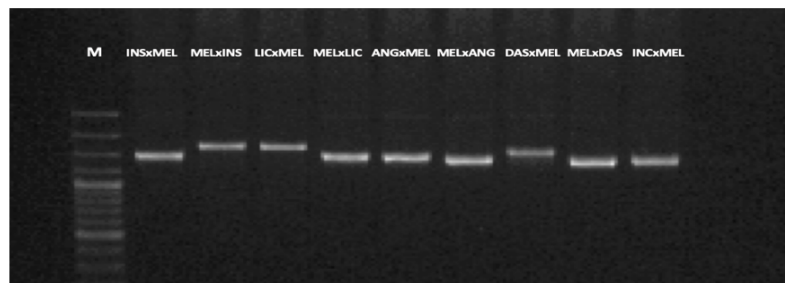
Figura 6. Visualització en gel d'agarosa 1% dels resultats de l'amplificació mitjançant Sanger d'espècies silvestres relacionades, *S. melongena* i encreuament BC1M3xEL2.

Es va utilitzar el marcador molecular "DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder" (Nippon Genetics). Les espècies són per ordre en el gel *S. tomentosum*, *S. insanum*, *S. torvum*, *S. campylacanthum*, *S. bonariense*, *S. anguivi*, *S. linnaeanum*, *S. insanum*, *S. lidii*, *S. campylacanthum*, *S. violaceum*, *S. elaeagnifolium*, *S. dasyphyllum*.

Imatge A: amplificació amb els encebadors trnT_a i trnL_d de l'ADN de les espècies silvestres.

Imatge B: amplificació amb els encebadors trnT_e i trnL_f de l'ADN de les espècies silvestres.

A



B

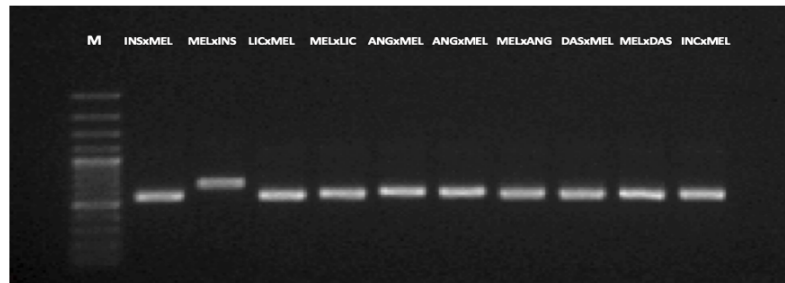


Figura 7. Visualització en gel d'agarosa 1% dels resultats de l'amplificació dels encreuaments entre plantes silvestres relacionades i *S. melongena* (Taula 2). Es va utilitzar el marcador molecular "DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder" (Nippon Genetics).

Imatge A: amplificació de l'ADN de les poblacions F1 amb els encebadors trnT_a i trnL_d.

Imatge B: amplificació de l'ADN dels les poblacions F1 amb els encebadors trnT_e i trnL_f.

Es va obtenir banda de l'amplificació de totes les espècies silvestres (Fig. 6) i de tots els encreuaments (Fig. 7), el que ens indica que es va realitzar correctament l'amplificació. El tamany de banda esperat per al parell d'encebadors trnT_a i trnL_d era d'aproximadament de 1200 pb el que concorda amb els resultats que es van obtenir ja que, com s'observa a les Figures 6A i 7A, totes les bandes obteses es troben aproximadament per sota de la banda del marcadors molecular de 1500 pb. En el cas dels encebadors trnT_e i trnL_f, el tamany de banda esperat era d'aproximadament 600 pb que concorda amb els resultats obtesos ja que, com s'observa a les Figures 6B i 7B, totes les bandes es troben aproximadament per dalt de la banda del marcadors molecular de 600 pb.

4.3 Seqüenciació i tractament informàtic de les seqüències

Una vegada es va comprovar la correcta amplificació de les espècies silvestres, es va purificar el producte de PCR de les espècies silvestres i del retroencreuament BC1M3xL2 per els dos parells d'encebadors: trnT_a, trnL_d i trnT_e, trnL_f (Taula 3). Es va realitzar la seva comprovació en gel d'agarosa, on es va obtenir banda per a totes les mostres, i es va enviar el producte de PCR purificat per a la seva seqüenciació.

De la seqüenciació es van obtenir en total 60 lectures, 30 lectures per a cada regió amplificada per cadascun dels parells d'encebadors, en sentit directe i invers. Aquesta informació es va visualitzar i analitzar mitjançant el programa Chromas ([//technelysium.com.au/wp/chromas/](http://technelysium.com.au/wp/chromas/)), a partir del qual es va obtenir la seqüència de nucleòtids inversa i directa per a cada parell d'encebadors de cada espècie (Fig. 8). Els programes d'interpretació de cromatogrames construeixen les seqüències de nucleòtids automàticament però convé revisar-les manualment perquè en ocasions es poden produir errors a l'hora d'assignar una base, sobretot als extrems de les seqüències, on la qualitat de la seqüenciació és menor, o es presenten com a soroll de fons degut a problemes durant la seqüenciació; com la contaminació amb un altre ADN o de l'altre encebador, normalment l'invers. Per això es van comprovar una a una les bases assignades pel programa mirant la qualitat del cromatograma en cada zona.

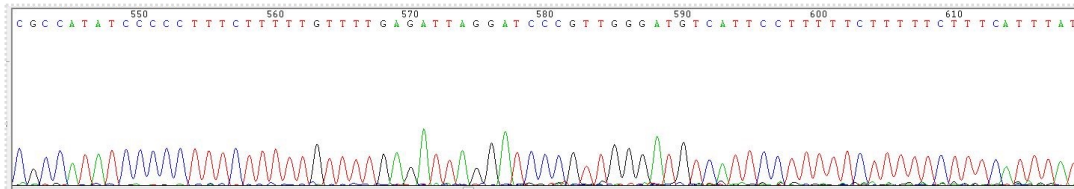


Figura 8. Cromatograma de la lectura obtesa en sentit directe per a la regió amplificada pels encebadors trnT_a i trnL_d mitjançant Seqüenciació Sanger per a l'espècie *S. campylacanthum* 7.1.

De l'anàlisi dels cromatogrames no va ser possible obtenir les seqüències directa i inversa per als encebadors trnT_a i trnL_d en les espècies *S. tomentosum* i *S. violaceum* degut a errors de seqüenciació. Del programa Chromas ([//technelysium.com.au/wp/chromas/](http://technelysium.com.au/wp/chromas/)) es van obtenir seqüències més curtes d'allò esperat segons el tamany de l'amplicó possiblement degut a la baixa qualitat dels seus cromatogrames. Tampoc va ser possible l'obtenció de les seqüències directa i inversa per als encebadors e i f de l'espècie *S. linnaeanum*. Com d'aquestes espècies si que es va poder disposar de les seqüències corresponents a l'altre parell d'encebadors, no es va considerar necessari tornar a seqüenciar i es van estudiar els marcadors només amb aquesta informació.

Una vegada obteses les seqüències directa i inversa, es van introduir en el programa Merger (EMBOSS) per a obtenir la seqüència consens de cada espècie. La seqüència consens obtesa a partir d'aquest programa va ser comprovada visualment amb els cromatogrames. Les seqüències consens obteses de la seqüenciació són adjuntes a l'annex I.

Per últim, mitjançant les seqüències consens es van buscar els canvis nucleotídics, amb especial interès pels d'un sol nucleòtid (SNPs), presents a les regions d'interès del genoma del cloroplast de cadascuna de les espècies silvestres respecte al de l'espècie *S. melongena* mitjançant el seu alineament amb la ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990) (Fig. 9). D'aquest alineament també es van obtenir les seqüències equivalents en el genoma complet del cloroplast de *S. melongena* a les regions amplificades per a, d i e, f per a posteriorment utilitzar-les per a la búsqueda de marcadors de tipus CAPs. S'han adjuntat els resultats a l'annex II.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
972 bits(526)	0.0	537/542(99%)	1/542(0%)	Plus/Plus
Query 2	GGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAGACTATTTAACTCCCAACTATTTATCCGACCCC	61		
Sbjct 48979	49038		
Query 62	CTTTCCTTAACGGTTCCAAATTCCTTATCTTTCTCATTCACTCTATCTTTAGAAATGG	121		
Sbjct 49039C.....	49098		
Query 122	AttttttttCTAAGAGTAAATGGTTTCTCTTATCACAAGCCTTTTGATATCTATGATAC	181		
Sbjct 49099	49158		
Query 182	ACATAGAAATGAACATCTTTGAGCAAGGAATCCCTAGTTGAATGATCCCGATCAATACA	241		
Sbjct 49159	..G.....	49218		
Query 242	ATATCATTACTCATACTGAAACTTACAAAATCATCTTTTGAAGATCGAAGAAATCCCC	301		
Sbjct 49219	49278		
Query 302	GGCTTTGAGAAAATTTGTTAATCGACTTATTTGACATAGACCAGTCTATGATAGAATC	361		
Sbjct 49279C.....	49338		
Query 362	AAATAAAATAAGGATACCACCCAAAGGACTCGAAATCCTCATGTTAACGGTTCCAATTC	421		
Sbjct 49339	49398		
Query 422	CAATCCAGATTGGTAGGATAGAGGACTGGAAATCCTCGTTCCAATCTAATCTGGGTTGGA	481		
Sbjct 49399	49458		
Query 482	AATCGCCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGTACAG-TTC	540		
Sbjct 49459C.G...	49518		
Query 541	AA 542			
Sbjct 49519	.. 49520			

Figura 9. BLASTn de la seqüència consens de l'espècie *S. campylacanthum* 7.1 de la regió amplificada pels encebadors trnT_e i trnL_f contra el genoma complet del cloroplast de *S. melongena* per a trobar els canvis nucleotídics.

4.4 Disseny de marcadors CAPS mitjançant SolGenomics

Per a l'estudi dels canvis nucleotídics presents en primer lloc es van dissenyar marcadors de tipus Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS). Els marcadors de tipus CAPs es basen en la identificació de canvis en la seqüència mitjançant la restricció enzimàtica dels fragments d'interès amplificats i la seva visualització en gel d'agarosa. Les variacions són detectades per la presència o absència de llocs de restricció dels enzims, el que dona lloc a diferents patrons de bandes per a la seva visualització en gels. De fet, els marcadors CAPS combinen tècniques de PCR àmpliament utilitzades amb mètodes clàssics de polimorfisme de longitud del fragment de restricció (RFLP), només que es basa en l'amplificació de petits fragments d'ADN en lloc de tot el genoma (Shakrakov, 2016).

Per a buscar marcadors CAPS més econòmics i efectius es va demanar al programa SolGenomics que busqués enzims amb un preu inferior a 65\$/1000u, que no mostrara enzims que tallen més de 4 vegades en ambdós parentals; ja que si hi ha massa llocs de restricció per al mateix enzim el fragment es tallarà en diversos fragments xicotets que produeix un patró complex de bandes difícil de visualitzar en gels d'agarosa, i per últim l'exclusió de 20 pb a ambdós extrems de les seqüències; ja que si el lloc de tall de l'enzim de restricció està a prop de l'extrem de la seqüència, la digestió produirà un fragment molt curt i un fragment llarg gairebé de la mateixa mida que el fragment no digerit i resultarà difícil diferenciar-los en gel d'agarosa a menys que hi hagi una diferència de > 20 pb.

La informació que es va obtenir per a cada espècie va ser els enzims candidats amb el seu preu per unitats, la seqüència que reconeixen, el lloc de tall i el nombre de fragments que produeix a partir de la digestió del producte de PCR. Es van elegir els enzims candidats pel preu, per facilitat de visualització i diferenciació de les bandes al gel d'electroforesi entre les dues espècies i per la disponibilitat prèvia al laboratori.

De la búsqueda de CAPS van reconèixer dos enzims que eren capaços de diferenciar quasi totes les espècies silvestres estudiades de *S. melongena* amb un patró de bandes fàcilment diferenciable en gel d'agarosa i van aparèixer com a CAPS candidats en totes les espècies a estudiar: BamHI, a l'hora de realitzar la digestió dels productes de PCR dels encebadors trnT_a i trnL_d, i AflIII, en el cas de la digestió del producte de PCR dels encebadors trnT_e i trnL_f. A la Taula 5 es mostren les característiques.

Taula 5. Marcadors CAPS candidats obtesos de l'anàlisi amb SolGenomics i les seves característiques

Enzim	Preu per unitats	Seqüència que reconeix
BamHI	10000 u/53\$	GGATCC
AflIII	<65\$/1000u	AC [A G] [C T] GT

Per altra banda, no va ser possible l'obtenció de marcadors CAPS per a l'espècie *S. linnaeanum* i per a l'espècie *S. campylacanthum* només es va obtenir un marcador, AflIII, per a la regió d'amplificació dels encebadors trnT_e i trnL_f però cap per a la regió de trnT_a i trnL_d.

L'espècie *S. insanum* no es va poder estudiar amb aquests marcadors però sí que es van obtenir altres enzims candidats de l'anàlisi de la seva seqüència per a les dues regions d'amplificació: en el cas de la zona d'amplificació dels encebadors trnT_a i trnL_d es van obtenir els enzims AluI, BCII i DraI i per a la zona d'amplificació dels encebadors trnT_e i trnL_f es va obtenir l'enzim EcoRI però no van ser comprovats en aquest treball.

4.5 Digestió enzimàtica

Es va realitzar la digestió en dos passos: una hora d'incubació a 37°C i mitja hora a la temperatura d'inactivació de 80 °C, ambdós enzims coincideixen en les seves temperatures específiques de la digestió.

Per tal de comprovar que la digestió es va desenvolupar de forma correcta es van utilitzar dos controls. En primer lloc el control C1 per a comprovar contaminació per enzim, on es va introduir el mix de reacció sense enzim, afegint aigua pura en el seu lloc, i ADN de *S. melongena*, ja que és una espècie que l'enzim digereix. En segon lloc el control C2, on es va introduir el mix de reacció complet però no ADN, per a així comprovar si hi havia contaminació per ADN.

La comprovació en aquest cas es va realitzar en un gel d'Agarosa al 2%, i no del 1%, ja que els fragments que es volen separar són menuts i amb poca diferència de tamany entre ells (en alguns casos de menys de 200 pb) pel que és necessari un tamany de porus menor per a poder visualitzar els resultats de forma clara.

Es va comprovar, en primer lloc, l'eficàcia dels enzims de diferenciar les espècies silvestres de *S. melongena* (Fig. 10 i 11). Per a això es va realitzar la digestió de *S. anguivi*, *S. bonariense*, *S. dasyphyllum*, *S. elaeagnifolium*, *S. campylacanthum*, *S. lidii*, *S. torvum*, *S. melongena*, *S. incanum* i el retroencreuament BC1M3xEL2.

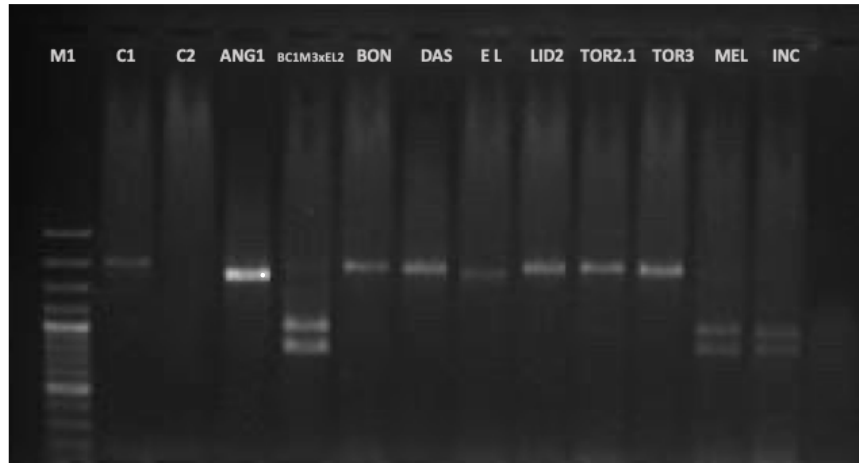


Figura 10. Visualització en gel d'Agarosa 2% de la digestió amb BamHI de *S. melongena* i espècies silvestres relacionades. Les espècies estudiades en ordre d'aparició al gel són: *S. anguivi*, el retroencreuament BC1M3xEL2, *S. bonariense*, *S. campylacanthum*, *S. dasyphyllum*, *S. elaeagnifolium*, *S. lidii*, *S. torvum*, *S. melongena* i *S. incanum*. Es va utilitzar el marcador molecular "DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder" (Nippon Genetics).

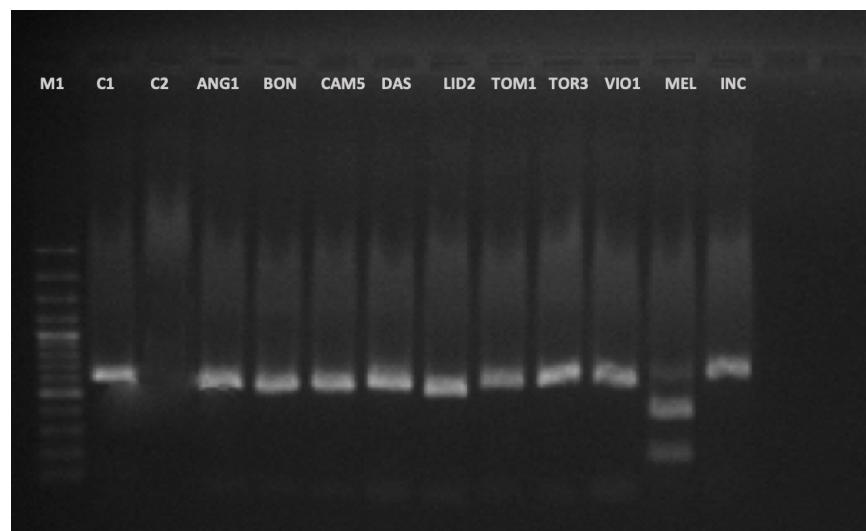


Figura 11. Visualització en gel d'agarosa 2% de la digestió amb AflIII de *S. melongena* i espècies silvestres relacionades. Les espècies estudiades en ordre d'aparició al gel són: *S. anguivi*, *S. bonariense*, *S. campylacanthum*, *S. dasyphyllum*, *S. lidii*, *S. tomentosum*, *S. torvum*, *S. violaceum*, *S. melongena* i *S. incanum*. Es va utilitzar el marcador molecular "DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder" (Nippon Genetics).

Per a BamHI, digestió dels productes de PCR amb els encebadors trnT_a i trnL_d, s'esperava que *S. melongena* es digerira i les espècies silvestres no, ja que la primera conté la seqüència de reconeixement de l'enzim mentre que les espècies silvestres contenen un canvi del primer nucleòtid de la seqüència de G per A (Taula 5, GGATCC → AGATCC). Els resultats coincideixen i es poden

observar a la figura 10. A més a més, també es va observar la digestió de *S. incanum*, pel que aquest enzim no ens permet diferenciar aquesta espècie. Per últim, el retroencreuament que es va introduir va donar un patró de dues bandes resultat de la digestió, com era d'esperar ja que la seva mare és d'espècie *S. melongena* i per tant, conté la seqüència de reconeixement de l'enzim (Fig. 10).

Per a AflIII, digestió dels productes de PCR amb els encebadors trnT_e i trnL_f, s'esperava que *S. melongena* es digerira i la resta d'espècies silvestres no, ja que la primera conté la seqüència de reconeixement de l'enzim, ACACGT, mentre que les espècies silvestres contenen un canvi nucleotídic del 5é nucleòtid de G per A (Taula 5, ACACGT → ACACAT). A diferència de BamHI veiem que aquest enzim ens permet diferenciar les espècies *S. incanum* i *S. melongena* (Fig. 11).

Una vegada estudiada la utilitat dels marcadors a l'hora de diferenciar les espècies silvestres es va comprovar la seva utilitat a l'hora de descobrir de quina espècie prové el material genètic del cloroplast en plantes de generació F1 derivades de l'encreuament de l'espècie *S. melongena* amb 5 espècies relacionades: *S. incanum*, *S. lichtenstenii*, *S. insanum*, *S. anguivi* i *S. dasyphyllum* (Fig. 12).

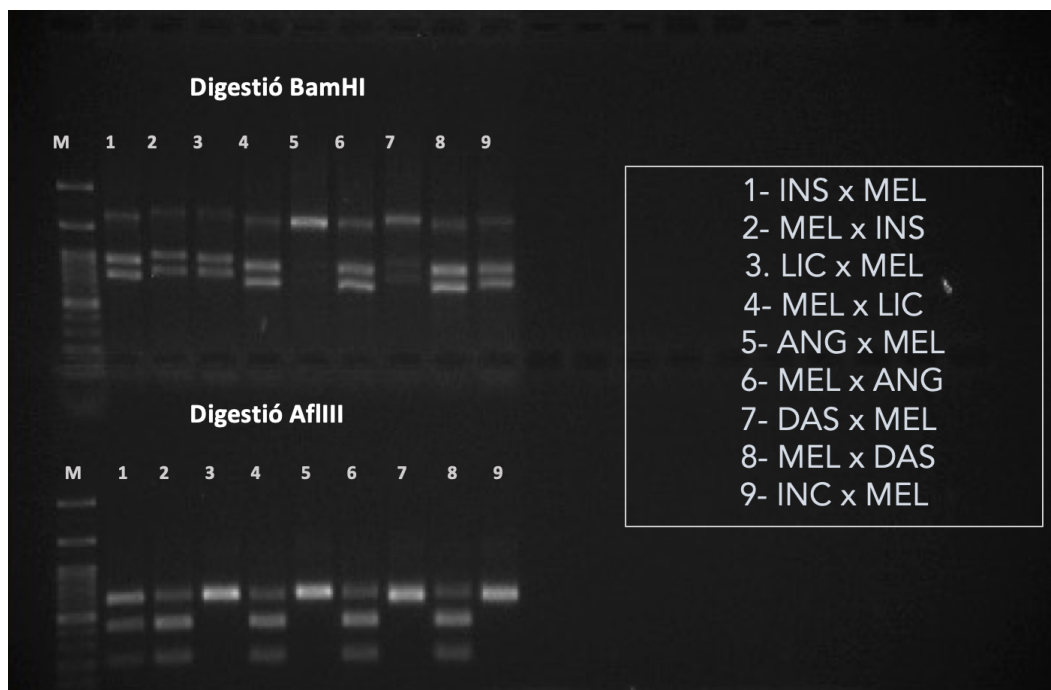


Figura 12. Visualització en gel d'agarosa 2% de la digestió amb els enzims BamHI i AflIII de la F1 resultat dels encreuaments en ambdós sentits de l'espècie *S. melongena* amb espècies silvestres relacionades. Es va utilitzar el marcador molecular "DNA Molecular weight, 100 bp DNA ladder" (Nippon Genetics).

En aquells encreuaments on la planta mare és de l'espècie *S. melongena* s'esperava un patró de bandes similar a l'obté per a aquesta espècie (Fig. 10 i 11). Per això s'esperava que els encreuaments 1, 2, 4, 6 i 8 foren digerits donant un patró de dues bandes i els encreuaments 3, 5, 7 i 9 no. Per als encreuaments amb l'ancestre putatiu, *S. insanum*, s'esperava la seva digestió independentment de si la mare era *S. melongena* o *S. insanum*, ja que del seu estudi no es van observar canvis nucleotídics entre les dues espècies per a la seqüència de reconeixement de l'enzim, en els dos casos.

Amb l'enzim BamHI només van obtenir els resultats esperats en el cas dels encreuaments amb les espècies silvestres *S. anguivi* i *S. dasyphyllum* com a mare (encreuaments 5 i 7). En canvi, amb AflIII es va complir allò esperat per a quasi totes les espècies silvestres, a excepció de *S. insanum*,

(encreuaments 3, 5,7, 9) (Fig. 12). Una altra cosa que es dedueix dels resultats és que no es va produir la digestió completa de l'ADN dels encreuaments ja que apareixen 3 bandes, quan haurien de ser 2, el que es pot solucionar allargant el temps programat de digestió dels enzims.

En l'estudi dels marcadors CAPS es van utilitzar espècies silvestres que no formaven part de les seqüenciades anteriorment, pel que es va fer una comprovació in silico per a confirmar que els resultats obtesos concorden amb les característiques de la seva seqüència nucleotídica en les regions estudiades (Fig. 13).

En primer lloc es va estudiar l'espècie silvestre *S. incanum*. Es va obtenir mitjançant BLASTn (Altschul et al., 1990) contra el genoma complet del cloroplast d'aquesta espècie, present a la base de dades de l'NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), la regió equivalent a l'amplificada amb els encebadors trnT_a, trnL_d i trnT_e, trnL_f. Mitjançant aquest anàlisi es va veure que: en el cas de la regió del genoma amplificada per trnT_a i trnL_d, *S. incanum* conté la seqüència consens intacta de l'enzim BamHI (GGATC) mentre que en el cas dels encebadors trnT_e i trnL_f *S. incanum* conté el canvi de nucleòtid de G a A que fa que AflIII no pugui reconèixer la seva seqüència de tall (Fig. 11).



Figura 13. Comprovació in silico dels resultats de la digestió amb BamHI i AflIII en l'espècie *S. incanum*. Imatge A: BLASTn de la regió amplificada pels encebadors trnT_a i trnL_d del genoma del cloroplast de *S. incanum* contra el genoma complet del cloroplast de *S. melongena*. Imatge B: BLASTn de la regió amplificada pels encebadors trnT_e i trnL_f del genoma del cloroplast de *S. incanum* contra el genoma complet del cloroplast de *S. melongena*.

Els resultats de la comprovació in silico de les dues espècies van concordar amb allò obtes a les digestions i expliquen el perquè no és possible diferenciar-les de *S. melongena* amb el marcador BamHI.

Amb l'espècie silvestre utilitzada als encreuaments 3 i 4: *S. lichtensteinii*, es va fer la mateixa comprovació i es va observar que la seqüència de reconeixement de BamHI es troba al seu genoma sense cap canvi, idèntica a la de *S. melongena*, i per tant no és possible diferenciar-la amb aquest marcador. En canvi, conté el canvi nucleotídica en la seqüència de reconeixement d'AflIII pel que si és possible diferenciar-la amb aquest marcador.

De les digestions es va arribar a la conclusió que l'enzim AflIII és més eficaç a l'hora de diferenciar *S. melongena* de les espècies silvestres estudiades, amb un patró de bandes visualment fàcilment

diferenciable, inclòs per a determinar de quina espècie prové el material genètic del cloroplast en poblacions F1.

4.6 Disseny d'encebadors i anàlisi dels SNPs mitjançant HRM.

Del disseny de marcadors CAPs hi va haver dues espècies que no van donar resultats: *S. linnaeanum* i *S. campylacanthum*. A partir dels canvis nucleotídics de la regió amplificada pels encebadors trnT_a i trnL_d d'aquestes espècies, obtesos per alineament amb *Solanum melongena*, es van dissenyar encebadors per a la tècnica d'HRM, mètode post-PCR per a la detecció de variants genètiques en l'ADN bicatenari basat en la desnaturalització tèrmica (fusió) (Simko, 2016).

Per al disseny d'encebadors es va elegir un SNP no proper als extrems de la seqüència ja que poden ser derivats d'errors de seqüenciació, degut a la menor qualitat de la seqüenciació en els extrems. L'SNP elegit es tracta d'un polimorfisme C/T, on C és l'al·lel silvestre i T el present a *S. melongena*. La seva posició en el genoma complet del cloroplast de les espècies *S. linnaeanum* i *S. campylacanthum* és 48610 pb i 48608 pb, respectivament.

Es van dissenyar en total dos parells d'encebadors per a aquest SNP, a partir de la seqüència de cadascuna de les dues espècies, que coincideixen en la seqüència del seu encebador directe i que amplificaven una seqüència de 90 pb. Les característiques dels encebadors es mostren a la Taula 6. A la Figura 14 es troba representada la seva posició i direcció.

Taula 6. Encebadors dissenyats per a la tècnica de l'HRM.

	Directe	nt	Invers	nt
LIN1.3(ad)_48610	TGCAGAGACTCAATGGAAGC	20	TGCACTTCATTCTTTTCTTTCTG	24
CAM7.1(ad)_48608	TGCAGAGACTCAATGGAAGC	20	CATTCTTTTCTTTCTGAAGTTTCG	25

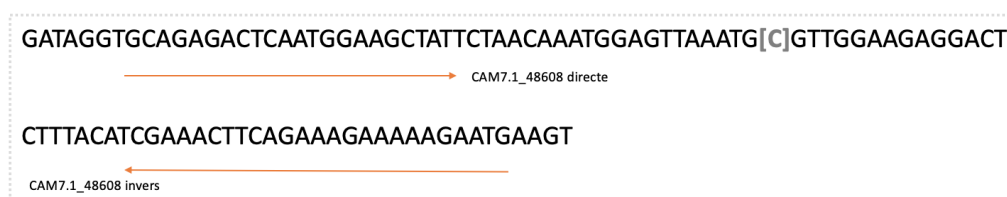


Figura 14. SNP candidat elegit per al disseny d'encebadors per a la tècnica d'HRM a partir de les espècies *S. linnaeanum* i *S. campylacanthum*. A la figura es mostra la posició de l'SNP al genoma del cloroplast per a l'espècie *S. campylacanthum*, que es troba representat entre claudàtors. Els encebadors directe i invers obtesos per a l'estudi de l'SNP es troben representats a la figura mitjançant fletxes on la punta de la fletxa indica l'extrem 3' de cada encebador.

Es va comprovar l'eficàcia dels dos encebadors dissenyats mitjançant un anàlisi d'HRM amb les espècies *S. linnaeanum*, *S. campylacanthum*, *S. insanum* i *S. melongena*. De l'anàlisi amb HRM s'obté una gràfica de nivell de fluorescència i temperatura, obtenint així corbes de fusió, en la qual es pot detectar canvis d'un sol nucleòtid ja que les diferents seqüències genètiques presenten variacions menudes de la seva temperatura de desnaturalització. Es va determinar la capacitat dels marcadors de diferenciar les tres espècies silvestres de *S. melongena* mitjançant aquest SNP i es va observar que el

parell d'encebadors de *S. linneanum* donava resultats ambigus, que no permeteren diferenciar clarament els diferents genotips, pel que es va elegir el parell d'encebadors de *S. campylacanthum* per als següents experiments.

Una vegada observada la qualitat dels dos parells d'encebadors i la seva aplicació a l'hora de diferenciar les espècies silvestres de *S. melongena*, es va buscar la presència del polimorfisme C/T a totes les espècies silvestres estudiades per tal de comprovar que es podria fer servir per a totes les espècies. Es va utilitzar la seqüència consens per als encebadors trnT_a i trnL_d de *S. campylacanthum*, en la que està inclosa l'SNP, per a buscar coincidències mitjançant l'alineament amb la resta d'espècies, recopilades a la Taula 1. Per a aquelles espècies de les quals no es disposava de seqüències pròpies derivades de la seqüenciació mitjançant Sanger: *S. incanum*, *S. melongena*, *S. lichensteinii*, *S. tomentosum* i *S. violaceum*, es van utilitzar les seqüències presents a la base de dades de l'NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) amb els localitzadors: NC_039605.1, MF818319.1, NC_039598.1, DQ392961.1 i NC_039604.1, respectivament.

Per a realitzar l'alineament múltiple es va utilitzar la ferramenta MUSCLE (EMBL-EBI, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). A la Figura 15 es mostren els resultats de l'alineament d'aquesta regió de totes les espècies, on es troba el polimorfisme C/T marcat.



Figura 15. Alineament múltiple de les espècies silvestres relacionades estudiades i *S. melongena* per a observar els dos al·lels del polimorfisme C/T i el genotip de cadascuna de les espècies.

Una vegada estudiades les espècies silvestres es va realitzar l'experiment d'HRM amb l'ADN de poblacions F1, encreuaments especificats a la Taula 2. Les poblacions F1 estudiades consisteixen en l'encreuament en ambdòs sentits de les espècies *S. anguivi*, *S. insanum*, *S. lichensteinii*, *S. dasyphyllum* amb *S. melongena* i l'encreuament *S. incanum* x *S. melongena*. En aquests encreuaments es van utilitzar com a parentals diferents accessions de l'espècie *S. melongena*: *S. melongena 1*, *S. melongena 3*, *S. melongena 5*. Com a control es va utilitzar l'ADN de l'espècie *S. melongena*, com a corba referència, de mode que aquells encreuaments amb una corba de fusió similar corresponen als de l'al·lel T.

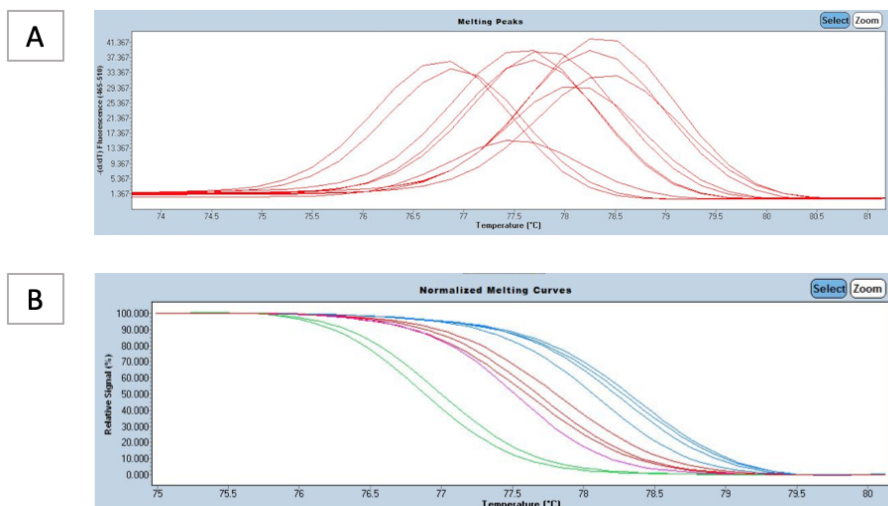


Figura 16. HRM de poblacions F1 derivades d'encreuaments entre *S. melongena* i espècies silvestres relacionades amb els encebadors CAM7.1(ad)_48608. La imatge A correspon a l'anàlisi "Tm calling" i la imatge B a l'anàlisi "Gene Scanning".

En primer lloc es va realitzar l'anàlisi "Tm calling" que serveix per a comprovar que l'amplificació s'ha desenvolupat correctament, sense amplificacions inespecífiques, de mode que només s'ha d'obtenir un pic per cada espècie analitzada. A la Figura 16A s'observa que l'amplificació es va realitzar correctament.

Es van observar tres agrupacions clares de pics: la primera formada pels encreuaments amb mare *S. melongena* 1 (*S. melongena* 1.3 x *S. lichensteinii* i *S. melongena* 1.2 x *S. insanum* 2.1), la segona formada pels encreuaments amb mare *S. melongena* 3 i 5 i de l'espècie *S. insanum* (*S. insanum* 1 x *S. melongena* 3, *S. melongena* 3.3 x *S. dasyphyllum* 1.3 i *S. melongena* 5.2 x *S. anguivi* 2.2) i per últim els encreuaments amb mare d'espècie silvestre (*S. lichensteinii* 3.1 x *S. melongena* 1.3, *S. anguivi* 1.1 x *S. melongena* 5.3, *S. dasyphyllum* 1.1 x *S. melongena* 1.3, *S. insanum* 1 x *S. melongena* 1.5). El pic més baix és el genotip control utilitzat (*S. melongena*), (Fig. 16A).

En segon lloc es va realitzar l'anàlisi "Gene Scanning". De l'estudi previ del comportament del polimorfisme a les espècies silvestres (Fig. 15) s'esperava obtenir diferents corbes de fusió segons si la planta mare de l'encreuament era *S. melongena* o una de les espècies silvestres, de mode que ens permetera visualment assignar cadascun dels individus F1 en un dels dos al·lels del polimorfisme de forma clara. A la comparativa de totes les corbes de fusió (Fig. 16B), es van veure tres grups diferenciats, tal i com passava a l'anàlisi "Tm Calling": el primer format pels encreuaments amb mare *S. melongena* 1, MEL1.2 x INS2.1 i MEL1.3 x LIC2.2 (corbes verdes); el segon per la resta d'encreuaments amb mare *S. melongena*, MEL5.2 x ANG2.2, MEL3.3 x DAS i l'encreuament INS1 x MEL3 (corbes roges i corba control morada de *S. melongena*) i per últim, els encreuaments amb mare d'espècie silvestre; LIC3.1 x MEL1.3, ANG1.1 x MEL5.3, DAS1.1 x MEL1.3 i INC1 x MEL1.5 (corbes blaves).

També es va realitzar l'anàlisi dos a dos dels individus F1 on es van diferenciar clarament dues corbes, associables a dos al·lels diferents, dels encreuaments en ambdòs sentits a totes les espècies estudiades (Fig. 17 A,B,C,D,E). A l'anàlisi mitjançant l'alineament múltiple de l'SNP es va comprovar la presència de l'al·lel T del polimorfisme present a *S. melongena* a l'espècie *S. insanum* (Fig. 15), per tant, les corbes de fusió obteses dels encreuaments en ambdòs sentits d'aquesta espècie amb *S. melongena* haurien de ser similars. Tot i això, es van obtenir dues corbes diferents (Fig 17. A) possiblement degut a l'accessió de *S. Melongena* utilitzada com a parental: *S. melongena* 1.2, ja que a la Figura 16B es troba la corba de l'encreuament amb mare *S. insanum* agrupada amb la corba de

fusió de l'espècie *S.melongena*, utilitzada com a genotip control, i per tant això indicaria que contenen el mateix al·lel del polimorfisme.

Per últim, com es van observar diferents comportaments en les plantes amb mare de l'espècie *S. melongena* segons quin tipus d'accessió s'havia utilitzat com a parental, es va realitzar l'anàlisi "Difference Plot", gràfic normalitzat a partir de la senyal relativa diferenciada de les corbes de fusió obteses de les poblacions F1 amb mare *S. melongena* amb el marcador CAM7.1(ad)_48408 (Fig.18).

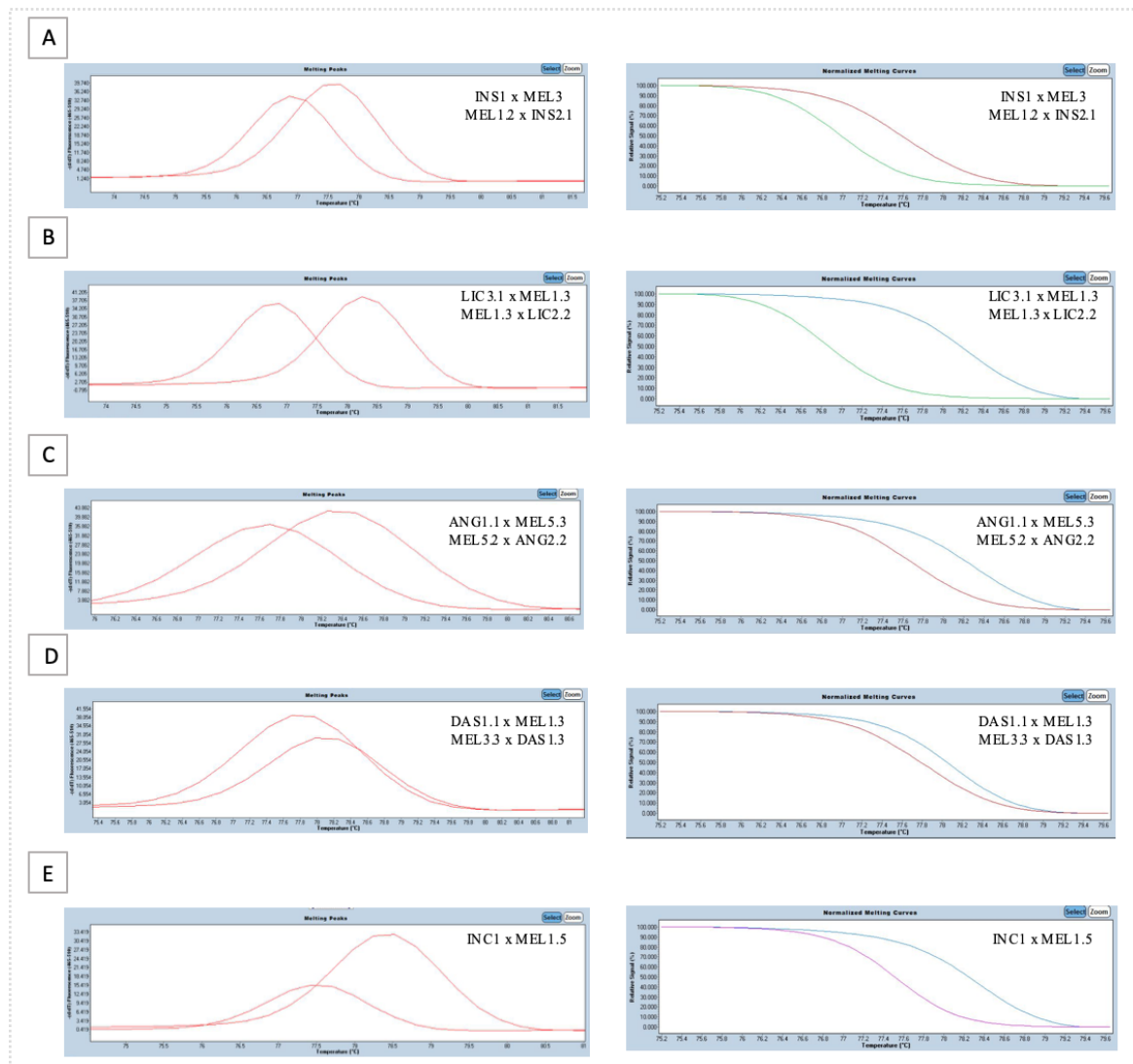


Figura 17. Comprovació dos a dos de les corbes d'HRM dels anàlisis "Tm calling" i "Gene Scanning" de poblacions F1 derivades d'encreuaments entre *S. melongena* i espècies silvestres relacionades. A la imatge A es troben representats els encreuaments entre les espècies *S. melongena* i *S. insanum*. A la imatge B es troben representats els encreuaments entre les espècies *S. melongena* i *S. lichtensteinii*. A la imatge C es troben representats els encreuaments entre les espècies *S. melongena* i *S. anguivi*. A la imatge D es troben representats els encreuaments entre les espècies *S. melongena* i *S. dasyphyllum*. Per últim, a la imatge E es troba representat l'encreuament *S. incanum* x *S. melongena* junt l'espècie control *S. melongena*.

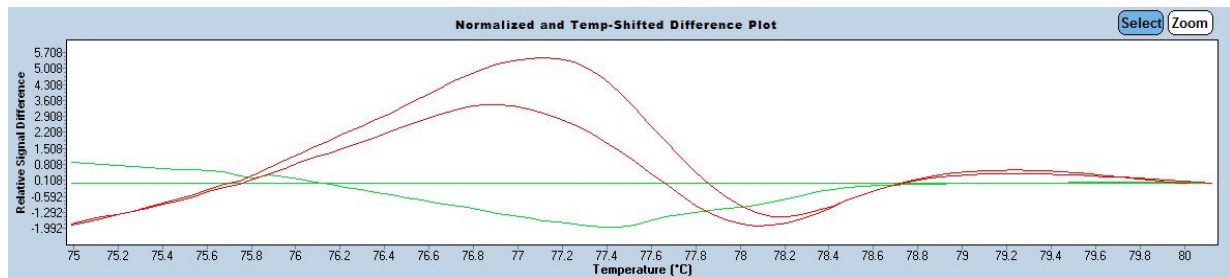


Figura 18. Perfils representatius de les corbes de fusió de la regió amplificada pels encebadors *trnT_a* i *trnL_d* per als encreuaments amb mare *S. melongena*. Encreuaments amb accessió *S. melongena 1* com a mare corresponen a les corbes verdes i encreuaments amb accessions *S.melongena 3 i 5* com a mare corresponen a les corbes roges.

Els diferents resultats obtesos per a les accessions de l'espècie *S. melongena* (Fig.18) poden deure's a canvis en la seqüència que envolta el polimorfisme i no a que continguin al·lels diferents d'aquest, que resultarien en diferents corbes de fusió. Per a estudiar-ho seria necessària la seva seqüenciació i fer un anàlisi de les seqüències en la zona del polimorfisme, per a buscar canvis, així com un nou anàlisi d'HRM amb els encebadors dissenyats per a aquest polimorfisme. Aquest anàlisi pot ser interessant ja que s'ha comprovat que les diferents accessions de *S. melongena* resulten en diferents característiques fenotípiques de les plantes obteses com a nivell de creixement, en el nombre de flors; on s'ha observat que les accessions *S. melongena 1, 3 i 5* floreixen més abundantment que, per exemple, *S. melongena 4 i 6*, en el grau d'èxit de la hibridació interespecífica; on l'accessió *S. melongena 1* ha resultat ser la de major èxit o en la quantitat i en el tamany dels fruits; on s'ha observat que funcionen millor unes o altres accessions segons l'espècie amb la qual es produeix l'hibridació (Plazas *et al.*, 2016).

Per últim es va realitzar HRM amb poblacions MAGIC, on es va realitzar una identificació i classificació a cegues de les plantes en els dos al·lels possibles de l'SNP per tal de comprovar que els marcadors desenvolupats permeten identificar de quina espècie prové el material genètic del cloroplast, inclòs en poblacions segregants.

Es va rebre ADN de 16 plantes corresponents a poblacions MAGIC: de les quals 8 presentaven citoplasma de l'espècie *S. melongena* i les altres 8 de l'espècie silvestre relacionada pertanyent al pool secundari *S. incanum*. Es desconeixia quines de les plantes formava part de cada grup, però, segons l'estudi del marcador amb les espècies silvestres, el resultat esperat de realitzar l'HRM amb el parell d'encebadors dissenyats era poder diferenciar-les clarament en dos grups de corbes de fusió degut a que cadascuna de les dues espècies contenen un dels dos al·lels del polimorfisme.

Es van analitzar de nou els resultats de l'HRM amb els anàlisis "Tm Calling" i "Melting Peaks". Com hem dit anteriorment, l'anàlisi "Tm calling" serveix per a comprovar que no hi ha hagut amplificació inespecífica. A la Figura 19 s'observa que es va produir l'amplificació correctament..

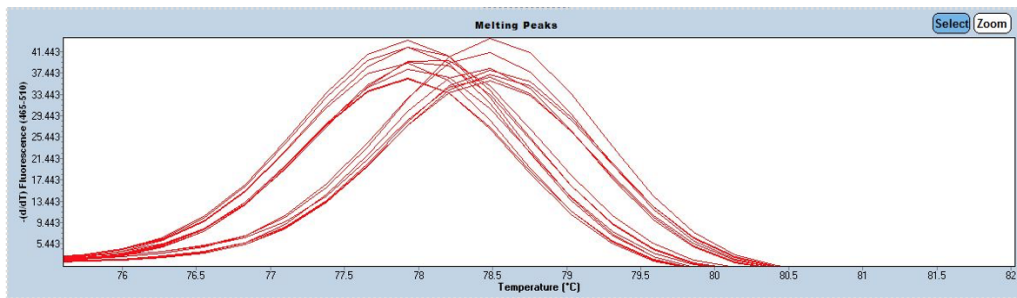


Figura 19. Anàlisi “Tm calling” de l’HRM de 16 poblacions segregants MAGIC amb citoplasma de l’espècie *S. melongena* o *S. incanum*.

L’anàlisi “Gene Scanning” va confirmar que el marcador era capaç de diferenciar en dos genotips diferents les 16 poblacions MAGIC: en les de citoplasma *S. melongena* (corbes blaves), corresponent a l’al·lel T del polimorfisme, i les de citoplasma *S. incanum* (corbes roges), corresponent a l’al·lel C del polimorfisme. Aquests resultats s’observen als gràfics de les seves corbes de fusió normalitzades i de “Difference Plot” (Fig. 20 A, B). Es va aconseguir classificar 15 de les 16 poblacions MAGIC en el seu grup correcte mitjançant aquest marcador. L’única població MAGIC que no es va aconseguir classificar correctament va ser la 53-99(1), possiblement degut a una mala qualitat de l’ADN o una mala classificació de la planta durant el procés d’obtenció de les línies (Fig. 18C, D). Tot i aquest error, els resultats obtesos confirmen la capacitat d’aquest marcador de poder diferenciar l’espècie de la qual prové el material genètic del citoplasma d’una planta inclòs en poblacions segregants, el que és d’interès perquè durant la creació d’aquestes línies es va observar que les plantes amb citoplasma de l’espècie *S. incanum* presentaven una menor viabilitat i funcionaven pitjor a l’hora d’utilitzar-les com a parentals als encreuaments.

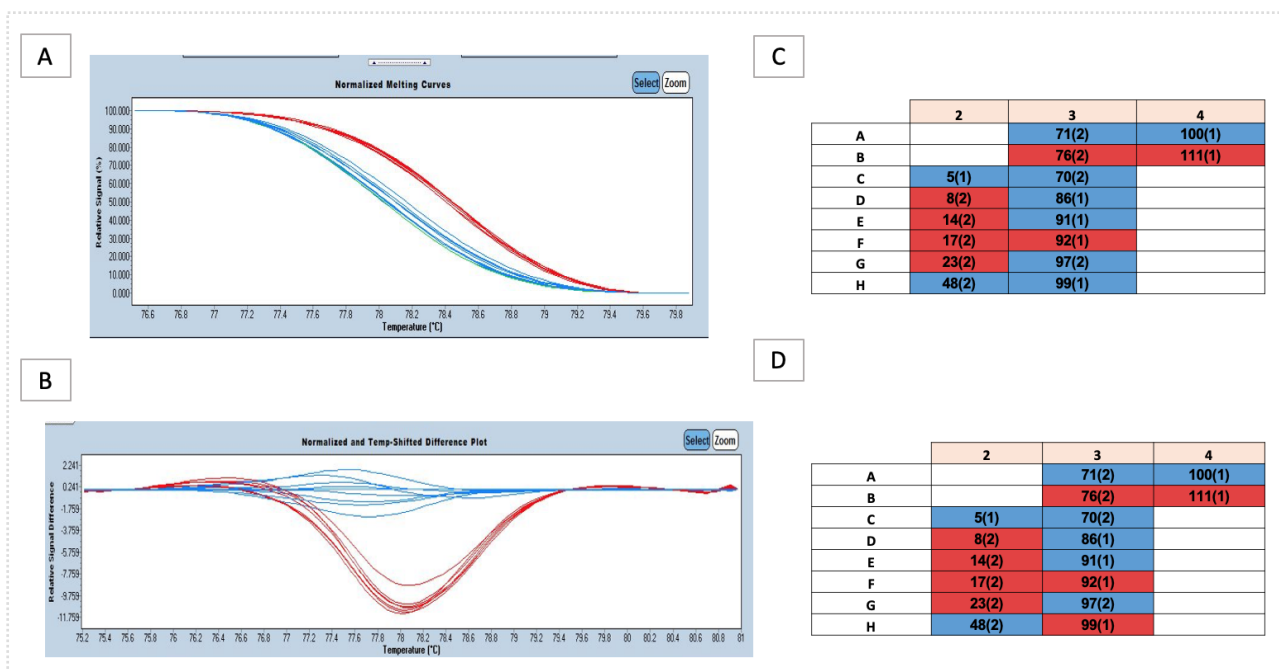


Figura 20. Corbes d’HRM normalitzades de l’anàlisi “Gene Scanning” de poblacions segregants tipus MAGIC. A la imatge A trobem totes les corbes de fusió normalitzades i a la imatge B al gràfic diferencial de les corbes de fusió. La imatge C correspon als resultats obtesos de la classificació en els dos genotips de les poblacions MAGIC obtesa de l’anàlisi d’HRM mentre que la imatge D és la classificació real dels individus de les poblacions segregants en els dos genotips (citoplasma de *S. melongena* o *S. incanum*).

El següent pas a seguir per a continuar aquest treball podria ser l'estudi a nivell de fenotip de les flors i viabilitat del polen de les poblacions F1 analitzades, per a demostrar que realment el fons genètic d'espècie silvestre provoca problemes d'esterilitat. Tot i que aquest fenomen ja es va observar amb les poblacions MAGIC utilitzades en aquest experiment i hi ha estudis anteriors enfocats en la relació de la presència del citoplasma d'espècies silvestres en una planta de millora i l'aparició d'esterilitat masculina, com ja hem anomenat a l'introducció d'aquest treball.

En definitiva, en aquest estudi de l'Herència Materna del cloroplast s'han utilitzat dos abordatges diferents per a l'obtenció de marcadors moleculars, ambdós basats en PCR, que han demostrat ser útils en la diferenciació de les espècies silvestres de *S. melongena*. L'amplificació per PCR és un anàlisi àmpliament disponible en els laboratoris de genètica molecular, pel que el primer pas d'ambdues tècniques pot ser realitzat sense cap dificultat (Shavrukov, 2016) però l'elecció d'una o altra tècnica s'ha de realitzar tenint en compte una sèrie de consideracions.

Un dels principals avantatges dels CAPS front a l'HRM és el material senzill i relativament barat necessari: s'utilitzen equips habituals als laboratoris i anàlisis rutinaris incloent la PCR, la digestió amb enzims i l'electroforesi (Shavrukov, 2016). En comparació, la majoria de tècniques moleculars modernes requereixen equips automàtics, molt cars. Les identificacions simples de CAPS produeixen un sol o molt pocs fragments després de la digestió, cosa que representa un avantatge molt positiu d'aquest mètode. Les interpretacions d'aquests marcadors són tan senzilles que es poden dur a terme fàcilment fins i tot per estudiants (Shavrukov, 2016).

Com a principal desavantatge dels marcadors CAPS front a l'HRM és l'anàlisi relativament llarg de tres passos (PCR, digestió i electroforesi) així com la possibilitat de l'augment de cost si es necessiten enzims rars (Shavrukov, 2016). En aquest experiment es va aconseguir optimitzar el preu de la tècnica gràcies a que es van trobar una varietat d'enzims econòmicament rentables per a totes les espècies. A més a més, aquest tipus de marcadors són menys adaptables a sistemes automàtics de gran rendiment però una aplicació semiautomàtica dels marcadors CAPS podria ser la PCR múltiple, que utilitza encebadors etiquetats amb diferents fluorescències seguida de una separació capilar (Shavrukov, 2016). Per altra banda, l'anàlisi del punt de fusió de l'HRM ofereix un mètode de visualització totalment integrat amb la PCR amb la combinació del seguiment continu de la fluorescència de la PCR amb l'anàlisi de la corba de fusió permetent l'amplificació, detecció i diferenciació simultània dels productes de PCR que es van obtenint (Ririe et al., 1997).

La tècnica d'HRM és recomanable per qüestions pràctiques com ara l'estalvi de temps (ja que s'evita el temps necessari de preparar, carregar, córrer i analitzar gels) i el fet que l'anàlisi de dades es pot realitzar de forma automàtica disminuint la possibilitat d'error humà en la transferència de dades. A més, l'anàlisi de MHR es fa al mateix tub que la PCR sense necessitat d'obrir-lo entre l'amplificació i l'anàlisi del producte, el que disminueix significativament el risc de contaminació. Finalment, l'HRM té l'avantatge que és no destructiu i, per tant, si l'HRM falla o és ambigu, es pot realitzar una comprovació mitjançant l'anàlisi en gel d'electroforesi o la seqüenciació dels productes de la reacció (Thomsen et al., 2012). En definitiva, l'HRM es converteix en una eina útil per a l'anàlisi ràpida, fiable, amb una elevada sensibilitat i econòmica dels marcadors codominants sobretot si disposem d'un gran nombre de mostres degut a la seva automatització.

Com a desavantatges principals de la tècnica d'HRM en trobem dos. En primer lloc, la necessitat de la seqüenciació dels amplicons per a determinar les variants de la seqüència, ja que no és possible identificar el nombre i la posició de les mutacions dins de l'amplicó només mitjançant aquest anàlisi (Simko, 2016) tot i que amb espècies àmpliament estudiades es poden utilitzar les seqüències disponibles a les bases de dades. Al contrari, el desenvolupament de marcadors CAPS és possible fins

i tot en absència de seqüències, sobretot en espècies amb alta probabilitat d'SNPs o inDels, però el procés en aquest cas es fa més llarg amb una probabilitat més reduïda d'èxit (Shavrukov, 2016).

En segon lloc, la necessitat d'optimitzar aquesta tècnica de cara a un anàlisi correcte. L'anàlisi depèn en gran mesura de que es desenvolupe una bona PCR, de la resolució dels instruments, que afecta a la precisió, i dels colorants que amb la seva concentració afecten a la posició i l'amplada absoluta de les corbes de fusió (Thomsen et al., 2012), (Wittwer, 2009). També la detecció de SNPs és problemàtica quan es produeix un polimorfisme massa proper a qualsevol dels llocs d'enllaç de primers pel que s'ha de dissenyar els encebadors tenint-ho en compte. Altre paràmetre a tenir en compte a l'hora d'optimitzar l'anàlisi és la longitud del producte de PCR. En el cas dels CAPS, una inserció o deleció més llarga en els amplicons donarà lloc a una detecció més precisa en el gel (Shavrukov, 2016), mentre que l'HRM perd sensibilitat amb la mida del producte (Simko, 2016), la resolució més alta sol veure's amb fragments de menys de 200 pb de longitud i s'ha descobert que es produeixen més errors quan la longitud augmenta sobre els 400 pbs (Wittwer, 2009). Tot i això, els amplicons de més de 500 pb poden proporcionar una resolució satisfactòria per als al·lels amb grans diferències en les temperatures de fusió (Simko, 2016). Per altra banda, petites diferències en la grandària dels amplicons que no podrien resoldre's en sistemes de gel d'Agarosa són fàcilment reconeixibles en la tècnica d'HRM (Wittwer, 2009).

Per tant, segons la disponibilitat de material i de l'equip necessari, del cost i de la magnitud de l'experiment s'elegirà un o l'altre tipus de marcadors dissenyats en aquest estudi per a l'estudi de l'Herència Materna.

5. CONCLUSIONS

- Es va aconseguir la correcta amplificació i seqüenciació de regions d'interès del cloroplast per a l'estudi de l'Herència Materna, obtenint inclòs seqüències no disponibles a la base de dades de l'NCBI, així com l'estudi dels canvis nucleotídics presents en aquestes seqüències, interessants en la comparació de les espècies silvestres relacionades amb *S. melongena*.
- Es va aconseguir dissenyar marcadors moleculars útils per a l'estudi de l'Herència Materna en l'albergínia cultivada i les espècies silvestres relacionades utilitzades per a la seva millora, que poden ser interessants per als programes de millora d'aquesta espècie. Els resultats obtesos per als dos tipus de marcadors, CAPS i HRM, han resultat favorables i permeten la diferenciació visualment fàcil de les espècies silvestres de *S. melongena* tant en poblacions F1 com en poblacions segregants.
- Es va aconseguir l'obtenció de marcadors de tipus CAPS econòmicament rentables i amb patrons de bandes fàcilment diferenciables en gels d'agarosa per a les diferents espècies silvestres analitzades. Inclòs es van aconseguir marcadors CAPS per a l'espècie *S. insanum* la qual mitjançant la tècnica d'HRM no és diferenciable de *S. melongena* (d'algunes accessions), que no van ser comprovats però poden ser utilitzats en posteriors estudis.
- De l'anàlisi d'SNPs mitjançant HRM es va dissenyar un marcador basat en un polimorfisme C/T que va permetre diferenciar 14 espècies silvestres relacionades de *S. melongena*. Per tant, es pot pensar que és probable la presència d'aquest polimorfisme a altres espècies silvestres del "pool" genètic de l'albergínia el que convertiria aquest marcador en molt útil per a programes de millora d'aquesta espècie. Podria estudiar-se l'SNP a partir del qual es van dissenyar els encebadors per a l'experiment d'HRM, ja que sembla que es troba prou

conservat, en altres espècies del pool genètic de l'albergínia per a determinar quina podria ser la capacitat d'aquest marcador de diferenciar la resta de silvestres de *S. melongena*.

- Els resultats de l'anàlisi de l'SNP mitjançant HRM van resultar en diferents corbes per a les diferents accessions de l'espècie *S. melongena* utilitzades com a parentals, tot i ser de la mateixa espècie. Aquestes accessions presenten diferents característiques fenotípiques pel que pot ser útil poder diferenciar quina d'elles és la planta mare d'una planta d'interès. Per tant, seria interessant el futur estudi d'aquest marcador dins de l'espècie *S. melongena*.

6. BIBLIOGRAFIA

ACQUADRO, A., BARCHI, L., GRAMAZIO, P., PORTIS, E., VILANOVA, S., COMINO, C., PLAZAS, M., PROHENS, J. AND LANTERI, S. (2017). Coding SNPs analysis highlights genetic relationships and evolution pattern in eggplant complexes. *PLOS ONE*, 12(7), p.e0180774.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

BUDAR, F. AND PELLETIER, G. (2001). Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 324(6), pp.543-550.

DISTEFANO, G., CARUSO, M., LA MALFA, S., GENTILE, A. AND WU, S. (2012). High Resolution Melting Analysis Is a More Sensitive and Effective Alternative to Gel-Based Platforms in Analysis of SSR – An Example in Citrus. *PLoS ONE*, 7(8), p.e44202.

GRAMAZIO, P., PROHENS, J., PLAZAS, M., MANGINO, G., HERRAIZ, F., GARCÍA-FORTEA, E. and VILANOVA, S. (2018). Genomic Tools for the Enhancement of Vegetable Crops: A Case in Eggplant. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), pp.1-13

GREEN, M.R. AND SAMBROOK, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Cold Spring Harbor, New York: 2012)

HASNUNNAHAR, M., KHAN, M. AND ISSHIKI, S. (2012). Pollen and seed fertility of three functional male-sterile lines of eggplant with the wild *Solanum* cytoplasm. *Scientia Horticulturae*, 139, pp.58-61.

ISSHIKI, S. AND KAWAJIRI, N. (2002). Effect of cytoplasm of *Solanum violaceum* Ort. on fertility of eggplant (*S. melongena* L.). *Scientia Horticulturae*, 93(1), pp.9-18

KAUSHIK, P., PROHENS, J., VILANOVA, S., GRAMAZIO, P. AND PLAZAS, M. (2016). Phenotyping of Eggplant Wild Relatives and Interspecific Hybrids with Conventional and Phenomics Descriptors Provides Insight for Their Potential Utilization in Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 7.

KHAN, M. AND ISSHIKI, S. (2008). Development of a male sterile eggplant by utilizing the cytoplasm of *Solanum virginianum* and a biparental transmission of chloroplast DNA in backcrossing. *Scientia Horticulturae*, 117(4), pp.316-320.

KHAN, M. AND ISSHIKI, S. (2010). Development of a cytoplasmic male-sterile line of eggplant (*Solanum melongena* L.) with the cytoplasm of *Solanum anguivi*. *Plant Breeding*, 130(2), pp. 256-260.

KNAPP, S., VORONTSOVA, M. AND PROHENS, J. (2013). Wild Relatives of the Eggplant (*Solanum melongena* L.: Solanaceae): New Understanding of Species Names in a Complex Group. *PLoS ONE*, 8(2), p.e57039.

PLAZAS, M., ANDÚJAR, I., VILANOVA, S., GRAMAZIO, P., HERRAIZ, F. AND PROHENS, J. (2014). Conventional and phenomics characterization provides insight into the diversity and relationships of hypervariable scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) and gboma (*S. macrocarpon* L.) eggplant complexes. *Frontiers in Plant Science*, 5.

PLAZAS, M., VILANOVA, S., GRAMAZIO, P., RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A., FITA, A., HERRAIZ, F., RANIL, R., FONSEKA, R., NIRAN, L., FONSEKA, H., KOUASSI, B., KOUASSI, A., KOUASSI, A. AND PROHENS, J. (2016). Interspecific Hybridization between Eggplant and

Wild Relatives from Different Gene Pools. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 141(1), pp.34-44.

POLIGNANO, G., UGGENTI, P., BISIGNANO, V. AND GATTA, C. (2009). Genetic divergence analysis in eggplant (*Solanum melongena* L.) and allied species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(2), pp.171-181.

PRATAP, A. AND KUMAR, J. (2016). *Alien gene transfer in crop plants, volume 2*. New York: Springer.

RANIL, R., PROHENS, J., AUBRIOT, X., NIRAN, H., PLAZAS, M., FONSEKA, R., VILANOVA, S., FONSEKA, H., GRAMAZIO, P. AND KNAPP, S. (2016). *Solanum insanum* L. (subgenus *Leptostemonum* Bitter, Solanaceae), the neglected wild progenitor of eggplant (*S. melongena* L.): a review of taxonomy, characteristics and uses aimed at its enhancement for improved eggplant breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(7), pp.1707-1722.

RIRIE, K., RASMUSSEN, R. AND WITTEWER, C. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), pp. 154-160.

ROTINO, G. L., SALA T., TOPPINO L. (2016). Eggplant, en: *Alien gene transfer in crop plants, volume 2: Achievements and impacts*. Springer-Verlag, New York: 381- 409.

SHAVRUKOV, Y. (2016). Comparison of SNP and CAPS markers application in genetic research in wheat and barley. *BMC Plant Biology*, 16(S1). High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research Simko, I. (2016). High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research. *Trends in Plant Science*, 21(6), pp.528-537.

SUNSERI F., POLIGNANO G. B., ALBA V., LOTTI C., BISIGNANO V., MENNELLA G., D'ALESSANDRO A., BACCHI M., RICCARDI P., FIORE M. C., RICCIARDI L. (2010). Genetic diversity and characterization of African eggplant germplasm collection. *African Journal of Plant Science*. 4. 231-241.

SYFERT, M., CASTAÑEDA-ÁLVAREZ, N., KHOURY, C., SÄRKINEN, T., SOSA, C., ACHICANOY, H., BERNAU, V., PROHENS, J., DAUNAY, M. AND KNAPP, S. (2016). Crop wild relatives of the brinjal eggplant (*Solanum melongena*): Poorly represented in genebanks and many species at risk of extinction. *American Journal of Botany*, 103(4), pp.635-651.

TAHER, D., SOLBERG, S., PROHENS, J., CHOU, Y., RAKHA, M. AND WU, T. (2017). World Vegetable Center Eggplant Collection: Origin, Composition, Seed Dissemination and Utilization in Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8.

THOMSEN, N., ALI, R., AHMED, J. AND ARKELL, R. (2012). High Resolution Melt Analysis (HRMA); a Viable Alternative to Agarose Gel Electrophoresis for Mouse Genotyping. *PLoS ONE*, 7(9), p.e45252.

TUCKER E., LAM HUYNH B. (2014) Genotyping by High-Resolution Melting Analysis en: Delphine Fleury and Ryan Whitford (eds.), *Crop Breeding: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York, 59-66.

WEESE, T. AND BOHS, L. (2010). Eggplant origins: Out of Africa, into the Orient. *TAXON*, 59(1), pp.49-56.

WITTEWER, C. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, 30(6), pp.857-859. DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, 30(6), pp.857-859.

YOSHIMI, M., KITAMURA, Y., ISSHIKI, S., SAITO, T., YASUMOTO, K., TERACHI, T. AND YAMAGISHI, H. (2013). Variations in the structure and transcription of the mitochondrial atp and cox genes in wild Solanum species that induce male sterility in eggplant (*S. melongena*). *Theoretical and Applied Genetics*, 126(7), pp.1851-1859.