

Trabajo Final de Máster (TFM)
Curso 2018/19

DESARROLLO Y FENOTIPADO DE UNA POBLACIÓN MULTIPARENTAL MAGIC DE BERENJENA

Titulación:

Máster en Mejora Genética Vegetal
COMAV, Universitat Politècnica de València (UPV)

Presentado por:

Andrea Arrones Olmo

Director:

Santiago Vilanova Navarro

Director experimental:

Pietro Gramazio



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Valencia, septiembre de 2019

Resumen

Como consecuencia de los procesos de domesticación y de los programas de mejora genética vegetal, se ha producido una importante pérdida de la variabilidad genética de las especies cultivadas. Con el objetivo de recuperar parte de esta variabilidad perdida, aprovechar una diversidad genética más amplia e incrementar la precisión en el mapeo de caracteres cuantitativos, se desarrolla la primera población experimental multiparental MAGIC (Multi-parent Advanced Generation InterCross) de berenjena. La tercera generación de autofecundación presenta un elevado grado de fijación (87,5%) por lo que el fenotipado de estos materiales permite diseccionar la genética de distintos caracteres de interés específicos de berenjena como antocianos y clorofila en los frutos, mutación *Puc* (pigmentación debajo del cáliz), forma del fruto, color de la flor y espinosidad de la planta. Los resultados del análisis del fenotipado junto con los datos de genotipado futuros, permitirán validar el modo de herencia genética de los distintos caracteres estudiados y se podrán confirmar los genes/QTLs asociados. De este modo, estos materiales consiguen optimizar el aprovechamiento de los recursos fitogenéticos disponibles y representan un material de élite para la mejora de la berenjena.

Palabras clave

MAGIC, berenjena, diversidad, fenotipado, poblaciones de mejora

Resum

Com a conseqüència dels processos de domesticació i dels programes de millora genètica vegetal, s'ha produït una important pèrdua de la variabilitat genètica de les espècies cultivades. Amb l'objectiu de recuperar part d'aquesta variabilitat perduda, aprofitar una diversitat genètica més àmplia i incrementar la precisió en el mapatge de caràcters quantitius, es desenvolupa la primera població experimental multiparental MAGIC (Multi-parent Advanced Generation InterCross) d'albergina. La tercera generació d'autofecundació presenta un elevat grau de fixació (87,5%), pel que el fenotipat d'aquests materials permet disseccionar la genètica de distints caràcters d'interès específics d'albergina com antocians y clorofil·la en els fruits, mutació *Puc* (pigmentación davall del calze), forma del fruit, color de la flor i espinositat de la planta. Els resultats de l'anàlisi del fenotipat junt a les dades de genotipat futures, permetran validar el mode d'herència genètica dels distints caràcters estudiats i es podran confirmar els gens/QTLs associats. D'aquesta manera, estos materials aconseguen optimitzar l'aprofitament dels recursos fitogenètics disponibles i representaran un material d'elit per a la millora de l'albergina.

Paraules clau

MAGIC, albergina, diversitat, fenotipat, poblacions de millora

Abstract

Because of domestication processes and plant genetic breeding programs, there has been a significant loss of genetic variability of the cultivated species. With the aim of recovering part of this lost variability, take advantage of a wider genetic diversity and increase the precision in the mapping of quantitative traits, the development of the first experimental multiparental eggplant MAGIC (Multi-parent Advanced Generation InterCross) population is carried out. The third generation of self-fertilization has a high degree of fixation (87,5%), so the phenotyping of these materials allows the dissection of the genetics of different traits of interest specific to eggplant such as anthocyanins and chlorophyll in fruits, *Puc* mutation (pigmentation under the calyx), fruit shape, flower color and plant prickles. The analysis phenotyping results, together with the future genotyping data, will validate the genetic inheritance mode of the different characters studied and the associated genes/QTLs can be confirmed. In this way, these materials manage to optimize the use of the available plant genetic resources and will represent an elite material for the breeding of eggplant.

Key words

MAGIC, eggplant, diversity, phenotyping, breeding populations

Agradecimientos

Con la presentación de este TFM acaba otra etapa de mi vida en la que he aprendido mucho sobre el mundo vegetal y he conocido a grandes personas que me han acompañado por el camino y a las que tanto tengo que agradecer.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis padres, Pili y Vicente, por haberme enseñado a esforzarme y luchar por mis objetivos, porque sin vuestro apoyo esto no habría sido posible; y a Juan por haberme aguantado durante estos duros años de universidad.

A todos mis compañeros de máster, porque juntos hemos superado dos años de altibajos y ya podemos decir que somos "Mejoradores". Pero también, a todos mis compañeros de laboratorio, empezando por David y Giulio que son los que más me han tenido que sufrir, a Loles y Gloria por sacar este laboratorio siempre adelante, a Mariola por su positividad y alegría, a Edgar, Ana y Carla por amenizar nuestros largos días en el COMAV, a "mi primo", Esther, Juan Pacheco, y a todos los "Tomates" y "Melones".

Y por último, y no menos importante, gracias a mis directores Pietro y Santi. Pietro, muchas gracias por haber confiado en mí y haberme ayudado en todo desde el principio. Y gracias Santi por haberme guiado en este Trabajo de Fin de Máster que tanto he disfrutado.

Muchas gracias Jaime por permitirme formar parte de este equipo de investigación del que tan orgulloso tienes que estar, es todo un placer.

Índice general

Resumen	i
Resum	ii
Abstract	iii
Agradecimientos	iv
1. Introducción	1
1.1. El cultivo de la berenjena.....	1
1.1.1. Importancia económica	1
1.1.2. Encuadre taxonómico.....	2
1.1.3. Origen, domesticación y difusión	5
1.2. Rescate de la variabilidad perdida	7
1.2.1. Las consecuencias de la domesticación	7
1.2.2. Objetivos de mejora.....	9
1.2.3. Poblaciones experimentales.....	10
1.2.4. Población multiparental MAGIC	13
1.2.5. Selección de parentales.....	14
1.2.6. Entrecruzamientos y mezcla de genotipos	15
2. Justificación y objetivos	18
3. Materiales y métodos	19
3.1. Desarrollo y fijación de una población MAGIC de berenjena	19
3.1.1. Selección de parentales altamente variables	19
3.1.2. Esquema de entrecruzamientos	20
3.1.3. Autofecundación.....	21
3.1.4. Recolección de los frutos y extracción de las semillas.....	22
3.1.5. Manejo del cultivo.....	23
3.2. Fenotipado de la generación S3 de la población MAGIC	24

3.2.1. Color del fruto de berenjena	24
3.2.2. Forma del fruto de berenjena	26
3.2.3. Color de la flor.....	27
3.2.4. Espinosidad en la planta.....	29
3.3. Estudio sobre el modo de herencia genética	30
4. Resultados y discusión.....	32
4.1. Desarrollo y fijación de una población MAGIC de berenjena	32
4.2. Fenotipado de la generación S3 de la población MAGIC.....	33
4.2.1. Color del fruto de berenjena.....	33
4.2.2. Forma del fruto de berenjena	40
4.2.3. Color de la flor.....	42
4.2.4. Espinosidad en la planta.....	43
4.3. Perspectivas de futuro.....	45
4.3.1. Genotipado de la población MAGIC	45
4.3.2. Detección de QTLs y genes candidatos implicados en caracteres de calidad del fruto	45
5. Conclusiones.....	47
6. Bibliografía.....	48
7. Anexos.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Ranking mundial de los 5 países más importantes en producción de berenjena en 2017.	2
Figura 2. Parte de la variabilidad existente en los frutos de berenjena.	4
Figura 3. Morfología de <i>Solanum insanum</i>	6
Figura 4. Pardeamiento de la carne del fruto de berenjena con el transcurso del tiempo.	10
Figura 5. Población IL de berenjena desarrollada utilizando <i>S. insanum</i> como parental donante.	11
Figura 6. Selección de los parentales de la población MAGIC basada en la diversidad geográfica, genética y fenotípica.	15
Figura 7. Esquema general de entrecruzamientos para el desarrollo de una población MAGIC a partir de 8 parentales.	16
Figura 8. Parentales empleados para el desarrollo de la población MAGIC de berenjena.	20
Figura 9. Esquema de obtención de la población MAGIC de berenjena a partir de ocho parentales altamente variables.	21
Figura 10. Coloración del fruto de berenjena a diferentes días tras la anthesis (DAA).	22
Figura 11. Variabilidad existente en el color de los frutos de berenjena de la generación S3 por la presencia o ausencia de antocianos y clorofila.	25
Figura 12. Presencia o ausencia de la mutación <i>Puc</i> en frutos de berenjena de la generación S3.	26
Figura 13. Variabilidad en la forma de los frutos de berenjena de la generación S3.	27
Figura 14. Variabilidad en el color de la flor de berenjena de la generación S3, desde violeta azulado hasta blanco.	28
Figura 15. Espinosidad presente en hojas y tallo de plantas de berenjena de la generación S3.	30

Figura 16. Esquema del modo de herencia genética de los antocianos en los frutos de berenjena en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.....	34
Figura 17. Esquema del modo de herencia genética de la clorofila en los frutos de berenjena en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC. ..	36
Figura 18. Esquema del modo de herencia genética de la mutación ¹ <i>Puc</i> en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.	38
Figura 19. Esquema del modo de herencia genética de la mutación ² <i>Puc</i> en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.	39
Figura 20. Esquema del modo de herencia genética de la forma fasciada de los frutos de berenjena en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.....	40
Figura 21. Esquema del modo de herencia genética del color de la flores en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.	42
Figura 22. Esquema del modo de herencia genética de la espinosidad en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. Encuadre taxonómico de la berenjena.	3
Tabla 2. Ventajas y limitaciones de las poblaciones biparentales, GWAS y MAGIC.....	13
Tabla 3. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de los antocianos en los frutos de berenjena.....	34
Tabla 4. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de la clorofila en los frutos de berenjena.....	37
Tabla 5. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (1H_0) de herencia genética de la mutación <i>Puc</i>	38
Tabla 6. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (2H_0) de herencia genética de la mutación <i>Puc</i>	39
Tabla 7. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de la forma fasciada de los frutos de berenjena.	41
Tabla 8. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética del color de las flores.....	43
Tabla 9. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de la espinosidad.....	45

Índice de anexos

Anexo 1. Protocolo de germinación de semillas	57
---	----

1. Introducción

1.1. El cultivo de la berenjena

1.1.1. Importancia económica

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las hortalizas deben ser una parte muy importante de nuestra dieta, ya que son ricas en compuestos esenciales para la salud humana. Dentro de la familia de las solanáceas se encuentran algunas de las hortalizas de mayor relevancia económica, como la berenjena (Faostat, 2017). En muchos países, la berenjena se considera un alimento básico y con el fin de garantizar la seguridad alimentaria mundial, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha incluido este cultivo, junto con otros 34, en el Anexo 1 del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (<http://www.fao.org>).

La berenjena se sitúa en la quinta posición mundial entre las hortalizas con una producción total de 52,3 millones de toneladas (Faostat, 2017). Los países líderes en producción de berenjena son China, India, Egipto, Turquía e Irán, destacando los dos primeros por encima del resto (Figura 1). China es el principal productor con un 63% de la producción total, seguido de India con un 24%. Le siguen, aunque a mucha distancia, Egipto, Turquía e Irán con un 1-1,5% de la producción.

En España, la producción de berenjena supera las 225.000 toneladas, destinándose un 64% de la producción a la exportación, fundamentalmente a la Unión Europea (Fepex, 2017). De las 3.700 hectáreas dedicadas al cultivo de berenjena, 2.400 hectáreas se localizan en Almería, donde se genera más del 90% de la producción española total.

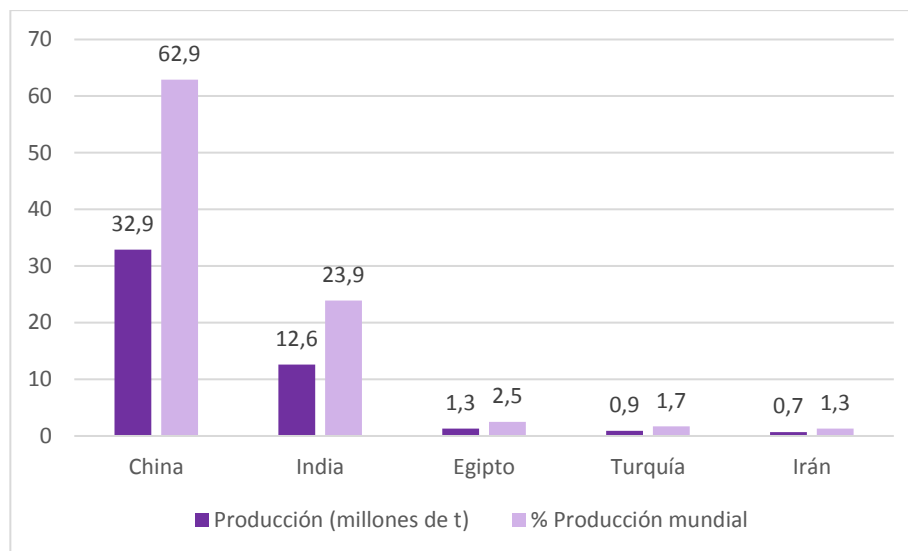


Figura 1. Ranking mundial de los 5 países más importantes en producción de berenjena en 2017. Fuente: Faostat, 2017.

En los últimos años se ha incrementado considerablemente la producción mundial de berenjena, en parte favorecida por recientes estudios que ponen de manifiesto su poder nutraceutico y su rica composición en micronutrientes y compuestos bioactivos saludables (Plazas et al., 2013a,b; Scorsatto et al., 2017). Dentro de las especies hortícolas, la berenjena es una de las más ricas en compuestos fenólicos, destacando sobre los demás el ácido clorogénico. Estos compuestos le confieren un alto poder antioxidante (Cao et al., 1996; Stommel and Whitaker, 2003; Prohens et al., 2007), así como la capacidad de neutralizar radicales libres y actividad antitumoral *in vitro* (Sawa et al., 1998; González, 2015). Todas estas propiedades bioactivas hacen que la berenjena sea un cultivo con interés creciente.

1.1.2. Encuadre taxonómico

La berenjena (*Solanum melongena* L.) pertenece a las angiospermas y se encuadra dentro de la familia Solanaceae junto con otras especies cultivadas de relevante importancia económica como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimiento (*Capsicum* sp.), patata (*Solanum tuberosum* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Tabla 1). Esta familia comprende aproximadamente 101 géneros y

2.700 especies distribuidas por todo el mundo y con una gran diversidad de hábitos, morfología y ecología (Knapp et al., 2019). Las solanáceas se caracterizan por la presencia de flores pentámeras, con sépalos persistentes frecuentemente ascendentes. Generalmente presentan ovario súpero o bilocular, con varios óvulos por lóbulo. Los frutos suelen ser bayas, drupas o cápsulas, indehiscentes y con varias semillas por lóbulo.

Tabla 1. Encuadre taxonómico de la berenjena. Fuente: Knapp et al., 2019.

Clase	Magnoliopsida
Superorden	Solananae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Tribu	Solaneae
Género	<i>Solanum</i>
Subgénero	<i>Leptostemonum</i>
Sección	<i>Melongena</i>
Serie	<i>Incaniformia</i>
Especie	<i>Solanum melongena</i> L.

El género *Solanum* engloba aproximadamente la mitad de la diversidad de las especies de la familia y es uno de los pocos géneros de plantas con flores que incluye más de 1.300 especies. Se distribuye por todos los continentes, a excepción de la Antártida, en una amplia variedad de hábitats, desde selvas tropicales hasta los desiertos más secos (Knapp et al., 2019). En él se encuentran plantas herbáceas, arbustivas o arbóreas, usualmente espinosas, cuyos frutos suelen ser bayas globulosas.

La berenjena es diploide, con un número cromosómico de $2n=24$ y un tamaño de genoma aproximadamente de 1,21 Gbp (Barchi et al., 2019b). Se trata de una planta herbácea anual de crecimiento indeterminado que puede

alcanzar una altura de 0,5-1,5 m (Illescas and Vesperinas, 1989). Las hojas son grandes y ovaladas, de hasta 15-25 cm de largo. Son pilosas en la cara abaxial y suelen presentar espinas en las nerviaciones prominentes o en el peciolo de las hojas. Presenta flores hermafroditas solitarias o en pequeños racimos, cuyo cáliz es persistente y tomentoso con sépalos espinosos y pétalos de color violáceo o blanco. Por lo general, la berenjena es autógama, aunque eventualmente puede darse la polinización cruzada con otras plantas cercanas por presentar cierto porcentaje de alogamia. Éste puede llegar a ser de hasta un 30%, especialmente en el cultivo al aire libre y en presencia de insectos polinizadores (Kalloo, 1993). Concretamente, coleópteros de los géneros *Colaspis fabricius* y *Astylus laporte* o himenópteros del género *Bombus latreille*, son eficientes polinizadores de la berenjena (Milléo et al., 2011). Los frutos de berenjena son muy variables (Figura 2), con formas redondeadas hasta completamente alargadas, un tamaño de 2-30 cm de largo y con la epidermis lisa o corrugada. Presentan una amplia gama de colores como morado oscuro, violeta, negro, blanco o amarillo en su estado de madurez fisiológica, y pueden ser lisas o estriadas. La pulpa es carnosa, de coloración amarilla, blanca o verde, produciéndose un pardeamiento de la carne del fruto al entrar en contacto con el aire por su elevado contenido en ácido clorogénico y la actividad polifenol oxidasa (PPOs) (Daunay and Hazra, 2012; Mishra et al., 2013; Plazas et al., 2013a,b). Cada fruto puede producir hasta 2.500 semillas pequeñas pudiendo haber en 1 g unas 250 semillas.



Figura 2. Parte de la variabilidad existente en los frutos de berenjena. Fuente: Kaushik et al., 2018.

En cuanto a su cultivo, presenta una amplia variedad de hábitats de crecimiento y características vegetativas (Knapp et al., 2019), sin embargo, la berenjena se considera uno de los cultivos hortícolas más exigentes en calor. Puede tolerar temperaturas de hasta 40-45 °C, pero a temperaturas próximas a la mínima biológica, inferiores a 10-12 °C, se reducen los procesos biológicos, induciendo el retraso del crecimiento y afectando a la floración, la fecundación y al posterior desarrollo del fruto, pudiendo aparecer frutos partenocárpicos (Romano and Leonardi, 1993). Bajo condiciones adecuadas, los frutos presentan sus mejores atributos organolépticos unas 4-5 semanas antes de la madurez fisiológica (González-Lavaut et al., 2007).

1.1.3. Origen, domesticación y difusión

A diferencia de la mayoría de las solanáceas cultivadas, originales del Nuevo Mundo, principalmente de América del Sur (D'arcy, 1972), la berenjena es una de las pocas especies originaria del Viejo Mundo. Se han propuesto muchas teorías sobre su domesticación, pero hasta el momento la mayoría de los estudios se han basado en un número reducido de secuencias de DNA y marcadores al azar (Lester and Hasan, 1991; Weese and Bohs, 2010; Meyer et al., 2012; Knapp et al., 2013). Estos estudios consideran a la berenjena como una especie nativa de la India, donde se domesticó hace muchos años y donde se encuentra la mayor diversidad de formas cultivadas modernas, primitivas y formas adventicias (Daunay, 2008). Por ello, se ha considerado a la India como centro primario de diversidad, y otras partes del sudeste de Asia, China y la vertiente mediterránea como centros secundarios de diversidad (Bhaduri, 1951; Vavilov, 1951; Zeven and Zhukovsky, 1975; Karihaloo and Gottlieb, 1995; Stommel and Whitaker, 2003; Meyer et al., 2012; Cericola et al., 2013).

Sin embargo, estudios más recientes basados en marcadores moleculares SNPs sugieren que la berenjena se domesticó en el sudeste asiático, produciendo como consecuencia una reducción de la diversidad genética de un 47% (Page et al., 2019b). Teniendo en cuenta que la berenjena y sus parientes silvestres son predominantemente hermafroditas, y en algunos

casos andromonoicos (Aubriot and Daunay, 2019), la selección humana es probablemente la causa principal de la poca variabilidad que se observa en las especies cultivadas.

Estudios basados en la variabilidad morfológica y molecular indican que la berenjena es el resultado de la domesticación de la especie silvestre *S. insanum* L. (Meyer et al., 2012; Page et al., 2019b). Esta especie silvestre se encuentra principalmente en el sudeste de Asia y presenta muchas similitudes morfológicas con las formas cultivadas de *S. melongena* (Figura 3). Además, es posible la obtención de híbridos completamente fértiles y con meiosis regular entre las dos especies (Knapp et al., 2013).

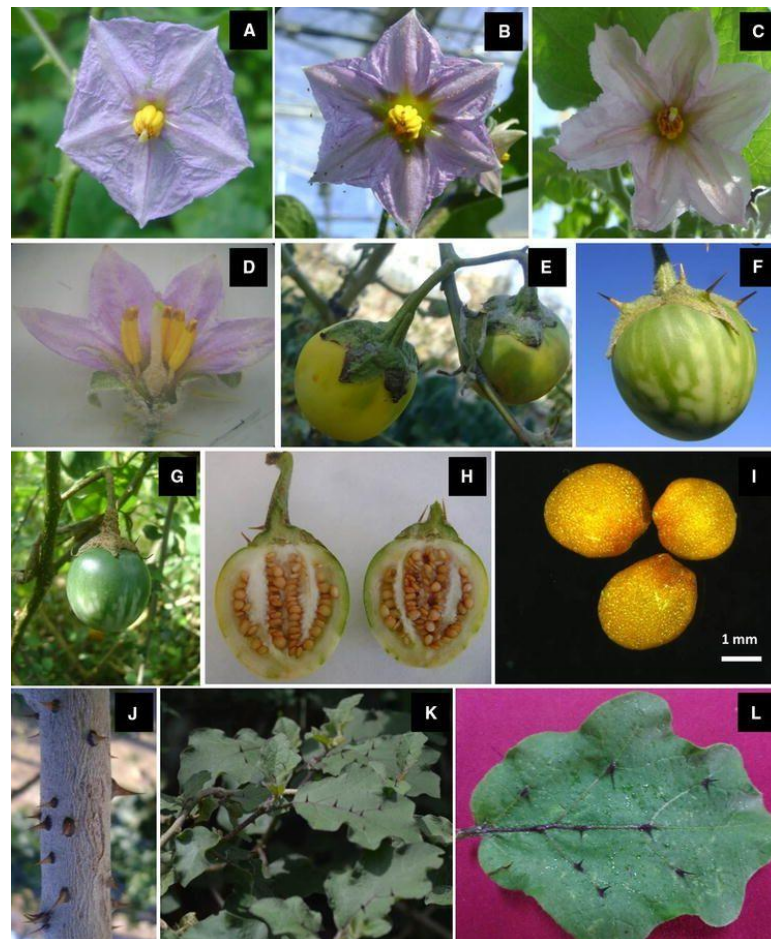


Figura 3. Morfología de *Solanum insanum*. (A-C) Flores de diferentes accesiones y orígenes; (D) Sección longitudinal de la flor; (E-G) Frutos de las diferentes accesiones; (H) Sección longitudinal del fruto; (I) Vista microscópica de las semillas; (J-L) Espinosidad de la planta.

Fuente: Ranil et al., 2017.

Previamente a los estudios de Meyer et al. (2012), Lester y Hasan (1991) sugirieron que la berenjena cultivada fue domesticada a partir de *S. incanum*, especie que se encuentra distribuida en África oriental y Oriente Medio (Knapp et al., 2013). Estos estudios defendían que las formas ancestrales de *S. melongena* se originaron en el trópico africano y se apoyaban en la gran variabilidad morfológica y de hábitats de estos taxones (Weese and Bohs, 2010). Además, postulaban que en el Neolítico las formas silvestres de berenjena se utilizaban con fines medicinales, para curtir cuero o cuajar la leche, y habrían acompañado al ser humano en sus desplazamientos desde Oriente Medio hasta la India. Una vez en la región indo-birmana, y como consecuencia de la domesticación, estos materiales habrían evolucionado a las formas cultivadas actuales (Nuez et al., 2002).

Los análisis más recientes de *S. melongena* apuntan a que se produjo una domesticación única y un flujo genético significativo de malezas de cultivos silvestres (Page et al., 2019b). A través de la ruta de la seda, la berenjena habría migrado hacia el Mediterráneo difundiéndose hacia Occidente en manos de los árabes (González, 2015). A partir de las variedades introducidas por los árabes irían surgiendo nuevas variedades más adaptadas a las condiciones de cada localidad, dando lugar a la gran diversidad actual (Prohens et al., 2005). La introducción en América la debieron realizar los españoles, sin embargo, en este continente no ha alcanzado la importancia que tiene en el Viejo Mundo.

1.2. Rescate de la variabilidad perdida

1.2.1. Las consecuencias de la domesticación

La domesticación suele modificar el rango de variación de los caracteres directamente afectados por las presiones de selección (por ejemplo, el tamaño del fruto) y arrastrados genéticamente con ellos (por ejemplo, el tamaño de las semillas). Cuando la domesticación se produce en áreas distintas del centro de

origen, las nuevas condiciones ambientales aplican presiones de selección suplementarias, que contribuyen a un mayor cambio morfológico y fisiológico del cultivo (Weese and Bohs, 2010).

Por lo que respecta la diversidad genética, la domesticación parece ser generalmente una pérdida más que una ganancia, ya que la mayoría de los genes principales que se ven afectados por la domesticación están bajo control genético recesivo y generalmente se asocia a una pérdida de la función o regulación genética (Lester, 1989). Suele ir acompañada de una reducción de la diversidad genética dentro del taxón cultivado en comparación con la silvestre (Smykal et al., 2018), lo que parece paradójico ya que las plantas domesticadas se caracterizan por una gran diversidad fenotípica. La domesticación también puede tener un impacto sobre el genoma, produciendo cambios en la arquitectura genética a lo largo de los cromosomas y la expresión génica (Page et al., 2019a).

Por tanto, como consecuencia de los procesos de domesticación y de los programas de mejora genética vegetal, generalmente se ha producido una importante pérdida de la variabilidad genética de las especies cultivadas, lo que provoca un mayor riesgo de pérdidas de producción frente a las amenazas y una disminución de las fuentes de variabilidad para la mejora de caracteres de calidad del fruto, entre otros (Meyer et al., 2015). Por este motivo y aunque el cultivo de la berenjena muestra tendencias positivas en cuanto a producción, rendimientos y consumo, en la actualidad está constantemente amenazado por múltiples estreses abióticos y bióticos, debido al estrechamiento y uniformidad genética de las variedades comerciales modernas de alto rendimiento y al cambio climático (Dempewolf et al., 2014).

Concretamente, la berenjena cultivada ha experimentado una fuerte reducción de la variabilidad genética a lo largo los procesos de domesticación desde África a Asia y finalmente a Europa, provocando un estrechamiento de su base genética en comparación con sus especies cercanas (Meyer et al., 2015; Acquadro et al., 2017). Estudios con marcadores moleculares demuestran que *S. melongena* muestra una diversidad molecular reducida respecto a su

pariente silvestre *S. incanum* para cpDNA (Sakata and Lester, 1994), RAPD (Karihaloo et al., 1995; Singh et al., 2006), SSR (Mutegi et al., 2015; Tümbilen et al., 2011) y SNPs en todo el genoma. Esto puede ser debido a que la domesticación de la berenjena se realizó a partir de un acervo genético limitado, lo cual pudo originar un cuello de botella (Issiki et al., 1994; Karihaloo y Gottlieb, 1995; Vorontsova et al., 2013).

La falta de variación genética en las especies cultivadas limita la explotación de la variación intraespecífica (Zamir, 2001). A este respecto, para lograr recuperar la variabilidad genética perdida, los mejoradores de plantas están recurriendo a las especies relacionadas y a los parientes silvestres como fuentes para ampliar la base genética de las especies cultivadas (Prohens et al., 2017).

1.2.2. Objetivos de mejora

La mejora de la berenjena se ve limitada debido a que la mayoría de los caracteres de interés biológico y económico son de naturaleza cuantitativa. Estos caracteres muestran una variación continua dentro y entre especies y pueden estar controlados por múltiples genes de efecto pequeño (Frary et al., 2003; Daunay and Hazra, 2012; Portis et al., 2014). El control poligénico de estos caracteres complica la identificación de las variantes moleculares causales (Morell et al., 2012). Por este motivo, existe un conocimiento limitado sobre el control genético de caracteres de importancia agronómica para la berenjena. Esto hace que sea necesario caracterizar y realizar la mejora en plantas adultas, lo que requiere del uso de invernaderos o campos de cultivo, limitando así el número de individuos a estudiar. Además, gran parte del germoplasma relacionado que podría resultar interesante para la mejora no está suficientemente caracterizado (Daunay et al., 2001b; Robinson et al., 2001).

Actualmente, los principales objetivos de mejora en berenjena se centran en la calidad funcional y aparente del fruto, aparte de la productividad, proponiendo el desarrollo de variedades con un contenido elevado en ácido clorogénico y baja actividad de los enzimas polifenol oxidasa (PPOs), que

contribuyen al pardeamiento de la carne del fruto (Daunay and Hazra, 2012; Mishra et al., 2013; Plazas et al., 2013a,b) (Figura 4). Además, destacan por su importancia la mejora relacionada con el color de la piel y la forma del fruto, la espinosidad del cáliz, el color de la carne, así como el ya mencionado pardeamiento de la misma.



Figura 4. Pardeamiento de la carne del fruto de berenjena con el transcurso del tiempo.

Fuente: Cantwell and Suslow, 2009.

Los trabajos realizados por distintos grupos muestran que existe una amplia diversidad en el material vegetal para todos estos caracteres (Plazas et al., 2013b).

1.2.3. Poblaciones experimentales

A pesar de la gran diversidad genética existente en el germoplasma disponible, no existen estudios sistemáticos que aborden de forma específica la generación de material de élite a partir de una amplia diversidad genética y el desarrollo de información clave para la mejora genética de caracteres de calidad funcional y aparente en berenjena. En particular, la utilización de poblaciones desarrolladas específicamente para este objetivo representaría una herramienta potente para conseguir estos objetivos (Pérez-de-Castro et al., 2012). El aprovechamiento de las especies silvestres en los programas de mejora comenzó hace casi 90 años a través del desarrollo de varios tipos de poblaciones segregantes como las líneas de introgresión (ILs), líneas recombinantes consanguíneas (RILs) y líneas consanguíneas a partir de

retrocruzamientos (BILs), entre otras (Eshed and Zamir, 1995; Paran et al., 1995; Monforte and Tanksley, 2000; Doganlar et al., 2002b).

En la actualidad, solo hay disponible una población IL de berenjena recientemente desarrollada en la que se utilizó la especie silvestre *S. incanum* como parental donante por su tolerancia relativamente alta a la sequía y *S. melongena* como recurrente (Gramazio et al., 2017) (Figura 5). En el conjunto de ILs resultantes se consiguió identificar 68 genes candidatos involucrados en la tolerancia a la sequía, por lo que representan un material de élite para desarrollar nuevos cultivares de berenjena adaptados a los desafíos planteados por el escenario del cambio climático.

Estas poblaciones han sido muy útiles en la introgresión de genes de resistencia a estreses bióticos y en la disección de caracteres complejos (Julián et al., 2013), pero tienen la desventaja de que se aprovecha una sola entrada de especie silvestre.

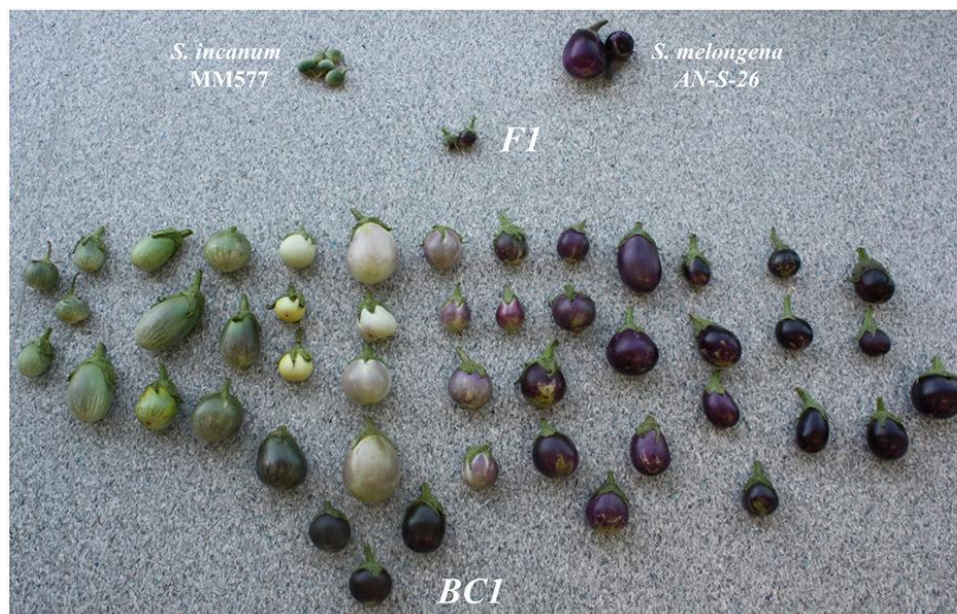


Figura 5. Población IL de berenjena desarrollada utilizando *S. incanum* como parental donante.

Fuente: Gramazio et al., 2017.

Las poblaciones experimentales tradicionales combinan el genoma de dos parentales con fenotipos diferentes para identificar regiones del genoma que regulan caracteres de interés. Dichas poblaciones combinan genomas fundadores bien caracterizados en pedigríes controlados y facilitan la investigación tanto del propio genoma como de su relación con el fenotipo y el medio ambiente (Huang et al., 2015). Sin embargo, cada una de estas poblaciones captura solo una pequeña instantánea de los factores que afectan a los caracteres debido a la estrecha base genética. Solo es posible detectar aquellas regiones genómicas que difieren entre dos líneas y la resolución se limita a 10-30 cM, ya que el análisis se basa principalmente en los eventos de recombinación que tienen lugar durante la meiosis de la F1 (Hall et al., 2010). Además, todos los alelos aparecen con alta frecuencia en la población.

Los estudios de asociación de genomas completos (GWAS) son una alternativa que ofrecen una vista panorámica de toda la población mediante el muestreo de individuos distantes relacionados, por lo que capturan una diversidad mucho mayor. El principal problema es que requieren muestras muy grandes para tener el poder suficiente para detectar regiones genómicas de interés y, por lo tanto, puede presentar dificultades a la hora de detectar alelos raros (Huang et al., 2015).

Otras poblaciones experimentales complejas pero intermedias en cuanto a poder, diversidad y resolución, ofrecen una alternativa a estos diseños y abordan sus limitaciones (Tabla 2). Por este motivo, se propone el rescate de parte de la variabilidad perdida en berenjena mediante la construcción de una población multiparental MAGIC (Multi-parent Advanced Generation InterCross) (Cavanagh et al., 2008).

Si bien una población de MAGIC requiere una mayor inversión inicial en capacidad y tiempo que una población biparental, incluye mayor diversidad de polimorfismos y la selección cuidadosa de los parentales fundadores asegura la relevancia de los resultados finales como un panel de recursos genéticos a largo plazo (Huang et al., 2015).

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de las poblaciones biparentales, GWAS y MAGIC. Fuente: Pascual et al., 2015.

Población	Ventajas	Limitaciones
Biparental	Rápido desarrollo Mapeo de alelos raros Fácil análisis	Limitado a dos alelos contrastantes Pocos eventos de recombinación Intervalo de soporte QTL grande
MAGIC	Varios alelos/QTLs segregantes Mayor precisión Mapeo fino Selección de SNPs candidatos Sin estructura poblacional Adecuado para la selección	Tiempo de desarrollo Poblaciones más grandes Requerimiento de marcadores
Estudios de asociación (GWAS)	Existen colecciones, elevada diversidad Recombinación natural Cuando el LD es limitado, mapeo preciso	Requiere muchos marcadores Estructura poblacional Cuando el LD es elevado, mapeo aproximado Alelos raros difíciles de identificar

1.2.4. Población multiparental MAGIC

Las poblaciones MAGIC se generan mediante varios entrecruzamientos de n líneas hasta que todos los genotipos fundadores se han combinado en iguales proporciones, seguido de una serie de autofecundaciones (Cavanagh et al., 2008). Este tipo de poblaciones permite el estudio y aprovechamiento de una diversidad genética más amplia mediante la mezcla de genomas de un mayor número de líneas parentales, generalmente ocho. Además, se incrementa la precisión del mapeo de QTLs al incluir más ciclos de meiosis informativas, maximizándose los fenómenos de recombinación y formación de nuevas combinaciones alélicas en las múltiples generaciones de cruzamientos y autofecundaciones necesarias para su desarrollo (Cavanagh et al., 2008). Todo esto, unido a la variación genética nueva en los ocho genotipos parentales, permite optimizar el aprovechamiento de estos recursos fitogenéticos.

Poblaciones MAGIC han sido construidas en varios cultivos como maíz (Johal et al., 2008), trigo (Huang et al., 2012), *Arabidopsis thaliana* (Kover et al., 2012), arroz (Bandillo et al., 2013) y tomate (Pascual et al., 2014), demostrando su poder de detección de QTLs subyacentes a caracteres cuantitativos de interés. En cuanto a la berenjena, esta sería la primera población MAGIC que se desarrolla.

El potencial de las poblaciones MAGIC para incluir un amplio rango de variación abre nuevas vías para la explotación de la variabilidad perdida. Además, permitirá diseccionar la genética de distintos caracteres de calidad del fruto, la correlación genética entre ellos, e identificar marcadores moleculares para la pirimidación de genes/QTLs implicados en la calidad del fruto. Estos materiales representarán un material de élite para la mejora de la calidad de la berenjena.

1.2.5. Selección de parentales

Planificar el diseño experimental de una población antes de iniciar su desarrollo ayuda a garantizar no solo la novedad, sino también su capacidad para responder preguntas prácticas de interés. Para las poblaciones MAGIC esto es de particular importancia dada la complejidad del diseño, la inversión de tiempo requerida para su desarrollo y la cantidad de factores que eventualmente influyen en el poder, la diversidad y la resolución de la progenie (Pascual et al., 2015).

Antes de iniciar el desarrollo de la población, se deben elegir cuidadosamente las líneas parentales fundadoras. La selección puede basarse en la diversidad geográfica, genética y fenotípica (Figura 6), ya sea en un conjunto restringido de material (por ejemplo, cultivares de élite, adaptación geográfica) o material de orígenes más diversos (colecciones mundiales de germoplasma, parientes silvestres lejanos) (Huang et al., 2015). Estos materiales deben estar bien caracterizados a nivel molecular y fisiológico.

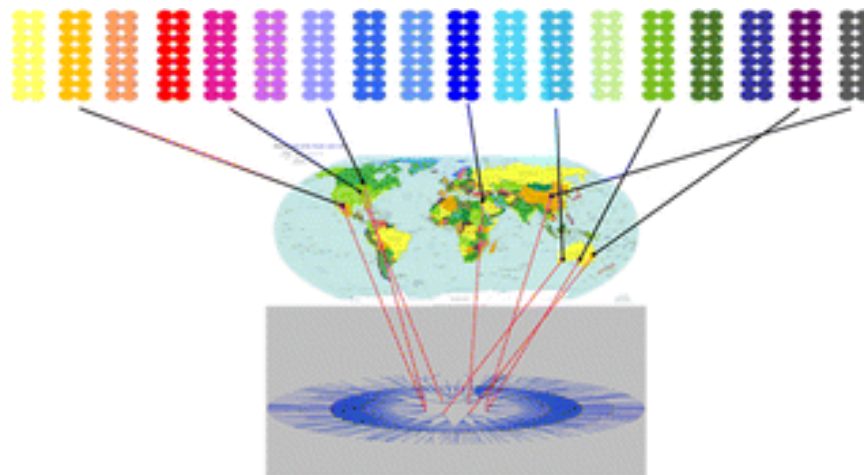


Figura 6. Selección de los parentales de la población MAGIC basada en la diversidad geográfica, genética y fenotípica. Fuente: Huang et al., 2015.

En caso de utilizar especies muy lejanas, hay que tener en cuenta que la incompatibilidad genética en algunas especies puede causar una gran reducción en el número de descendientes derivados de un cruce específico determinado (Huang et al., 2015). Las diferencias cromosómicas específicas de variedad, como los reordenamientos o las introgresiones silvestres, también pueden afectar a la progenie final y a su uso para el mapeo genético.

Además de la diversidad genética, la diversidad fenotípica debe manejarse cuidadosamente para producir un recurso que también sea práctico. La consideración de ciertos caracteres como el tiempo de floración en los parentales evitará la segregación indeseable en la progenie, lo que afectará no solo la evaluación fenotípica posterior, sino que también tendrá un impacto práctico en la realización de los cruces (Huang et al., 2015).

1.2.6. Entrecruzamientos y mezcla de genotipos

En la primera etapa del desarrollo de la población, los ocho parentales seleccionados se entrecruzan entre sí dos a dos ampliando de este modo la base genética (Figura 7). El resultado de esta etapa es un conjunto de líneas

cuyos genomas son una mezcla de ambos parentales fundadores, denominados híbridos simples.

En la segunda etapa, las líneas mixtas se entrecruzan aleatoria y secuencialmente como en las poblaciones de entrecruzamientos avanzados (AIC) (Darvasi and Soller, 1995), dando lugar a híbridos dobles. El objetivo principal de este entrecruzamiento es aumentar el número de recombinaciones en la población. Del mismo modo y con el mismo objetivo, en la tercera etapa los híbridos dobles se entrecruzan entre sí obteniendo híbridos cuádruples.

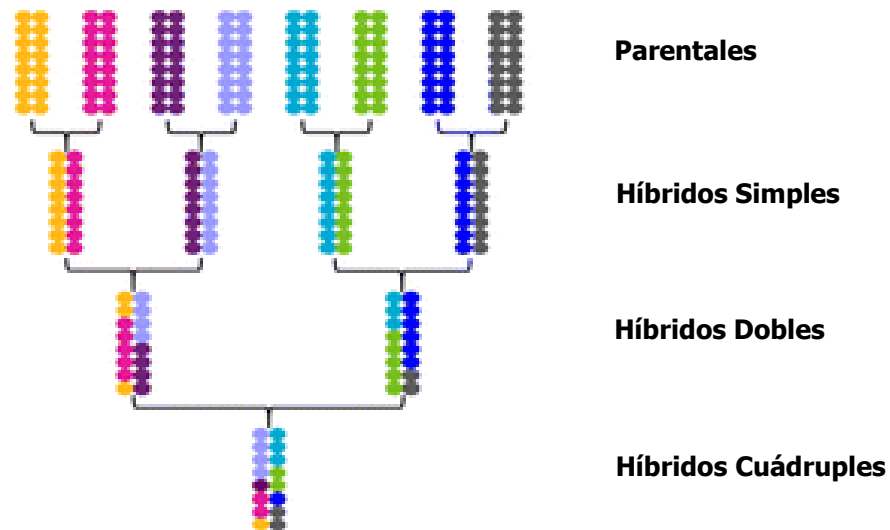


Figura 7. Esquema general de entrecruzamientos para el desarrollo de una población MAGIC a partir de 8 parentales. Fuente Huang et al., 2015.

En estas etapas es importante mantener el tamaño poblacional ya que, si en cualquier generación el número de individuos se reduce, los individuos derivados de ellos estarán relacionados entre sí, reduciendo la diversidad genética. Esta relación también puede crear una estructura poblacional que puede sesgar los análisis, afectando a la construcción del mapa genético y al mapeo de QTLs, si no se contabilizan de manera apropiada (Huang et al., 2015).

En la cuarta etapa, los individuos resultantes de la fase anterior se autofecundan para crear individuos homocigotos. Esta etapa se puede llevar a cabo vía descendientes de semilla única (Single Seed Descent, SSD) (Goulden, 1939; Brim, 1966; Bailey, 1971) o producción de dobles haploides (Blakeslee et al., 1922; Maluszynski et al., 2003). Si bien la producción de doble haploides es a menudo más rápida, las múltiples generaciones de autofecundación introducen una recombinación adicional, aunque menos que durante las etapas de entrecruzamientos iniciales y avanzados.

La descendencia de autofecundación no será totalmente homocigota, a menos que se hayan desarrollado líneas doble haploides. Normalmente, las plantas se autofecundan durante cinco o más generaciones, por lo que el nivel esperado de heterocigosidad en el genoma es inferior al 3% (Huang et al., 2015). En general, para desarrollar poblaciones MAGIC, se requiere un mínimo de 8 temporadas de cultivo para alcanzar al menos la generación S5.

2. Justificación y objetivos

Como resultado de lo expuesto anteriormente, los objetivos específicos de este Trabajo Final de Máster son:

- Desarrollo y fijación en homocigosis de una población MAGIC de berenjena.
- Fenotipado de la tercera generación de autofecundación (S3) de una población MAGIC.
- Estudio sobre el modo de herencia genética de caracteres de interés específicos de berenjena, en base a los datos de fenotipado anteriores.

3. Materiales y métodos

3.1. Desarrollo y fijación de una población MAGIC de berenjena

3.1.1. Selección de parentales altamente variables

La población MAGIC de berenjena se desarrolla a partir de ocho parentales genética y fenotípicamente muy distintos, así como complementarios para caracteres agronómicos y de calidad del fruto (Gramazio et al., 2019), incluyendo las siguientes accesiones (Figura 8):

- A) MM1597: procedente de India, verde y muy alargada;
- B) DH_Ecavi: línea doble haploide a partir del híbrido comercial Ecavi que presenta un fondo genético de élite;
- C) MM577: accesión de la especie silvestre *S. incanum* que ha sido utilizado como parental para el desarrollo de una línea de introgresión (Gramazio et al., 2017);
- D) AN-S-26: variedad tradicional morada de forma oval que ha sido utilizado como parental para el desarrollo de una línea de introgresión (Gramazio et al., 2017);
- E) H15: berenjena de Almagro con alto contenido en polifenoles y fondo verde;
- F) A0413: frutos achatados, fasciados y blancos;
- G) IVIA-371 o Listada de Gandía: listada con frutos muy grandes y fondo blanco con espinas en cáliz;
- H) ASI-S-1: procedente de China con frutos redondos y fondo morado.

Estos ocho parentales utilizados se han seleccionado por su diversidad geográfica, genotípica, ya que presentan una amplia diversidad genética según datos de resecuenciación (Gramazio et al., 2019), y fenotípica para los caracteres de calidad objetivo del trabajo. Entre ellos, se ha incluido una especie silvestre, *S. incanum*, para ampliar la base genética.



Figura 8. Parentales empleados para el desarrollo de la población MAGIC de berenjena.

3.1.2. Esquema de entrecruzamientos

Para iniciar el desarrollo de la población MAGIC de berenjena, los ocho parentales seleccionados (A-H) se entrecruzaron entre sí dos a dos dando lugar a los híbridos simples AB, CD, EF y GH. A su vez, los híbridos simples AB y CD se cruzaron entre ellos dando lugar al híbrido doble ABCD y los híbridos simples EF y GH se cruzaron para la obtención del híbrido doble EFGH (Figura 9).

Para la obtención de híbridos cuádruples ABCDEFGH se realizaron cruzamientos recíprocos entre los híbridos dobles utilizando en unos casos ABCD como parental femenino y en otros EFGH como masculino y viceversa, siguiendo un esquema a "zigzag". De esta manera todos los híbridos cuádruples presentaban los 8 genomas a la vez y solo diferían para el citoplasma materno heredado de los híbridos dobles ABCD o EFGH.

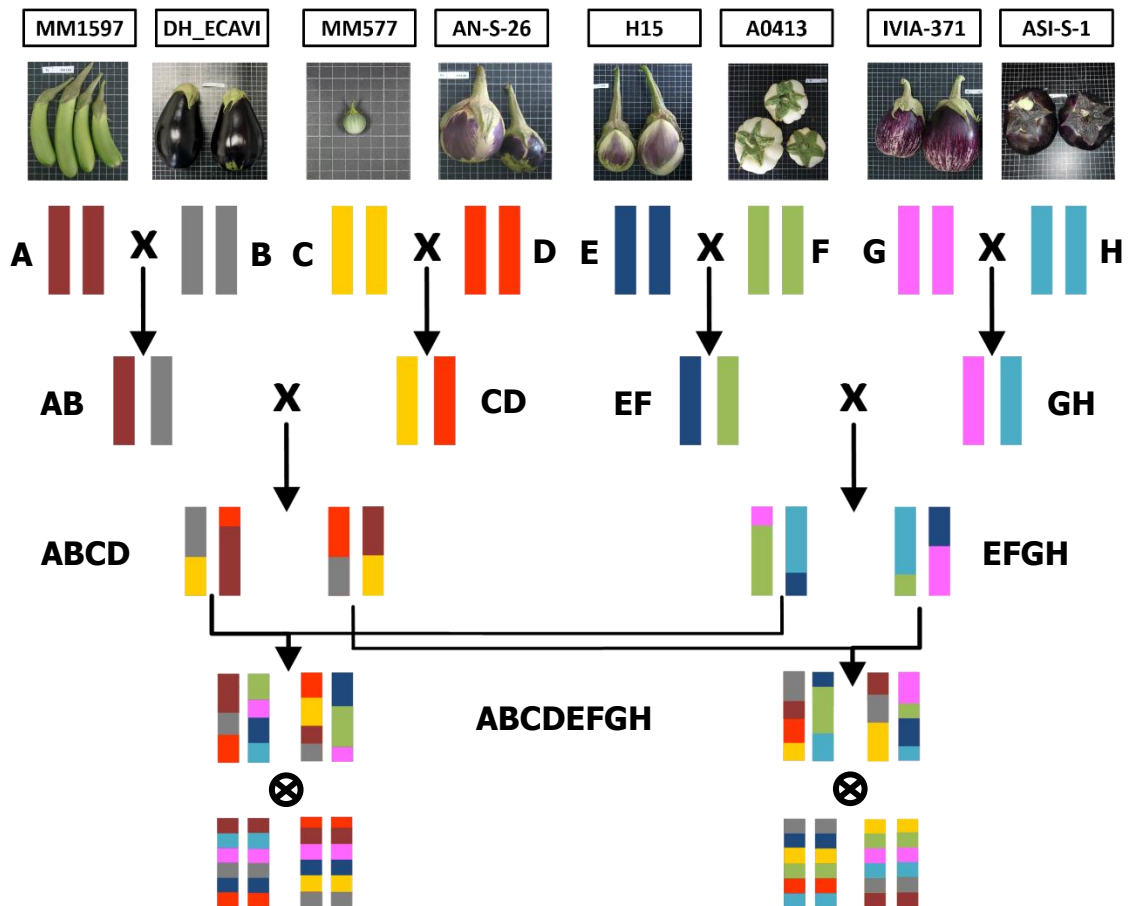


Figura 9. Esquema de obtención de la población MAGIC de berenjena a partir de ocho parentales altamente variables.

3.1.3. Autofecundación

Una vez conseguido el desarrollo de los híbridos cuádruples (S0), el siguiente paso fue la obtención de las líneas segregantes. Para asegurar la continuidad de las líneas S0 y acelerar el proceso de autofecundación, se germinaron 4 plantas para cada una de las 265 combinaciones de híbridos cuádruples, 1.060 plantas S0 en total, seleccionando para la siguiente generación (S1) solo las dos primeras que proporcionaran semilla viable. Del mismo modo, para la posterior obtención de las generaciones S2 y S3 se germinaron dos plantas por cada línea, seleccionando la primera que diera semilla viable.

3.1.4. Recolección de los frutos y extracción de las semillas

La determinación de la madurez fisiológica y el momento ideal para la recolección de los frutos para la extracción de las semillas son aspectos muy importantes en el caso de la berenjena, ya que la madurez comercial no coincide con la madurez fisiológica. Mientras que las berenjenas comerciales se recolectan cuando las semillas aún no están formadas, con un color blanquecino de la pulpa y coloración brillante de la piel; las berenjenas en su estado de madurez fisiológica presentan semillas totalmente formadas, frutos de coloración amarilla, piel tersa y pulpa acorchada (Figura 10). Es este último el momento ideal para la recolección de los frutos.

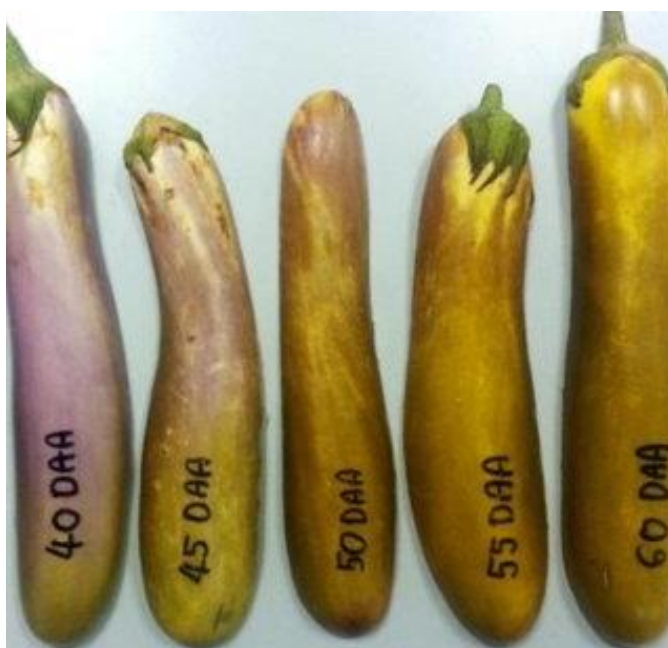


Figura 10. Coloración del fruto de berenjena a diferentes días tras la antesis (DAA). Fuente: Atilia et al., 2013.

La extracción de las semillas de los frutos de berenjena se realiza mediante el uso de una trituradora a baja potencia, añadiendo una pequeña cantidad de agua y habiendo pelado y troceado de los frutos previamente. El resultado de la trituración se deposita en recipientes de plástico y se deja

reposar, ya que la pulpa se separa de las semillas por diferencia de densidad. A continuación, se elimina la pulpa, que queda flotando, y se cuela para recoger únicamente las semillas, que quedan en el fondo del recipiente. Por último, las semillas se depositan sobre papel de filtro y se dejan secar en un lugar seco y ventilado.

3.1.5. Manejo del cultivo

Toda la semilla extraída de los frutos obtenidos como resultado de los cruzamientos dirigidos y las autofecundaciones se germina siguiendo el protocolo de germinación descrito en el Anexo 1 (Ranil et al., 2015), utilizando aproximadamente 20-25 semillas por accesión. Las plántulas germinadas en placa se trasplantan en bandejas semillero de poliestireno y se mantienen en la cámara climática hasta que desarrollan de dos a tres hojas verdaderas. Es entonces cuando se trasplantan a macetas de 1,3 l y se llevan a invernadero.

Durante los meses más fríos, las plantas se mantienen en invernadero bajo condiciones controladas para favorecer un clima más propicio para el cuajado de los frutos. Por el contrario, en los meses más calurosos, aproximadamente de abril a septiembre, las plantas se trasplantan en campo al aire libre. Esto supone un problema para garantizar la autofecundación ya que el porcentaje de alogamia de la berenjena puede llegar a ser de hasta un 30% en cultivo al aire libre y en presencia de insectos polinizadores. Por este motivo, se realiza el embolsado de todas las flores en bolsas de organza, recogiendo únicamente los frutos cuajados en su interior para garantizar que se han producido por autofecundación.

En ambos casos, se implanta un sistema de riego por goteo y se realizan podas frecuentes para eliminar los brotes laterales, manteniendo separadas las plantas entre sí para evitar que se produzcan polinizaciones cruzadas. En cuanto al riego, es importante tener un control minucioso del aporte de agua ya que un exceso de riego favorece el desarrollo de enfermedades y dificulta la fecundación. Cuando la humedad y la temperatura son elevadas se produce

una floración deficiente, caída de flores, frutos deformes y disminución del crecimiento.

Además, se realizan tratamientos de forma regular frente a mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) y araña roja (*Tetranychus urticae*), así como tratamientos esporádicos frente a otras plagas que puedan afectar al cultivo de la berenjena.

3.2. Fenotipado de la generación S3 de la población MAGIC

Se ha llevado a cabo un fenotipado detallado de la tercera generación de autofecundación de la población MAGIC con el objeto de estudiar el modo de acción génica (dominancia, herencia intermedia, recesividad) de los caracteres de interés. Los caracteres tomados son de calidad del fruto objeto del proyecto, dada la diversidad en dichos caracteres en las entradas de partida. Dentro de los caracteres seleccionados para el fenotipado de la población se incluyen caracteres específicos de berenjena como antocianos y clorofila en el fruto, mutación *Puc* (pigmentación debajo del cáliz), forma del fruto, color de la flor y espinosidad de la planta.

3.2.1. Color del fruto de berenjena

Para el fenotipado del color de las berenjenas hay que tener en cuenta que, previamente a la madurez fisiológica, el color de los frutos es altamente variable, encontrando frutos morado oscuro o negros hasta completamente blancos (Figura 11). Los principales pigmentos responsables de estos colores son las antocianinas y las clorofilas, a excepción de los frutos blancos cuya epidermis no presenta pigmentos.



Figura 11. Variabilidad existente en el color de los frutos de berenjena de la generación S3 por la presencia o ausencia de antocianos y clorofila.

El color morado de los frutos se debe principalmente a pigmentos antociánicos localizados en las vacuolas de las células del epicarpio. Un mayor número de capas celulares conteniendo antocianinas implica mayor pigmentación y, por tanto, frutos más oscuros (Daunay et al., 2004). Pero el color de las berenjenas también se ve influenciado por la presencia de clorofilas localizadas en las capas celulares subepidérmicas. En ausencia de antocianinas o en caso de que presenten baja concentración, la pigmentación verde puede observarse en los frutos a simple vista. En presencia de antocianinas es más complicado determinar la presencia o ausencia de clorofilas. Generalmente, la presencia de ambos pigmentos produce un color más oscuro, pero también puede determinarse observando la cicatriz estilar en la parte inferior de los frutos o cortando el fruto y observado el color de la pulpa ya que suele ser verde en presencia de clorofilas y blanco en su ausencia.

Por otro lado, la luz puede influenciar la síntesis de antocianinas ya que es la responsable de activar diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de las mismas (Daunay et al., 2004). Por lo tanto, algunas partes del fruto pueden presentar menor coloración que otras cuando les da la sombra o incluso la producción de antocianinas puede ser completamente nula en zonas que no reciben luz, como debajo del cáliz. Sin embargo, algunos genotipos son capaces

de sintetizar antocianinas bajo el cáliz. Se ha observado que este fenómeno se debe a una mutación denominada *Puc* (pigment under the calyx) (Tigchelaar et al., 1968) (Figura 12). Algunos autores han propuesto que se trata de un gen que controla la síntesis de antocianinas independiente de la luz en el fruto, es decir, permite su biosíntesis en oscuridad (Tatebe, 1939, 1944; Tigchelaar et al., 1968).



Figura 12. Presencia (arriba) o ausencia (debajo) de la mutación *Puc* en frutos de berenjena de la generación S3.

3.2.2. Forma del fruto de berenjena

Dado que existe una gran variedad de formas de los frutos de berenjena, incluso dentro de grupos varietales (Prohens et al., 2005; Muñoz-Falcón et al., 2008), su caracterización detallada es importante para los horticultores y mejoradores. De hecho, las variedades comerciales se clasifican según su forma (Nunome et al., 2001; Daunay, 2008; Marín, 2013).

Como consecuencia de la gran diversidad genética que incluyen las poblaciones MAGIC, en la generación S3 se observan frutos de formas muy variadas (Figura 13).



Figura 13. Variabilidad en la forma de los frutos de berenjena de la generación S3. De izquierda a derecha: achatados o fasciados, redondos, alargados, ovalados.

Concretamente, la forma achatada y fasciada de los frutos es más común en tomate que en berenjena. En tomate, este tipo de frutos aparecieron relativamente pronto en el proceso evolutivo como consecuencia de una mutación que producía cambios en la forma del ovario y el número de carpelos, dando lugar a frutos de mayor tamaño (Lippman and Tanksley, 2001). Por este motivo, estos fenotipos fueron seleccionados por los agricultores durante la domesticación, fijando inconscientemente los alelos responsables. En el caso de la berenjena, también se produjo una evolución en la forma de los frutos durante la domesticación (Wang et al., 2008), sin embargo, no es un carácter que se haya seleccionado en occidente. Tan solo algunas especies del género *Solanum* como *S. macrocarpon* o *S. aethiopicum*, originarias de África, presentan frutos achatados y fasciados.

3.2.3. Color de la flor

La capacidad de las plantas para evolucionar a lo largo de millones de años ha dependido en gran medida del desarrollo constante de nuevos caracteres llamativos. Esto ha llevado a la creación de espléndidos patrones de color de pétalos de las flores (Weiss, 2000). El color de la corola de las flores de berenjena puede presentar tonalidades desde violeta azulado hasta blanco, pasando por violetas cada vez más pálidos (Figura 14). Este color violáceo se produce como consecuencia de la síntesis de antocianinas.



Figura 14. Variabilidad en el color de la flor de berenjena de la generación S3, desde violeta azulado (izquierda) hasta blanco (derecha).

En la mayoría de las plantas, la síntesis de antocianinas en las flores está regulado por el desarrollo vegetativo y su acumulación está estrechamente relacionada con el proceso de expansión celular, coincidiendo con el crecimiento de los pétalos (Martin and Gerats, 1993; Mol et al., 1996). En las primeras etapas del desarrollo, los pétalos de muchas plantas son pálidos o verdes debido a la presencia de clorofila en el tejido, y exhiben una tasa de crecimiento lenta, como resultado principalmente de la división celular (Weiss and Halevy, 1989). La acumulación de antocianinas generalmente ocurre en etapas posteriores del desarrollo de los pétalos, por lo que es importante fenotipar este carácter en planta adulta.

Además, hay que tener en cuenta que la activación de la ruta de antocianinas y la acumulación de este pigmento durante el desarrollo de los pétalos requieren una serie de complejas señales ambientales y de desarrollo (Mol et al., 1996). Varios estudios han demostrado que, con poca intensidad de luz, las plantas desarrollan flores pálidas con un bajo nivel de antocianinas (Biran and Halevy, 1974; Griesbach, 1992). Otros estudios han demostrado que la luz induce la acumulación de antocianinas en tejidos verdes y células en cultivo mediante la activación de genes de la ruta de biosíntesis de las antocianinas (Mol et al., 1996). Por lo tanto, para poder fenotipar de forma correcta dicho carácter es importante que las plantas estén expuestas a un fotoperíodo luz-oscuridad adecuado.

3.2.4. Espinosidad en la planta

La espinosidad de las plantas es uno de los principales caracteres que diferencian la berenjena cultivada de sus parientes silvestres. De hecho, la presencia o ausencia de espinas se ha utilizado tradicionalmente como criterio para agrupar las diferentes especies dentro del género *Solanum* (Linnaeus, 1753; Bohs, 2005).

Se pueden encontrar espinas distribuidas por toda la planta, incluyendo tallo, hojas y cálices de flores y frutos, como método de defensa frente a herbívoros (Doganlar et al., 2002a; Daunay, 2008). A pesar de que los tipos espinosos de berenjena se prefieren en ciertas regiones, como Nagpur (India), por su calidad organoléptica superior, las espinas se consideran generalmente un carácter indeseable (Daunay et al., 2001a). Por este motivo, a lo largo de los años, se ha producido una reducción drástica en el tamaño y la densidad de las espinas, en comparación con las especies silvestres, debido a la selección aplicada por los agricultores para minimizar los daños que se producen en la piel de los frutos durante su manejo y almacenamiento o incluso los daños que puedan causar al personal involucrado en las operaciones de cosecha y poscosecha (Daunay, 2008).

Por lo tanto, la selección durante la domesticación ha dado lugar como resultado a tipos cultivados con menor espinosidad (Doganlar et al., 2002a; Daunay and Hazra, 2012; Page et al., 2019a). Sin embargo, en la actualidad este carácter continúa siendo uno de los principales objetivos de mejora en la berenjena ya que es frecuente la presencia de espinas en el tallo, nerviaciones prominentes de las hojas y cáliz de las flores (Figura 15).



Figura 15. Espinosidad presente en hojas y tallo de plantas de berenjena de la generación S3.

3.3. Estudio sobre el modo de herencia genética

Dadas las distintas hipótesis de genotipo de cada parental y el grado de fijación teórico (87,5%), se han desarrollado las posibles hipótesis de herencia genética para cada uno de los caracteres hasta alcanzar la proporción esperada en la S3.

Cuando existen diferencias evidentes para un carácter entre dos parentales, los fenotipos del híbrido simple nos permiten determinar si el carácter es dominante o recesivo. Por lo tanto, a partir del fenotipo híbrido podemos empezar a formular hipótesis de herencia genética. En todos los casos, en primer lugar, se considera la posibilidad de que los caracteres estén bajo control monogénico. Para poder aceptar o rechazar la hipótesis anterior, se realiza la prueba estadística chi-cuadrado (χ^2_{calc}), por trabajar con variables cualitativas, para verificar si las frecuencias fenotípicas observadas (f_o) son compatibles con las esperadas (f_e).

$$\chi^2_{calc} = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

En este caso, se aceptará la hipótesis nula (H_0) cuando la prueba chi-cuadrado para un grado de libertad, ya que se trabaja con dos variables, y un nivel de significación del 95% sea inferior a 3,8415. Se rechazará H_0 con valores superiores del estadístico y, en esos casos, se estudiará la posibilidad de que los caracteres se encuentren bajo control poligénico, es decir, estén controlados por más de un gen. En este trabajo tan solo se analiza la posibilidad de que se trate de dos genes y no se estudian otros casos por la dificultad de los cálculos. Además, se considera la existencia de epistasis o interacción entre diferentes genes al expresar un determinado carácter fenotípico.

La combinación de los resultados de este análisis de fenotipado y los datos de genotipado futuros que se realizarán mediante la plataforma de genotipado masivo SPET (Single Primer Enrichment Technology), permitirá validar las hipótesis de herencia génica planteadas. De este modo, se dispondrá de gran cantidad de información sobre la herencia de los distintos caracteres de interés estudiados y se podrán confirmar los genes/QTLs asociados.

4. Resultados y discusión

4.1. Desarrollo y fijación de una población MAGIC de berenjena

Siguiendo el esquema de desarrollo de la población MAGIC, se consiguió un total de 265 híbridos cuádruples distintos, que se renombraron líneas S0. Sin embargo, se observó que de todas ellas tan solo 93 procedían del cruce en el que se había utilizado el híbrido doble ABCD como parental femenino. Esto puede ser debido a que en este cruce ha intervenido como parental femenino la especie silvestre *S. incanum* (D). Este cruce interespecífico arrastra el fondo citoplasmático materno del parental silvestre que podría causar una esterilidad parcial de las siguientes generaciones. Se ha observado que estas líneas presentan una mayor dificultad en el cuajado de los frutos, así como en la producción de semilla viable, lo que sugiere una menor viabilidad del polen. Este fenómeno de incompatibilidad se ha observado tanto en la obtención de híbridos cuádruples como en las posteriores generaciones de autofecundación, en las que se ha reducido el número de descendientes.

Siguiendo el método de descendiente de semilla única (SSD) y siendo el objetivo final de la población MAGIC un tamaño aproximado de 400 líneas, para la generación S1 se obtuvieron un total de 450 accesiones, conscientes del riesgo de perder líneas a lo largo del desarrollo de la población. Para la generación S2, tan solo se consiguieron 400 accesiones, por lo que se pretende seguir aumentando su número para garantizar la continuidad de la población MAGIC.

Actualmente, la población se encuentra en la tercera generación de autofecundación (S3) con un tamaño aproximado de 300 líneas de las 400 que se pretende conseguir. Se desea realizar dos ciclos de autofecundación más, alcanzando una S5, con el fin de obtener un mayor grado de fijación de los materiales.

Sin embargo, no solo se dispone de plantas S3 en campo, sino que existe un solape entre varias generaciones a la vez. Por un lado, se sigue aumentando el número de accesiones S2 y, por otro lado, se dispone de unas 180 accesiones S4 e incluso se ha conseguido obtener semilla S5 de unas 50 accesiones aproximadamente.

4.2. Fenotipado de la generación S3 de la población MAGIC

A pesar de no ser completamente homocigota, la generación S3 presenta un elevado grado de fijación, de aproximadamente un 87,5%, por lo que el fenotipado de estos materiales permite diseccionar el control genético de caracteres de interés específicos de berenjena.

De las 300 líneas desarrolladas de la generación S3, un total de 600 plantas aproximadamente ya que se germinan dos plantas por accesión, se han fenotipado los 6 caracteres de interés en 334 plantas. Para cada uno de los caracteres estudiados se han propuesto posibles modelos de herencia genética y en función de los datos de fenotipado se ha comprobado si las frecuencias fenotípicas observadas se aproximan a las esperadas mediante la prueba estadística chi-cuadrado (χ^2).

4.2.1. Color del fruto de berenjena

Según la hipótesis de genotipo de los ocho parentales para la presencia o ausencia de antocianos en los frutos de berenjena y siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 16, se considera que la biosíntesis de antocianinas podría estar controlada por dos genes con epistasia doble recesiva (Tabla 3). Solo en los casos A_B_ se desarrollarán frutos con pigmentos antociánicos, mientras que en el resto de los casos (A_bb; aaB_; aabb) los frutos serán verdes o blancos, es decir, basta con que uno de los locus se encuentre en su forma recesiva para que se produzca el enmascaramiento de la síntesis de antocianinas.

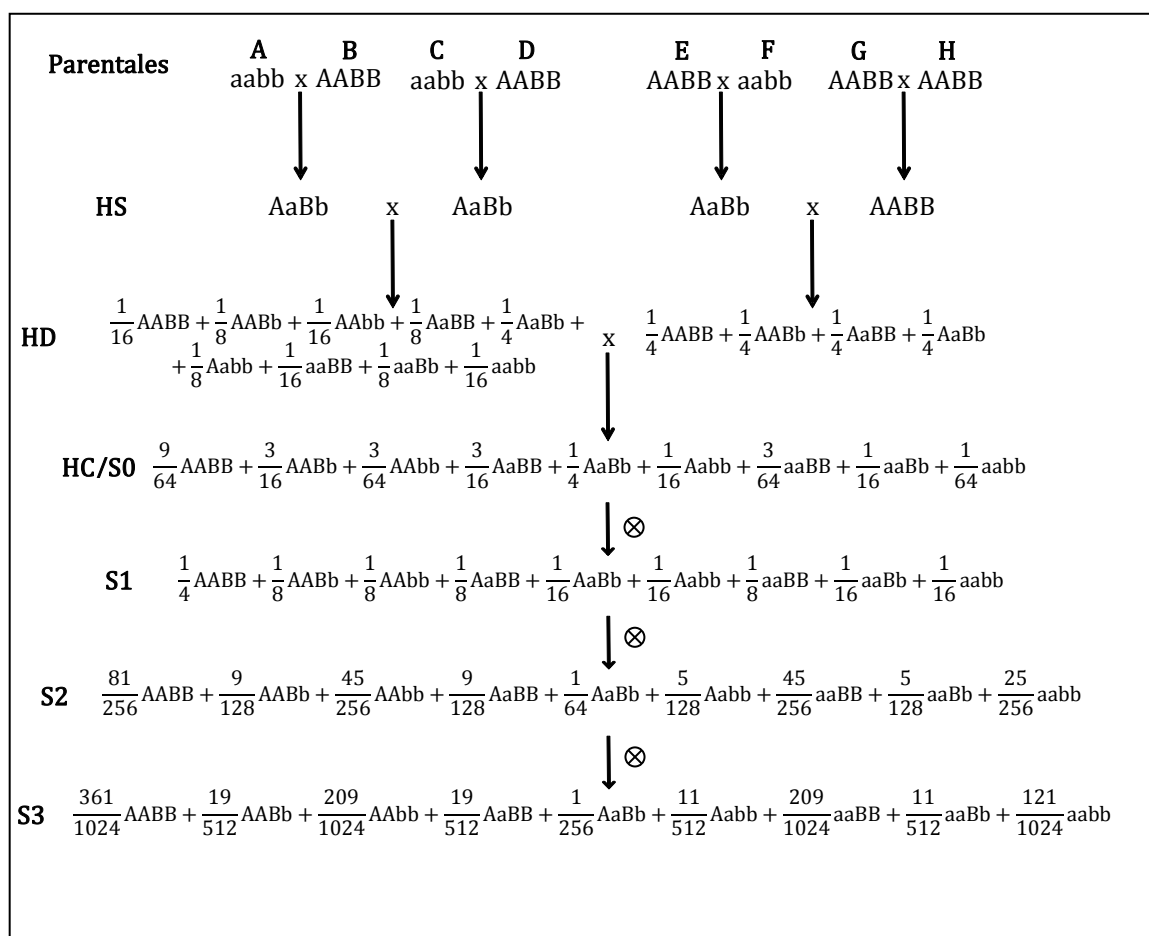


Figura 16. Esquema del modo de herencia genética de los antocianos en los frutos de berenjena en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.

Tabla 3. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de los antocianos en los frutos de berenjena.

	Esperados	Observados
Presencia antocianos	143,84	128
Ausencia antocianos	190,16	206
Prueba χ^2	3,06 < $\chi^2_{1, 0,05}$ (3,84)	
H_0	Dos genes, epistasia doble recesiva	

Tatebe (1939, 1944) estudió las interacciones entre los genes responsables de la pigmentación de los frutos, identificando tres genes independientes (*D*, *P* y *C*) que cooperaban en la síntesis de las antocianinas en el fruto. Se consideraron los genes *D* y *P* como factores dominantes complementarios necesarios para la formación de los pigmentos antociánicos en el fruto y capaces de controlar la distribución de las antocianinas en diferentes partes de la planta. El gen *C* sería capaz de controlar la síntesis de los pigmentos amarillos que aparecen durante la maduración de los frutos. Sin embargo, de este último no se encontraron evidencias genéticas. Del mismo modo, Tigchelaar et al. (1968) propusieron un control oligogénico por tres genes multialélicos complementarios e independientes responsables de la presencia o ausencia de antocianinas en los frutos y en otras partes de la planta.

Dado que el gen *C* no se ha considerado en nuestro estudio, ya que los frutos se han fenotipado en su estado de inmadurez fisiológica, previamente a la aparición de pigmentos amarillos, no existen motivos para rechazar nuestra hipótesis sobre la herencia génica de este carácter.

Estudios más recientes realizados por Daunay et al. (2004) sobre tres progenies diferentes, determinaron que la presencia de antocianinas en la epidermis de los frutos de berenjena está controlada por un único gen dominante. No obstante, en este mismo artículo se considera la posibilidad de haber simplificado los resultados por diferentes motivos como limitaciones en cuanto a las combinaciones de color de los frutos de los parentales iniciales. Por lo tanto, no se considera motivo para rechazar nuestra hipótesis.

En cuanto a la presencia o ausencia de clorofila tanto en la pulpa como en la epidermis de los frutos de berenjena, no se ha encontrado un modelo que se ajuste a los resultados de fenotipado. Estudios realizados sobre el control genético de este carácter consideran que se trata de un único gen dominante (Daunay et al., 2004). Sin embargo, en el mismo estudio algunos de los resultados obtenidos se contradicen y no pueden ser explicados siguiendo este modelo.

De todas las hipótesis testadas, la que más se aproxima a los datos observados es la que considera que el carácter está controlado por dos genes con epistasia doble dominante (Figura 17; Tabla 4). Por lo tanto, tan solo los individuos dobles recesivos presentarán frutos con clorofila y en el resto de los casos ($A_B_;$ $A_bb;$ $aaB_;$) se observará ausencia de clorofila. El fenotipo de los híbridos simples confirma la herencia recesiva de este carácter, ya que el cruzamiento entre un parental que presenta frutos con clorofilas por otro que no las presenta, da lugar a frutos sin clorofila.

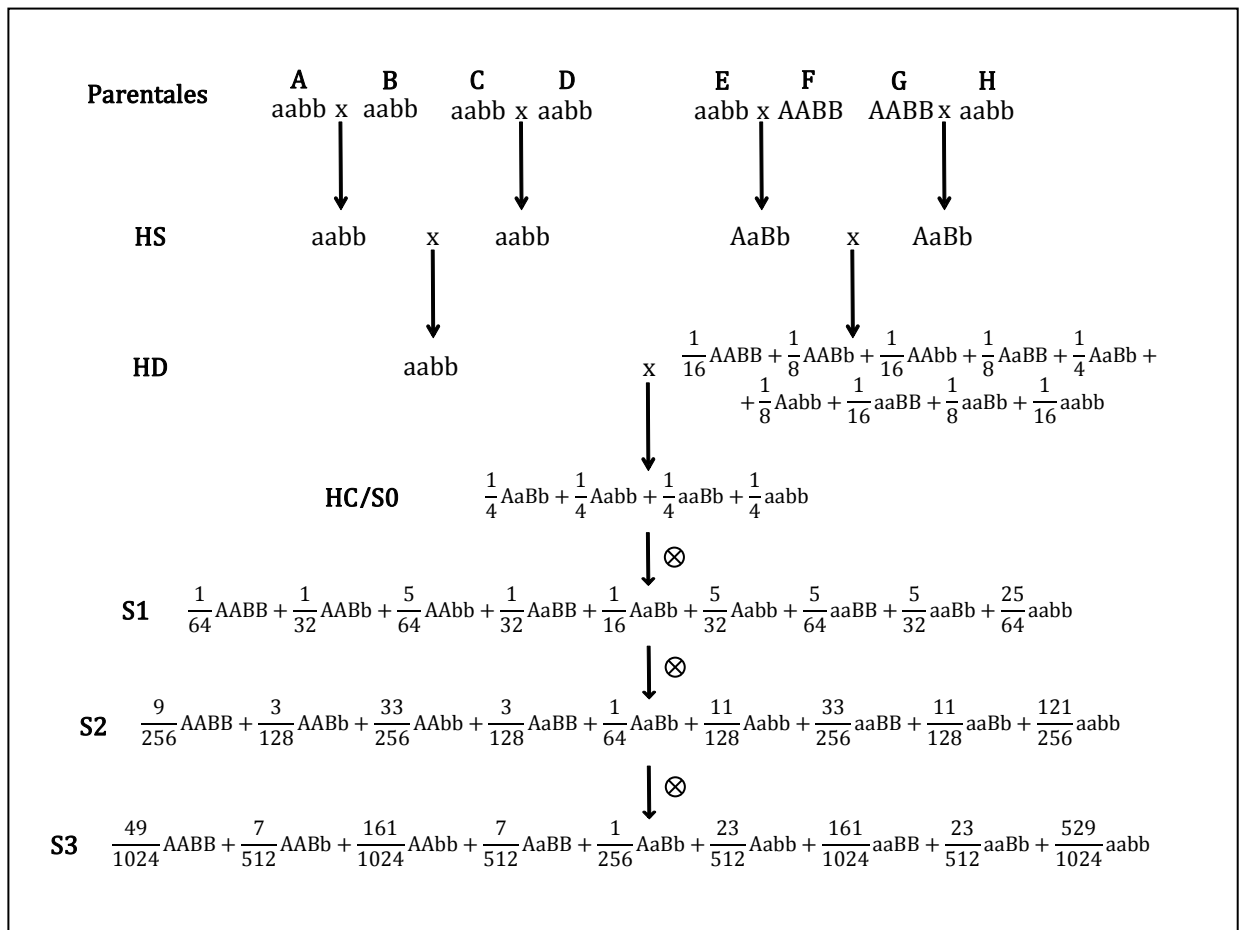


Figura 17. Esquema del modo de herencia genética de la clorofila en los frutos de berenjena en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.

Tabla 4. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de la clorofila en los frutos de berenjena.

	Esperados	Observados
Presencia clorofila	172,55	132
Ausencia clorofila	161,45	202
Prueba χ^2	19,71 > $\chi^2_{1, 0,05}$ (3,84)	
H_0	Dos genes, epistasia doble recesiva	

A pesar de los resultados inconcluyentes sobre la clorofila en los frutos de berenjena, sí se ha observado que los genes responsables de la presencia o ausencia de antocianinas y clorofila son independientes entre sí.

Por otro lado, se ha estudiado el posible control monogénico de la presencia de pigmentación debajo del cáliz o mutación *Puc*. Según Tatebe (1939, 1944) y Tigchelaar et al. (1968), se trata de un único gen dominante que, en presencia de los genes *D* y *P*, controla la síntesis de antocianinas independiente de la luz en el fruto. Por lo que, tanto el homocigoto dominante como el heterocigoto presentarían antocianinas debajo del cáliz, mientras que esta pigmentación estaría ausente en el homocigoto recesivo. Todos estos estudios previos tan solo consideran los frutos con antocianos por lo que, resulta complicado testar esta hipótesis basándonos en los datos de fenotipado de nuestra población MAGIC ya que se desconoce el genotipo de los parentales de frutos blancos y verdes para este carácter. Dado que es independiente la presencia o ausencia de antocianos en el fruto con la presencia de *Puc*, no podemos saber si estos frutos presentan o no dicha mutación. Se han testado ambas hipótesis (Figuras 18 y 19) y en ninguno de los casos se ajustan a los datos observados por lo que resulta complicado llegar a alguna conclusión (Tablas 5 y 6). Con el futuro genotipado de la generación S3 se espera resolver esta duda.

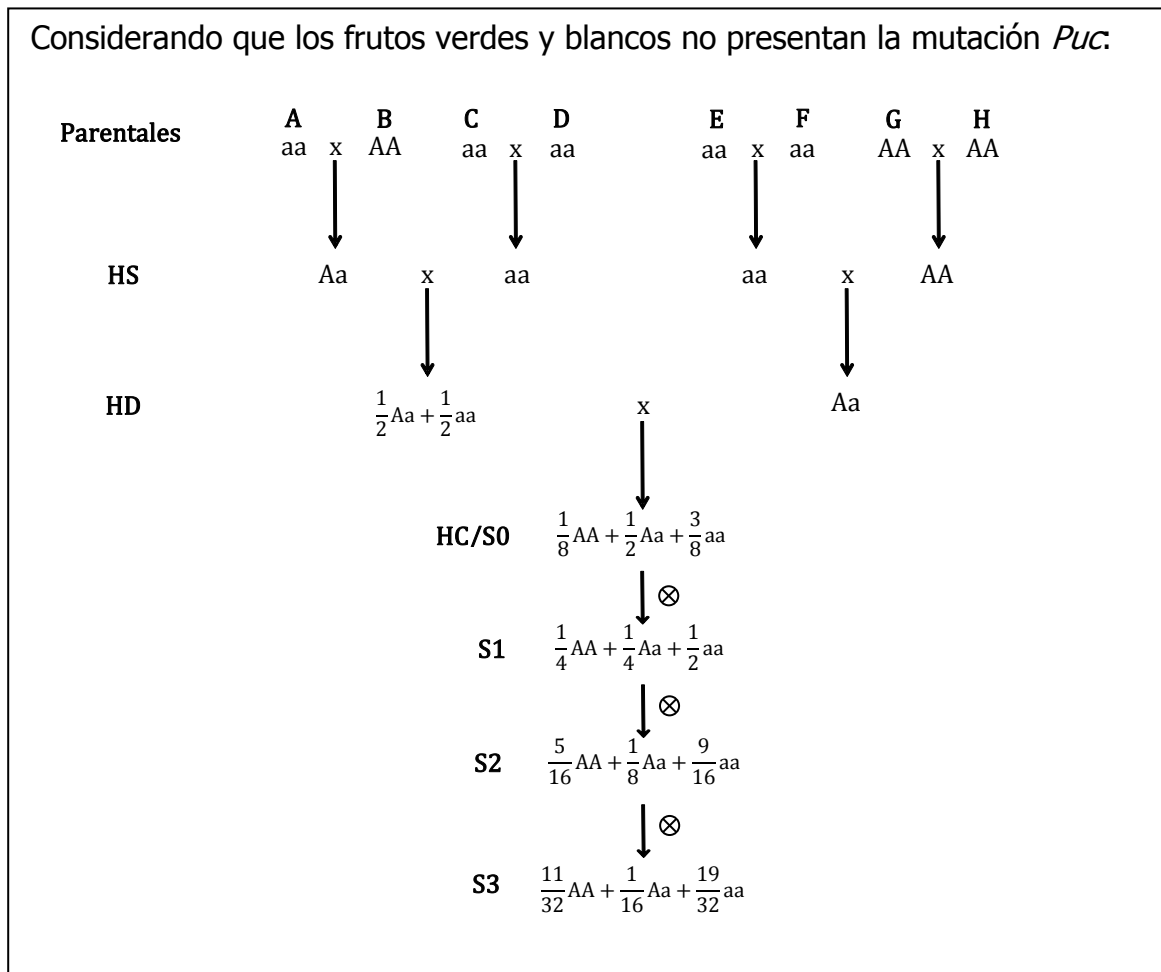


Figura 18. Esquema del modo de herencia genética de la mutación ¹*Puc* en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.

Tabla 5. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (¹H₀) de herencia genética de la mutación *Puc*.

	Esperados	Observados
Presencia <i>Puc</i>	135,69	78
Ausencia <i>Puc</i>	198,31	256
Prueba χ^2	$41,31 > \chi^2_{1, 0,05} (3,84)$	
¹H₀	Un gen dominante	

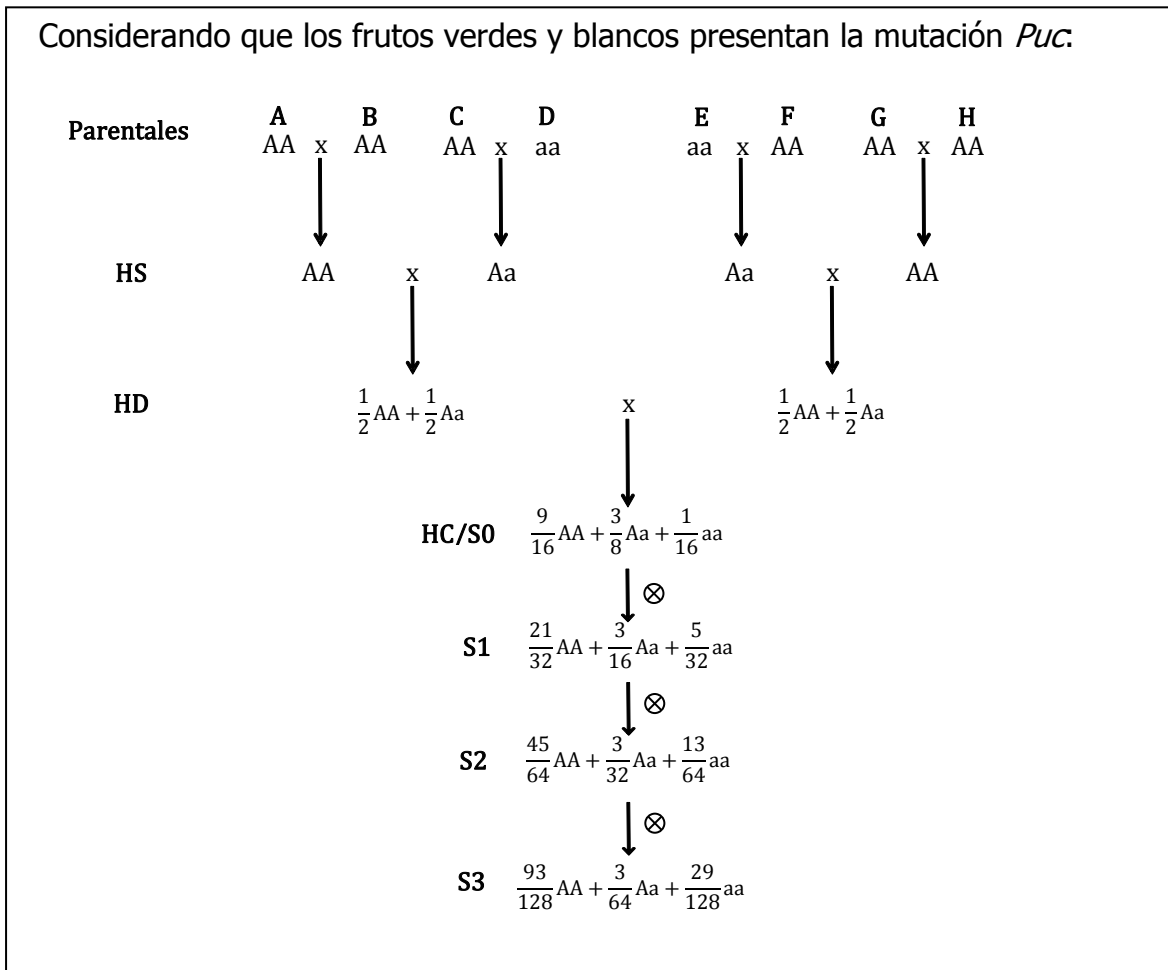


Figura 19. Esquema del modo de herencia genética de la mutación ²*Puc* en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.

Tabla 6. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (²H₀) de herencia genética de la mutación *Puc*.

	Esperados	Observados
Presencia <i>Puc</i>	258,33	78
Ausencia <i>Puc</i>	75,67	256
Prueba χ^2	$555,63 > \chi_{1, 0,05}^2 (3,84)$	
²H₀	Un gen dominante	

Tabla 7. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de la forma fasciada de los frutos de berenjena.

	Esperados	Observados
Fruto fasciado	36,53	40
Otra	297,47	294
Prueba χ^2	0,37 < $\chi^2_{1, 0,05}$ (3,84)	
H_0	Un gen recesivo	

Del mismo modo en tomate, el loci *fasciated*, ubicado en el cromosoma 11, parece ser el responsable de este carácter (Chu et al., 2019). Una inserción de ~6-8 kb en el primer intrón del gen produce como consecuencia frutos con mayor número de carpelos y lóculos, produciendo como resultado un aumento de más del 50% del tamaño del fruto (Cong et al., 2008). Estudios genéticos demuestran que el aumento en el número de carpelos asociado con mutaciones en el loci *fasciated* se comporta de manera recesiva, lo que sugiere que tales mutaciones producen una pérdida de función (Tanksley, 2004).

Estos estudios en tomate concuerdan con la hipótesis planteada en berenjena, por lo que sería interesante estudiar la presencia de locus ortólogos a *fasciated* en el genoma de berenjena. Se ha observado que ambos cultivos exhiben una serie de similitudes en sus síndromes de domesticación, como un aumento en el tamaño de los frutos y una alteración en el color y la forma de los mismos (Chapman, 2019). El mapeo comparativo de loci de caracteres cuantitativos (QTLs) (Doganlar et al., 2002a) y la localización de genes de domesticación ortólogos entre ambos cultivos en un mapa de QTLs (Portis et al., 2014) sugieren que estos caracteres pueden estar controlados, en parte, por el mismo conjunto de genes. En algunos casos, los QTLs de berenjena se superponen con genes de domesticación conocidos del tomate, como por ejemplo QTLs de forma del fruto en los grupos de ligamiento (LG) de berenjena 2, 3, 7, 8 y 12 (Portis et al., 2014). Sin embargo, no se encuentran QTLs relacionados con el número de lóculos en berenjena ortólogos a QTLs conocidos en tomate (Lippman and Tanksley, 2001). Esto puede deberse a que el carácter

esté controlado por distintos loci en cada especie o por la dificultad de determinar el número de lóculos en berenjena, ya que no existe una división clara entre los mismos.

4.2.3. Color de la flor

Teniendo en cuenta que únicamente el parental A (MM1597) presenta flores blancas, la hipótesis que mejor se ajusta a este carácter según los resultados del fenotipado es que dicho carácter está controlado por dos genes con epistasia doble dominante (Figura 21; Tabla 8). Tan solo los individuos dobles recesivos presentarán flor blanca, mientras que en el resto de los casos (A_B_; A_bb; aaB_) las flores serán moradas, es decir, la presencia de al menos un alelo dominante A o B enmascara la expresión del fenotipo blanco.

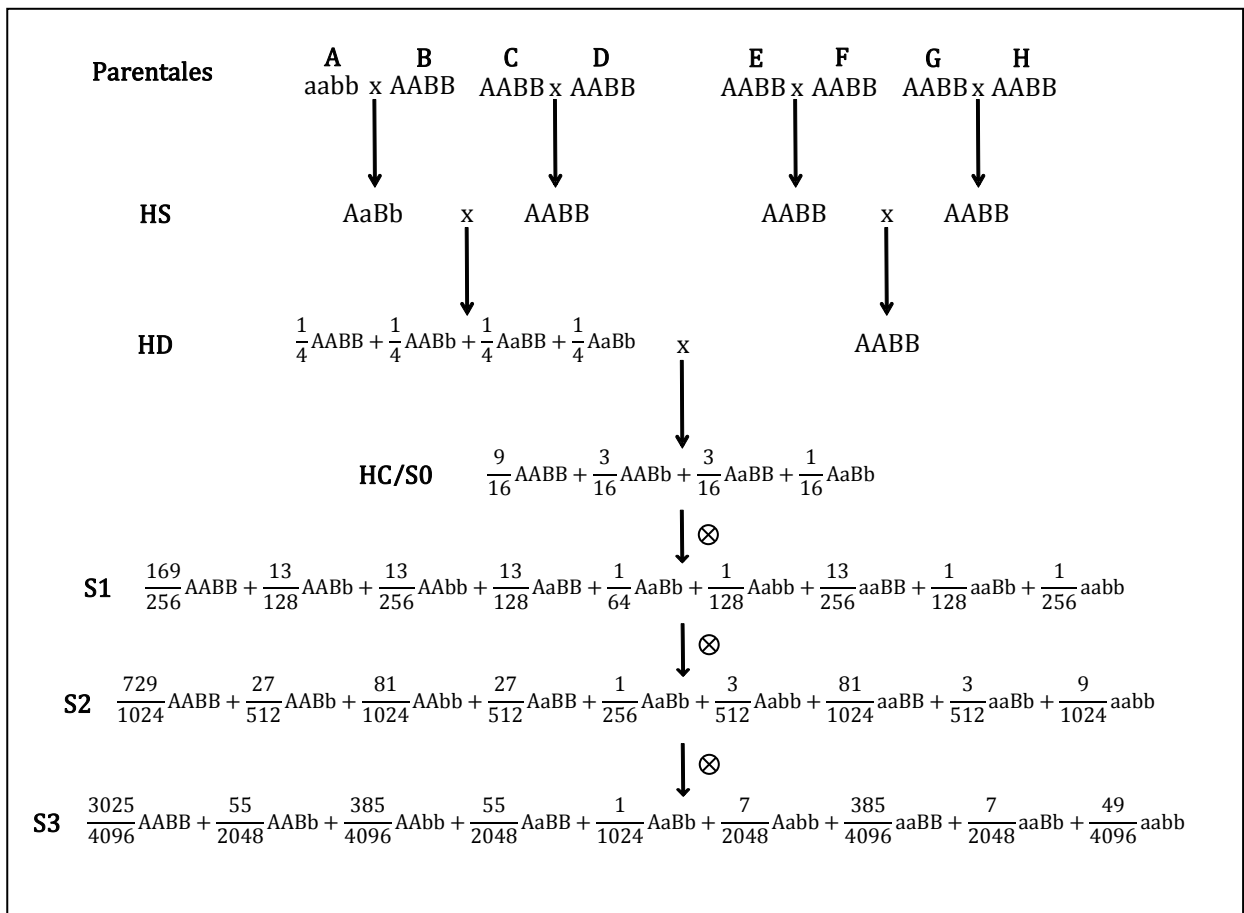


Figura 21. Esquema del modo de herencia genética del color de la flores en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.

Tabla 8. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética del color de las flores.

	Esperados	Observados
Flor blanca	4	7
Flor morada	330	327
Prueba χ^2	$2,28 < \chi_{1, 0,05}^2 (3,84)$	
H_0	Dos genes, epistadia doble dominante	

Del mismo modo que para el color morado de los frutos, los genes *D* y *P* parecen estar involucrados en la pigmentación de la corola de las flores (Tigchelaar et al., 1968). Se considera que también son necesarios para el desarrollo de antocianinas en la corola y otras partes de la planta. Por ello se observa que generalmente la ausencia de antocianinas en la corola se asocia a la inhibición de la síntesis de antocianinas en las demás partes de la planta. Otros estudios confirman que existe una correlación positiva entre la coloración antociánica de las flores y de la epidermis de los frutos, así como de otros tejidos vegetativos (Frary et al., 2014).

4.2.4. Espinosidad en la planta

Una de las características de la domesticación de las berenjenas es el dominio general de los caracteres silvestres sobre los cultivados, como ocurre en el caso de la espinosidad. Se ha observado que cuando se cruzan dos especies no espinosas cultivadas (por ejemplo, *S. melongena* con *S. aethiopicum* o *S. macrocarpon*), el híbrido interespecífico es frecuentemente espinoso (Schaff et al., 1982; Lester, 1986; Prohens et al., 2012).

A pesar de no haber encontrado una hipótesis que se ajuste a nuestros resultados de fenotipado, parece que la mejor aproximación es que la presencia de espinas está controlada por un único gen dominante (Figura 22; Tabla 9). Estudios recientes basados en el cruzamiento de especies silvestres confirman

la herencia monogénica dominante de este carácter (Page et al., 2019a). Además, se ha identificado un QTL relacionado con la ausencia de espinas localizado en la porción distal del LG 6 que explica el 62-79% de la variación (Doganlar et al., 2002a; Frary et al., 2014; Gramazio et al., 2014). No obstante, como la espinosidad es un carácter exclusivo de la berenjena, no se encuentran QTLs ortólogos en otros cultivos de solanáceas como tomate, pimiento o patata, que permitan acotar la región de interés (Doganlar et al., 2002a; Portis et al., 2015).

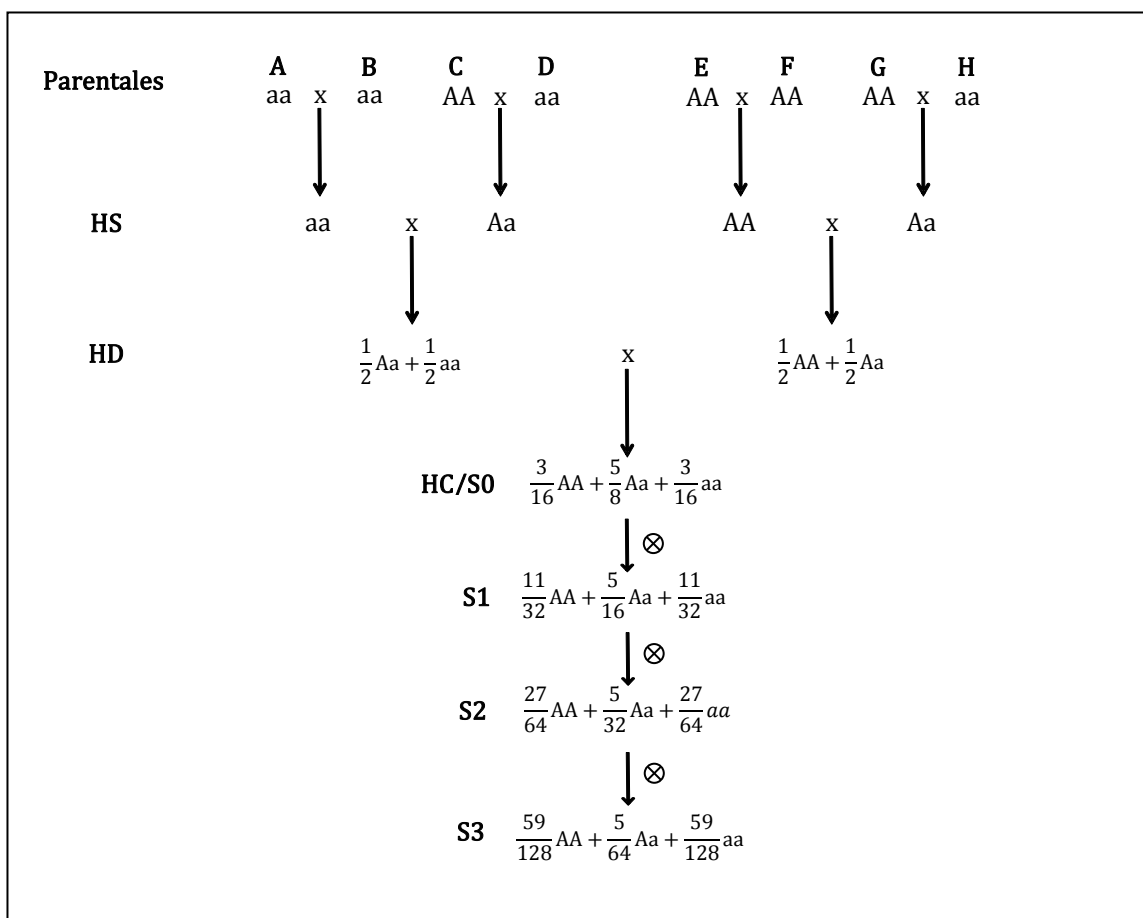


Figura 22. Esquema del modo de herencia genética de la espinosidad en base al genotipo de los parentales de la población MAGIC.

Tabla 9. Prueba chi-cuadrado para la hipótesis nula (H_0) de herencia genética de la espinosidad.

	Esperados	Observados
Presencia de espinas	180,04	213
Ausencia de espinas	153,95	121
Prueba χ^2	13,09 > $\chi^2_{1, 0,05}$ (3,84)	
H_0	Un gen dominante	

4.3. Perspectivas de futuro

4.3.1. Genotipado de la población MAGIC

El genotipado de la tercera generación de autofecundación de la población MAGIC se realizará mediante la plataforma de genotipado masivo SPET (Single Primer Enrichment Technology). La plataforma SPET de berenjena cuenta con un conjunto de 5.093 sondas para detectar polimorfismos y permite además la detección de nuevas variantes alélicas (Barchi et al., 2019a). Esta plataforma ha sido desarrollada dentro del marco del proyecto europeo G2P-SOL por varios grupos internacionales de investigación, entre ellos el grupo investigador que ha dirigido y supervisado este trabajo. En detalle, las 5.000 sondas diseñadas para SPET derivan de marcadores moleculares identificados de la resecuenciación del genoma de los ocho parentales de la población MAGIC (Gramazio et al., 2019). SPET permitirá el genotipado de la población obtenida al termine de los tres ciclos de autofecundación, así como la predicción de haplotipos y la detección de recombinaciones.

4.3.2. Detección de QTLs y genes candidatos implicados en caracteres de calidad del fruto

El término loci de rasgos cuantitativos (QTLs) fue introducido por Geldermann (1975) para describir las regiones del genoma que subyacen a un

rasgo continuo. Para la detección de QTLs se requieren cuatro elementos básicos: una población de plantas que sea genéticamente variable para el fenotipo objetivo del estudio; sistemas marcadores que permitan el genotipado de la población; metodologías de fenotipado cuantitativo reproducible; y finalmente, métodos experimentales y estadísticos apropiados para detectar y localizar QTLs.

Las poblaciones MAGIC permiten el mapeo fino de QTLs ya que la incorporación de múltiples parentales asegura la segregación de numerosos QTLs de distintos caracteres (Cavanagh et al., 2008). Estudios realizados por Valdar et al. (2006) demuestran que una población RIL a partir de ocho parentales con 1.000 descendientes es capaz de mapear a una resolución en el rango de sub-centimorgan. Por este motivo, las poblaciones MAGIC son un recurso ideal para el desarrollo de mapas de alta densidad.

A partir de los datos de fenotipado y genotipado masivo obtenidos de la tercera generación de autofecundación, así como de la información disponible sobre genes candidatos, se procederá a la detección de genes mayores y QTLs y a la integración de los datos procedentes de distintos materiales. Ello nos permitirá tener una información extensa sobre la herencia de los caracteres de calidad del fruto y confirmar los genes/QTLs detectados en la población. También se identificarán aquellas líneas con una mejor combinación genética para caracteres de calidad del fruto.

Con los datos fenotípicos de caracterización obtenidos se estudiará la heredabilidad en cada una de las poblaciones calculando el ratio entre la varianza genética y fenotípica. El mapa genético se construirá utilizando el paquete mpMap de R y se procederá a la detección de QTLs mediante mapeo por intervalos simples (IM) utilizando la función "mpIM" del paquete anterior. Se evaluará la co-segregación de QTLs con genes candidatos para los distintos caracteres objetivo del trabajo. Finalmente, se comparará la localización y efecto de los QTLs obtenidos en varios materiales disponibles para los distintos caracteres estudiados.

5. Conclusiones

- Se ha desarrollado la primera población experimental MAGIC de berenjena, demostrado la elevada variabilidad fenotípica que ofrecen estas poblaciones como resultado de la contribución de los ocho parentales.
- Se ha fenotipado la tercera generación de autofecundación (S3) para determinar la herencia genética de algunos caracteres de interés en la mejora de la berenjena, como el color y la forma de los frutos, así como el color de las flores.
- El genotipado de la generación S3 permitirá validar las hipótesis de herencia genética anteriores y se podrán confirmar los genes/QTLs asociados.

6. Bibliografía

- Acquadro, A.; Barchi, L.; Gramazio, P.; Portis, E.; Vilanova, S.; Comino, C.; Plazas, M.; Prohens, J.; Lanteri, S. 2017. Coding SNPs analysis highlights genetic relationships and evolution pattern in eggplant complexes. *PloS one*, 12: e0180774.
- Atilia, H.; Mohd Shaib, J.; Amyita, U.W.; Zaitialia, M. 2013. Seed vigour of *Solanum melongena* L. To physiological maturity and drying methods. Malaysian Society of Plant Physiology Conference, Terengganu, Malaysia, Volume: 24th MSPPC 2013.
- Aubriot, X.; Daunay, M.C. 2019. Eggplants and Relatives: From Exploring Their Diversity and Phylogenetic Relationships to Conservation Challenges. In *The Eggplant Genome*, Springer, Cham, 91-134.
- Bailey, D.W. 1971. Recombinant-inbred strains: an aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes. *Transplantation*, 11: 325-327.
- Bandillo, N.; Raghavan, C.; Muyco, P.A.; Sevilla, M.A.L.; Lobina, I.T.; Dilla-Ermita, C.J.; Tung, C.W.; McCouch, S.; Thomson, M.; Mauleon, R.; Singh, R.K.; Gregorio, G.; Redona, E.; Leung, H. 2013. Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice*, 6: 11.
- Barchi, L.; Acquadro, A.; Alonso, D.; Aprea, G.; Bassolino, L.; Demurtas, O.C.; Ferrante, P.; Gramazio, P.; Mini, P.; Portis, E.; Scaglione, D.; Toppino, L.; Vilanova, S.; Díez, M.J.; Rotino, G.L.; Lanteri, S.; Prohens, J.; Giuliano, G. 2019a. Single Primer Enrichment Technology (SPET) for high-throughput genotyping in tomato and eggplant germplasm. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1005.
- Barchi, L.; Pietrella, M.; Venturini, L.; Minio, A.; Toppino, L.; Acquadro, A.; Andolfo, G.; Aprea, G.; Avanzato, C.; Bassolino, L.; Comino, C.; Dal Molin, A.; Ferrarini, A.; Maor, L.C.; Portis, E.; Reyes-Chin-Wo, S.; Rinaldi, R.; Sala, T.; Scaglione, D.; Sonawane, P.; Tononi, P.; Almekias-Siegl, E.; Zago, E.; Ercolano, M.R.; Aharoni, A.; Delledonne, M.; Giuliano, G.; Lanteri, S.; Rotino, G.L. 2019b. A chromosome-anchored eggplant genome sequence reveals key events in Solanaceae evolution. *Scientific reports*, 9: 1-13.
- Bhaduri, P.N. 1951. Inter-relationship of non-tuberiferous species of *Solanum* with some consideration on the origin of brinjal (*S. melongena* L.). *The Indian Journal of Horticulture*, 11: 75-82.
- Biran, I.; Halevy, A.H. 1974. Effects of varying light intensities and temperature treatments applied to whole plants, or locally to leaves or flower buds, on growth and pigmentation of 'Baccara' roses. *Physiologia Plantarum*, 31: 175-179.
- Blakeslee, A.F.; Belling, J.; Farnham, M.E.; Bergner, A.D. 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, "Datura Stramonium". *Science*, 55: 646-647.
- Bohs, L. 2005. Major clades in *Solanum* based on ndhF sequence data. *Monographs in Systematic Botany*, 104: 27-49.
- Brim, C.A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Sci*, 6: 220.

- Cantwell, M.; Suslow, T.V. 2009. Eggplant: recommendations for maintaining postharvest quality.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3426-3431.
- Cavanagh, C.; Morell, M.; Mackay, I.; Powell, W. 2008. From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 215–221.
- Cericola, F.; Portis, E.; Toppino, L.; Barchi, L.; Acciarri, N.; Ciriaci, T.; Sala, T.; Rotino, G.L.; Lanteri, S. 2013. The population structure and diversity of eggplant from Asia and the Mediterranean basin. *PLoS ONE*, 8: e73702.
- Chapman, M.A. 2019. Introduction: The Importance of Eggplant. In *The Eggplant*, Springer, Cham, 1-10.
- Chu, Y.H.; Jang, J.C.; Huang, Z.; van der Knaap, E. 2019. Tomato locule number and fruit size controlled by natural alleles of *lc* and *fas*. *Plant direct*, 3: e00142.
- Cong, B.; Barrero, L.S.; Tanksley, S.D. 2008. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature genetics*, 40: 800.
- D'arcy, W.G. 1972. Solanaceae studies II: typification of subdivisions of *Solanum*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 59: 262-278.
- Darvasi, A.; Soller, M. 1995. Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics*, 141: 1199-1207.
- Daunay, M.C. 2008. Eggplant. *Vegetables II*. Springer, New York, NY, 163-220.
- Daunay, M.C.; Hazra, P. 2012. Eggplant. In Peter K.V., Hazra P. (eds.), *Handbook of Vegetables*, Houston, TX: Stadium Press, 257-322.
- Daunay, M.C.; Aubert, S.; Frary, A.; Doganlar, S.; Lester, R.N.; Barendse, G.; van der Weerden, G.; Hennartm J.-W.; Haanstra, J.; Dauphin, F.; Jullian, E. 2004. Eggplant (*Solanum melongena*) fruit color: pigments, measurements and genetics. In *Proceedings of the 12th EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*, 108-116.
- Daunay, M.C.; Lester, R.N.; Ano, G. 2001a. Cultivated eggplants. *Trop Plant Breed*, 200–225.
- Daunay, M.C.; Lester, R.N.; Gebhardt, C.; Hennart, J.W.; Jahn, M.; Frary, A.; Doganlar, S. 2001b. Genetic resources of eggplant (*Solanum melongena* L.) and allied species: a new challenge for molecular geneticists and eggplant breeders. In van den Berg, R.G., Barendse, G.W.M., van der Weerden, G.M., Mariani, C. (eds.). *Solanaceae V. Advances in Taxonomy and Utilization*, Nijmegen University Press, Nijmegen, Países Bajos, 251-274.
- Dempewolf, H.; Eastwood, R.J.; Guarino, L.; Houry, C.K.; Müller, J.V.; Toll, J. 2014. Adapting agriculture to climate change: a global initiative to collect, conserve, and use crop wild relatives. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 38: 369-377.

- Doganlar, S.; Frary, A.; Daunay, M.C.; Lester, R.N.; Tanksley, S.D. 2002a. Conservation of gene function in the Solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics*, 161: 1713-1726.
- Doganlar, S.; Frary, A.; Daunay, M.C.; Lester, R.N.; Tanksley, S.D. 2002b. Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome*, 45: 1189-202.
- Eshed, Y.; Zamir, D. 1995. Introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield associated QTL. *Genetics*, 141: 1147-1162.
- Faostat. 2017. FAO statistical data. <http://faostat.fao.org>.
- Fepex. 2017. Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas. <http://www.fepex.es/inicio.aspx>.
- Frary, A.; Doganlar, S.; Daunay, M.C.; Tanksley, S.D. 2003. QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of solanaceous species. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 359-70.
- Frary, A.; Frary, A.; Daunay, M.C.; Huvenaars, K.; Mank, R.; Doganlar, S. 2014. QTL hotspots in eggplant (*Solanum melongena*) detected with a high resolution map and CIM analysis. *Euphytica*, 197: 211-228.
- Geldermann, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 46: 319-330.
- González, M.A. 2015. Una planta sin clásicos. La berenjena en farmacología medieval y renacentista. *Cuadernos de Filología Clásica. Estudios Latinos*. 33: 1, 119-142.
- González-Lavaut, J.A.; Montes de Oca-Rojas, Y.; Domínguez-Mesa, M.I. 2007. Breve reseña de la especie *Solanum melongena* L. *Revista cubana de plantas medicinales*, 12.
- Goulden, C.H. 1939. Problems in plant selection. In: *Proceedings of the Seventh International Genetics Congress*. Cambridge University Press, 132-133.
- Gramazio, P.; Prohens, J.; Plazas, M.; Andújar, I.; Herraiz, F.J.; Castillo, E.; Knapp, S.; Meyer, R.S.; Vilanova, S. 2014. Location of chlorogenic acid biosynthesis pathway and polyphenol oxidase genes in a new interspecific anchored linkage map of eggplant. *BMC plant biology*, 14: 350.
- Gramazio, P.; Prohens, J.; Plazas, M.; Mangino, G.; Herraiz, F.J.; Vilanova, S. 2017. Development and genetic characterization of advanced backcross materials and an introgression line population of *Solanum incanum* in a *S. melongena* background. *Frontiers in plant science*, 8: 1477.
- Gramazio, P.; Yan, H.; Hasing, T.; Vilanova, S.; Prohens, J.; Bombarely, A. 2019. Whole-genome resequencing of seven eggplant (*Solanum melongena*) and one wild relative (*S. incanum*) accessions provides new insights and breeding tools for eggplant enhancement. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1220.
- Griesbach, R.J. 1992. Correlation of pH and Light Intensity on Flower Color in Potted *Eustoma grandiflorum* Grise. *HortScience*, 27: 817-818.

- Hall, D.; Tegstrom, C.; Ingvarsson, P.K. 2010. Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. *Brief. Funct. Genomics*, 9: 157-165.
- Huang, B.; George, A.; Forrest, K.; Kilian, A.; Hayden, M.; Morell, M.; Cavanagh, C. 2012. A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 826-839.
- Huang, B.E.; Verbyla, K.L.; Verbyla, A.P.; Raghavan, C.; Singh, V.K.; Gaur, P.; Leung, H.; Varshney R.K.; Cavanagh, C. R. 2015. MAGIC populations in crops: current status and future prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 128: 999-1017.
- Illescas, E.S.; Vesperinas, E.S. 1989. *Tratado de horticultura herbacea, hortalizas de flor y de fruto*. No. 635.04/I29.
- Isshiki, S.; Okubo, H.; Fujieda, K. 1994. Phylogeny of eggplant and related *Solanum* species constructed by allozyme variation. *Scientia Horticulturae*, 59: 171-176.
- Johal, G.S.; Balint-Kurti, P.; Weil, C.F. 2008. Mining and harnessing natural variation: a little MAGIC. *Crop science*, 48: 2066-2073.
- Julián, O.; Herráiz, J.; Corella, S.; Di-Lolli, I.; Soler, S.; Díez, M.J.; Pérez-de-Castro, A. 2013. Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: exploitation of resistance to viruses. *Euphytica*, 193: 183-196.
- Kaloo, G. 1993. Eggplant: *Solanum melongena* L. In *Genetic improvement of vegetable crops*. Pergamon, 587-604.
- Karihaloo, J.L.; Brauner, S.; Gottlieb, L.D. 1995. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theor Appl Genet*, 90: 767-770.
- Karihaloo, J.L.; Gottlieb, L.D. 1995. Allozyme variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 578-583.
- Kaushik, P.; Plazas, M.; Prohens, J.; Vilanova, S.; Gramazio, P. 2018. Diallel genetic analysis for multiple traits in eggplant and assessment of genetic distances for predicting hybrids performance. *PloS one*, 13: e0199943.
- Knapp, S.; Aubriot, X.; Prohens, J. 2019. Eggplant (*Solanum melongena* L.): Taxonomy and Relationships. In *The Eggplant Genome*, Springer, Cham, 11-22.
- Knapp, S.; Vorontsova, M.S.; Prohens, J. 2013. Wild relatives of the eggplant (*Solanum melongena* L.: Solanaceae): new understanding of species names in a complex group. *PloS one*, 8: e57039.
- Kover, P.X.; Valdar, W.; Trakalo, J.; Scarcelli, N.; Ehrenreich, I.M.; Purugganan, M.D.; Durrant, C.; Mott, R. 2012. A Multiparent Advanced Generation Inter Cross to Fine-Map Quantitative Traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 5: e1000551.
- Lester, R.N. 1986. Taxonomy of scarlet eggplants, *Solanum aethiopicum* L. In *I International Symposium on Taxonomy of Cultivated Plants*, 182: 125-132.
- Lester, R.N. 1989. Evolution under domestication involving disturbance of genic balance. *Euphytica*, 44: 125-132.

- Lester, R.N.; Hasan, S.M.Z. 1991. Origin and domestication of the brinjal-eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum* in Africa and Asia. In J.G. Hawkes, R.N. Lester, M. Nee, N. Estrada-R (eds.), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 369-387.
- Linnaeus, C. 1753. *Species plantarum*. Salvius, L., Stockholm.
- Lippman, Z.; Tanksley, S.D. 2001. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. *Giant Heirloom*. *Genetics*, 158: 413-422.
- Maluszynski, M.; Kasha, K.J.; Szareiko, I. 2003. Published doubled haploid protocols in plant species. In *Doubled haploid production in crop plants, a manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 309-335.
- Marín, J. 2013. Portagrano. José Marín Rodríguez, El Ejido, Spain.
- Martin, C.; Gerats, T. 1993. Control of pigment biosynthesis genes during petal development. *The Plant Cell*, 5: 1253.
- Meyer, R.S.; Karol, K.G.; Little, D.P.; Nee, M.H.; Litt, A. 2012. Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 685-701.
- Meyer, R.S.; Whitaker, B.D.; Little, D.P.; Wu, S.B.; Kennelly, E.J.; Long, C.L.; Litt, A. 2015. Parallel reductions in phenolic constituents resulting from the domestication of eggplant. *Phytochemistry*, 115: 194-206.
- Milléo, J.; Farago, T.L.; de Souza, J.M.; Barbola, I.D.F.; Castro, J.P. 2011. Entomofauna asociada a flores de berenjena y su papel en la producción de los frutos. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 70.
- Mishra, B.B.; Gautam, S.; Sharma, A. 2013. Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): the factors affecting post-cut browning in eggplant (*S. melongena* L.). *Food Chemistry*, 139: 105-114.
- Mol, J.; Grotewold, E.; Koes, R. 1998. How genes paint flowers and seeds. *trends in plant science*, 3: 212-217.
- Mol, J.; Jenkins, G.; Schäfer, E.; Weiss, D.; Walbot, V. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15: 525-557.
- Monforte, A.J.; Tanksley, S.D. 2000. Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome*, 43: 803-813.
- Morell, P.L.; Buckler, E.S.; Ross-Ibarra, J. 2012. Crop genomics: advances and applications. *Nat Rev Genet*, 13: 85-96.
- Muñoz-Falcón, J.E.; Prohens, J.; Vilanova, S.; Nuez, F. 2008. Characterization, diversity, and relationships of the Spanish striped (Listada) eggplants: a model for the enhancement and protection of local heirlooms. *Euphytica*, 164: 405-419.

- Mutegi, E.; Snow, A.A.; Rajkumar, M.; Pasquet, R.; Ponniah, H.; Daunay, M.C.; Davidar, P. 2015. Genetic diversity and population structure of wild/weedy eggplant (*Solanum insanum*, Solanaceae) in southern India: implications for conservation. *Am J Bot*, 102: 140-148.
- Nuez, F.; Prohens, J.; Valcárcel, J.V.; Fernández de Córdovan, P. 2002. Colección de semillas de berenjena del Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid.
- Nunome, T.; Ishiguro, K.; Yoshida, T.; Hirai, M. 2001. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breeding science*, 51: 19-26.
- Page, A.M.; Daunay, M.C.; Aubriot, X.; Chapman, M.A. 2019a. Domestication of Eggplants: A Phenotypic and Genomic Insight. In *The Eggplant Genome*, Springer, Cham, 193-212.
- Page, A.; Gibson, J.; Meyer, R.S.; Chapman, M.A. 2019b. Eggplant Domestication: Pervasive Gene Flow, Feralization, and Transcriptomic Divergence. *Molecular biology and evolution*, 36: 1359-1372.
- Paran, I.; Goldman, I.; Tanksley, S.D.; Zamir, D. 1995. Recombinante inbred lines for genetic mapping in tomato. *Thoe Appl Genet*, 90: 542-548.
- Pascual, L.; Desplat, N.; Bouchet, J.P.; Desgroux, A.; Bruguier, L.; Chauchard, B.; Verschave, P.; Causse, M. 2014. Deciphering the genetic control of quantitative traits with magic. XVIIIth Eucarpia Meeting, Vegetable section, Tomato Working group - Avignon 2225th April 2014.
- Pascual, L.; Desplat, N.; Huang, B.E.; Desgroux, A.; Bruguier, L.; Bouchet, J.P.; Le, Q.H.; Chauchard, B.; Verschave, P.; Causse, M. 2015. Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant biotechnology journal*, 13: 565-577.
- Pérez-de-Castro, A.M.; Vilanova, S.; Cañizares, J.; Pascual, L.; Blanca, J.M.; Díez, M.J.; Prohens, J.; Picó, B. 2012. Application of genomic tools in plant breeding. *Current Genomics*, 13: 179-195.
- Plazas, M.; Andújar, I.; Vilanova, S.; Hurtado, M.; Gramazio, P.; Herraiz, F.J.; Prohens, J. 2013a. Breeding for chlorogenic acid content in eggplant: interest and prospects. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41: 26-35.
- Plazas, M.; López-Gresa, M.P.; Vilanova, S.; Torres, C.; Hurtado, M.; Gramazio, P.; Andújar, I.; Herraiz, F.J.; Bellés, J.M.; Prohens, J. 2013b. Diversity and relationships in key traits for functional and apparent quality in a collection of eggplant: fruit phenolics content, antioxidant activity, polyphenol oxidase activity, and browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 8871-8879.
- Portis, E.; Barchi, L.; Toppino, L.; Lanteri, S.; Acciarri, N.; Felicioni, N.; Fusari, F.; Barbierato, V.; Cericola F.; Valè, G.; Rotino, G.L. 2014. QTL mapping in eggplant reveals clusters of yield-related loci and orthology with the tomato genome. *PLoS ONE* 9: e89499.

- Portis, E.; Cericola, F.; Barchi, L.; Toppino, L.; Acciarri, N.; Pulcini, L.; Sala, T.; Lanteri, S.; Rotino, G.L. 2015. Association mapping for fruit, plant and leaf morphology traits in eggplant. *PLoS One*, 10: e0135200.
- Prohens, J.; Blanca, J.; Nuez, F. 2005. Morphological and molecular variation in a collection of eggplant from a secondary center of diversity: implications for conservation and breeding. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 54-63.
- Prohens, J.; Gramazio, P.; Plazas, M.; Dempewolf, H.; Kilian, B.; Díez, M.J.; Fita, A.; Herraiz F.J.; Rodríguez-Burruezo, A.; Soler, S.; Knapp, S.; Vilanova, S. 2017. Introgressiomics: a new approach for using crop wild relatives in breeding for adaptation to climate change. *Euphytica*, 213: 158.
- Prohens, J.; Plazas, M.; Raigón, M.D.; Seguí-Simarro, J.M.; Stommel, J.R.; Vilanova, S. 2012. Characterization of interspecific hybrids and first backcross generations from crosses between two cultivated eggplants (*Solanum melongena* and *S. aethiopicum* Kumba group) and implications for eggplant breeding. *Euphytica*, 186: 517-538.
- Prohens, J.; Rodríguez-Burruezo, A.; Raigón, M.D.; Nuez, F. 2007. Total phenolic concentration and browning susceptibility in a collection of different varietal types and hybrids of eggplant: implications for higher nutritional quality and reduced browning. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132: 638-646.
- Ranil, R.H.G.; Niran, H.M.L.; Plazas, M.; Fonseka, R.M.; Fonseka, H.H.; Vilanova, S.; Andújar, I.; Gramazio, P.; Fita, A.; Prohens, J. 2015. Improving seed germination of the eggplant rootstock *Solanum torvum* by testing multiple factors using an orthogonal array design. *Scientia Horticulturae*, 193: 174-181.
- Ranil, R.H.G.; Prohens, J.; Aubriot, X.; Niran, H.M.L.; Plazas, M.; Fonseka, R.M.; Vilanova, S.; Fonseka, H.H.; Gramazio, P.; Knapp, S. 2017. *Solanum insanum* L. (subgenus *Leptostemonum* Bitter, Solanaceae), the neglected wild progenitor of eggplant (*S. melongena* L.): a review of taxonomy, characteristics and uses aimed at its enhancement for improved eggplant breeding. *Genetic resources and crop evolution*, 64: 1707-1722.
- Robinson, R.W.; Shail, J.W.; Yanxin, G. 2001. Interspecific hybridization of eggplant for *Verticillium* wilt resistance and other useful traits. In van den berg, R.G., Barendse, G.W.M., van der Weerden, G.M., Mariani, C. (eds.). *Solanaceae V. Advances in Taxonomy and Utilization*. Pub. Nijmegen University Press, Nijmegen, Países Bajos, 279-291.
- Romano, D.; Leonardi, C. 1993. The responses of tomato and eggplant to different minimum air temperatures. II Symposium on Protected Cultivation of Solanacea in Mild Winter Climates, 366: 57-64.
- Sakata, Y.; Lester, R.N. 1994. Chloroplast DNA diversity in eggplant (*Solanum melongena*) and its related species *S. incanum* and *S. marginatum*. *Euphytica*, 80: 1-4.
- Sawa, T.; Nakao, M.; Akaike, T.; Ono, K.; Maeda, H. 1998. Alkylperoxyl radicalscavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 47: 397-402.

- Schaff, D.A.; Jelenkovic, G.; Boyer, C.D.; Pollack, B.L. 1982. Hybridization and fertility of hybrid derivatives of *Solanum melongena* L. and *Solanum macrocarpon* L. Theoretical and Applied Genetics, 62: 149-153.
- Scorsatto, M.; Pimentel, A.D.C.; Silva, A.J.R.D.; Sabally, K.; Rosa, G.; Oliveira, G.M.M.D. 2017. Assessment of bioactive compounds, physicochemical composition, and in vitro antioxidant activity of eggplant flour. International Journal of Cardiovascular Sciences, 30: 235-242.
- Singh, A.K.; Singh, M.; Singh, R.; Kumar, S.; Kalloo, G. 2006. Genetic diversity within the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. Curr Sci, 90: 711-716.
- Smykal, P.; Nelson, M.N.; Berger, J.D.; von Wettberg, E.J.B. 2018. The impact of genetic changes during crop domestication. Agron-Basel, 8.
- Stommel, J.R.; Whitaker, B.D. 2003. Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128: 704-710.
- Tanksley, S.D. 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. The plant cell, 16: S181-S189.
- Tatebe, T. 1939. On inheritance of color in *Solanum melongena* L. The Japanese Journal of Genetics, 15: 261-271.
- Tatebe, T. 1944. Further studies on inheritance of color in *S. melongena*, Linn. Jpn. J. Genet, 20: 7.
- Tigchelaar, E.C.; Janick, J.; Erickson, H.T. 1968. The genetics of anthocyanin coloration in eggplant (*Solanum melongena* L.). Genetics, 60: 475.
- Tümbilen, Y.; Frary, A.; Daunay, M.C.; Doganlar, S. 2011. Application of EST-SSRs to examine genetic diversity in eggplant and its close relatives. Turk J Biol, 35: 125-136.
- Valdar, W.; Flint, J.; Mott, R. 2006. Simulating the collaborative cross: power of quantitative trait loci detection and mapping resolution in large sets of recombinant inbred strains of mice. Genetics, 172: 1783-1797.
- Vavilov, N.I. 1951. The origin, variation and immunity and breeding of cultivated plants. Chronica Botanica, 13: 1-364.
- Vorontsova, M.S.; Stern, S.; Bohs, L.; Knapp, S. 2013. African spiny *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae): a thorny phylogenetic tangle. Botanical Journal of the Linnean Society, 173: 176-193.
- Wang, J.X.; Gao, T.G.; Knapp, S. 2008. Ancient Chinese literature reveals pathways of eggplant domestication. Annals of botany, 102: 891-897.
- Weiss, D. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. Physiologia plantarum, 110: 152-157.
- Weiss, D.; Halevy, A.H. 1989. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in *Petunia hybrida*. Planta, 179: 89-96.

Weese, T.L.; Bohs, L. 2010. Eggplant origins: out of Africa, into the Orient. *Taxon*, 59: 49-56.

Zamir, D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet*, 2: 983-989.

Zeven, A.C.; Zhukovsky, P.M. 1975. *Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Países Bajos.

7. Anexos

Anexo 1. Protocolo de germinación de semillas

(Ranil et al., 2015)

1. Etapa de desinfección: introducir las semillas durante 5 min en una solución de lejía al 10% (100 μ l de lejía + 900 μ l de agua) y a continuación enjuagar las semillas 3 veces durante 1 min en agua. Por último, dejar en agua durante toda la noche.
2. Transferir las semillas de agua a GA₃ y dejar durante toda la noche.
*Para preparar la disolución GA₃, se disuelven 0,5 g de GA₃ en un vaso de precipitados con una pequeña cantidad de etanol absoluto y, una vez disuelto, se añade agua hasta 1 ml.
3. Añadir algodón + KNO₃ + papel de filtro en placas Petri y colocar las semillas encima del papel. Cubrir las placas con papel de planta e introducir en una estufa a 37 °C durante toda la noche.
*Para preparar la disolución KNO₃, se disuelve 1 g de KNO₃ en un vaso de precipitados con una pequeña cantidad de agua y, una vez disuelto, se añade agua hasta 1 ml.
4. Sacar las placas Petri de la estufa e introducir en una cámara climática con un fotoperiodo de 16 h de luz a 25 °C y 8 h de oscuridad a 18 °C.