

# FENOTIPADO DE LÍNEAS DE INTROGRESIÓN DE *Solanum incanum* EN EL FONDO GENÉTICO DE LA BERENJENA

## PHENOTYPING INTROGRESSION LINES OF *Solanum incanum* IN THE EGGPLANT GENE POOL

Ignacio Antonio Sotomayor Cantos<sup>1</sup>, Pietro Gramazio<sup>2</sup>, Santiago Vilanova Navarro<sup>2</sup>, Mariola Plazas Ávila<sup>2</sup>, Jaime Prohens Tomás<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), EET-P, Km 5 vía Quevedo-El Empalme. C.P. 24 Mocache, Los Ríos, Ecuador.

<sup>2</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Contacto: ignacio.sotomayorc@iniap.gob.ec

### RESUMEN

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es un cultivo con una estrecha base genética. Esto puede deberse a que la domesticación de la berenjena se realizó a partir de un acervo genético limitado, lo cual pudo originar un efecto fundador, que contribuiría a que las variedades de berenjena cultivadas presenten una baja diversidad genética. En la actualidad se está desarrollando una colección de líneas de introgresión de *S. incanum* en el fondo genético de *S. melongena* (MIILs), que junto con estudios de selección asistida por marcadores permitirán dilucidar el control genético e identificar QTLs de caracteres importantes como la forma, tamaño y color del fruto, contenido en antocianinas y polifenoles de la pulpa, la espinosidad, resistencias y tolerancias a estreses bióticos y abióticos. Los objetivos de la presente investigación fueron realizar la caracterización tanto fenotípica como fenomica y la evaluación del contenido en ácido clorogénico de los frutos de la segunda generación de autofecundación para la construcción de las MIILs. La caracterización fenotípica y fenomica realizada mostró una considerable variabilidad en los caracteres evaluados entre las MIILs. La caracterización detallada de la forma del fruto utilizando el programa Tomato Analyzer proporcionó datos cuantitativos sobre muchos caracteres que no se obtienen utilizando descriptores morfológicos medidos manualmente, dichos datos permitieron detectar diferencias entre las MIILs. El estudio del control genético en cuanto a la acumulación de polifenoles, en particular del ácido clorogénico mostró que las MIILs presentaron contenidos muy diferentes entre ellas y algunas superaron claramente los contenidos de los parentales.

**Palabras clave:** Introgresión, fenotipo, fenomica, polifenoles, ácido clorogénico.

### ABSTRACT

Eggplant (*Solanum melongena* L.) is a crop with a narrow genetic base. This may be caused by the fact that the domestication of eggplant was carried out from a limited gene pool, perhaps resulting in a founder effect that contributed to a low-genetic diversity in eggplant varieties. Today, a collection of introgression lines of *S. incanum* in the gene pool of *S. melongena* (MIILs), is being developed, which together with marker-assisted selection studies, will elucidate the genetic control and will identify QTLs of important characteristics such as shape, size and fruit colour, anthocyanin and polyphenol contents of eggplant pulp, thorniness, resistance and tolerance towards biotic and abiotic stresses. The objectives of this research were to conduct a phenotypical and phenomic characterization and evaluation of fruits (from the second generation of self-fertilization for MIILs formation) in chlorogenic acid. The phenotypical and phenomic characterization showed a considerable variability in the evaluated characteristics among MIILs. The detailed characterization of fruit shape, using the Tomato Analyzer software, yielded quantitative data about different characteristics that are not obtained through morphological descriptors measured by hand. Such data made it possible to detect differences among MIILs. The genetic control study, particularly with chlorogenic acid, showed that MIILs had contents that were significantly different, some of them exceeding the contents of parent material.

**Keywords:** Introgression, phenotype, phenomic, polyphenols, chlorogenic acid



Recibido: 05 de septiembre de 2016  
Aceptado: 30 de noviembre de 2016  
ESPAMCIENCIA 7(2): 117-126/2016

## INTRODUCCIÓN

La berenjena común (*Solanum melongena* L.), con número cromosómico de  $2n=24$  y un tamaño de genoma de aproximadamente 956 Mbp (Hirakawa *et al.*, 2014) conocida como ‘eggplant’ en Estados Unidos, ‘aubergine’ en Francia e Inglaterra, ‘melanzana’ en Italia y ‘brinjal’ en la India, es una hortaliza muy importante en los trópicos y subtropicos y es uno de los cultivos que se consideran de mayor relevancia para la seguridad alimentaria (Flower *et al.*, 2013). A nivel mundial la berenjena es el sexto cultivo hortícola por volumen de producción (FAOSTAT, 2014). La producción mundial de berenjena ha aumentado sensiblemente en los últimos 51 años, pasando de 6,05 millones de toneladas en 1963 a 50,19 de toneladas en el 2014. Asimismo, el rendimiento se ha duplicado pasando de 9,75 toneladas/ha. en 1963 a 15 toneladas/ha en el 2014 (FAOSTAT, 2014). El 82% del total de la producción se realiza en el continente asiático siendo solo el 3% lo que se produce en Europa, principalmente en Italia y España, este último país es el mayor exportador a nivel mundial, destinando el 64% de su producción para la exportación, fundamentalmente a la Unión Europea.

Por otro lado, los frutos de la berenjena contienen compuestos fenólicos tanto en la piel como en la pulpa. Los compuestos fenólicos de la piel son principalmente antocianinas, las cuales le confieren el color morado o negro al fruto, aunque representan una fracción mínima de los polifenoles totales. En la pulpa los polifenoles más abundantes son los fenilpropanoides, sobretodo los derivados del ácido hidroxicinámico, los cuales son producidos por conversión del aminoácido fenilalanina a ácido cinámico (Stommel y Whitaker, 2003; Singh *et al.*, 2009).

El ácido clorogénico (5-O-caffeoyl-quinic ácido y sus isómeros; CGA) es el conjugado dominante en la berenjena, constituyendo entre el 70 y el 95% del contenido total en polifenoles (Prohens *et al.*, 2007). Además, presenta múltiples propiedades beneficiosas para la salud humana, como las de ser antioxidante, antiinflamatorio (Dos Santos *et al.*, 2006), cardioprotector (Das *et al.*, 2011) anticarcinogénico (Burgos-Morón y Calderón-Montaño, 2012), antiobesidad (Cho *et al.*, 2010), y anti diabético (Coman *et al.*, 2012). Esto hace que los programas modernos de mejora de este cultivo tengan como uno de sus objetivos la obtención de variedades con alto contenido en polifenoles.

Algunos parientes silvestres, como *S. incanum* con número cromosómico de  $2n=24$ , presentan elevados contenidos en CGA de hasta cinco veces mayor a las variedades modernas (Prohens *et al.*, 2013; Plazas *et al.*, 2014). Por otro lado, la berenjena es un cultivo con una estrecha

base genética (Prohens *et al.*, 2005). 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 efecto fundador, que contribuiría a que las variedades de berenjena cultivada presenten una baja diversidad genética (Vorontsova *et al.*, 2013). Bioversity International incluyó ya en 1977 a la berenjena en la lista de especies prioritarias cuyos recursos genéticos estaban sufriendo erosión genética (Grubben *et al.* 1977).

En las últimas décadas, en la mayoría de los cultivos domesticados se están haciendo grandes esfuerzos para ampliar la diversidad genética en las variedades modernas con la inclusión de variedades locales u obsoletas y de especies silvestres relacionadas en los programas de mejora (Hurtado, 2016). Estas últimas son genéticamente muy variables y pueden representar fuentes de variación de interés para la mejora de la berenjena (Vorontsova *et al.*, 2013; Mutegi *et al.*, 2015). Además, estas especies se encuentran en un amplio rango de condiciones ambientales, por lo que son de interés para caracteres relacionados con adaptación al cambio climático, que es un problema actual de gran preocupación (Dempewolf *et al.*, 2014). Sin embargo, contrariamente a otros importantes cultivos como el tomate, el uso de las especies silvestres en la mejora de la berenjena ha sido muy limitada (Brand-Daunay y Hazra, 2012; Rotino *et al.*, 2014).

Uno de los métodos de mejora utilizado con éxito para la incorporación de genes de interés es el desarrollo de una colección de líneas de introgresión (ILs), que es un conjunto de líneas con un fragmento de genoma de un donante, habitualmente una especie relacionada, en el fondo genético de un receptor. De esta forma, una colección completa de líneas de introgresión reconstituye el genoma del parental donante en segmentos cromosómicos solapantes y además se considera como “inmortal”, ya que se puede propagar por autofecundación. Además, son muy efectivas para la identificación de QTLs, ya que las diferencias fenotípicas entre una línea de introgresión y el parental recurrente se deben únicamente al fragmento introgresado (Eshed y Zamir, 1995; Zamir, 2001). El proceso de obtención consiste en sucesivos retrocruzamientos entre el híbrido, derivado del cruce entre los dos parentales, y el parental recurrente hasta obtener individuos con uno o pocos segmentos cromosómicos introgresados del parental donante. Estos individuos finalmente se autofecundan (autopolinización artificial) hasta conseguir un elevado grado de homocigosis.

En cultivos económicamente importantes, como el tomate o el arroz, las líneas de introgresión han sido muy útiles para la mejora de caracteres de interés agronómico (Lippman *et al.*, 2007). En berenjena todavía no se dispo-

ne de líneas de introgresión, lo cual evidencia el retraso que sufre este cultivo en el aprovechamiento de material de interés y en el estudio de caracteres complejos y poligénico. En la actualidad se está desarrollando una colección de líneas de introgresión de *S. incanum* en el fondo genético de *S. melongena* a las cuales hemos llamado "MIILs". Estas líneas, que están en fase de ser ultimadas, permitirán dilucidar el control genético e identificar QTLs de caracteres tan importantes como la forma, tamaño y color del fruto, el contenido de antocianinas y polifenoles de la pulpa, la espinosidad, resistencias y tolerancias a estreses bióticos y abióticos, etc.

Recientemente, un programa de análisis de imágenes denominado Tomato Analyzer se ha desarrollado para el análisis de la forma del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Gonzalo y Knaap, 2008). Esta herramienta fenomica permite la medición de un gran número de parámetros a través del escaneo de frutos que han sido cortados longitudinalmente. A pesar que fue diseñado originalmente para el análisis morfológico y morfométrico de los frutos de tomate, se ha demostrado la utilidad de estudiar la forma de los frutos de otras especies, como en papaya (*Carica papaya* L.) (Blas *et al.*, 2012). El Tomato Analyzer ha sido utilizado para estudiar la forma de los frutos de una familia interespecífica derivada del cruce entre *S. melongena* y su pariente *S. aethiopicum* L. (Prohens *et al.*, 2012). Esta herramienta también ha sido útil para caracterizar y clasificar de acuerdo a la forma del fruto, una colección de 21 accesiones de berenjena de diferentes grupos varietales (Hurtado *et al.*, 2013). También se ha utilizado el Tomato Analyzer para la caracterización de un total de 21 accesiones de berenjenas españolas, que diferían en la forma del fruto, encontrando una amplia diversidad entre las accesiones, así como entre grupos varietales (Plazas *et al.*, 2013).

El objetivo del trabajo fue realizar la caracterización fenotípica y fenomica, así como la evaluación del contenido en ácido clorogénico de los frutos de la segunda generación de autofecundación para la construcción de líneas de introgresión de *Solanum incanum* en el fondo genético de la berenjena (*Solanum melongena*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación

Las líneas estudiadas fueron sembradas en el año 2014 en los invernaderos del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana en el Campus de Vera de la Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n, Valencia-España, a una temperatura de 25 a 32°C y 28% de humedad relativa.

Sotomayor *et al.*...

### Material vegetal

La población de partida para este estudio se originó del cruzamiento entre *Solanum incanum* MM577, colectada en Israel, que actuó como parental donante y *S. melongena* AN-S-26, una variedad andaluza (España), que actuó como parental recurrente. Para llevar a cabo el desarrollo de las MIILs, durante los cinco ciclos de retrocruzamiento se han venido seleccionado exclusivamente los materiales que presentasen los fragmentos a introgresar en heterocigosis y al mismo tiempo se efectuaba una selección en contra del parental donante (background selection) en el resto de grupos de ligamiento para acelerar la recuperación del fondo del parental receptor. Sucesivamente, cuando más del 98% teórico del fondo del parental receptor había sido recuperado se procedió a dos generaciones de autofecundaciones para fijar en homocigosis hacia el parental donante los fragmentos que se encontraban en heterocigosis (Figura 1).

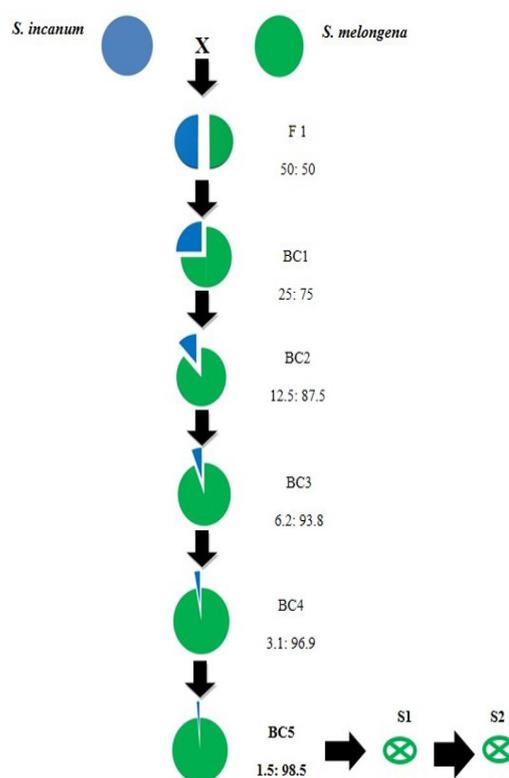


Figura 1. Proceso de cinco generaciones de retrocruzamientos (BC) y dos de autofecundaciones (S) para la obtención de las MIILs.

Al inicio del presente estudio, se disponía de líneas en distintas generaciones de retrocruzamiento. En los casos en el que las líneas de un grupo de ligamiento no se encontraban en la generación BC5, se debía a la pérdida de los fragmentos objetivos a introgresar, lo que obligaba a

volver a una generación anterior. Para el fenotipado las flores y frutos de una población de 62 líneas de introgresión se emplearon descriptores de berenjena EGGNET (Red Europea de Recursos Genéticos de Berenjena) y la herramienta fenómica "Tomato Analyzer" para la caracterización detallada de los frutos (Rodríguez *et al.*, 2010):

**Forma del fruto.** Evaluación visual de la forma de fruto siguiendo los descriptores de berenjena: pera, globular y ahuevado (IBPGR. 1990).

**Color del fruto.** Se evaluó de forma visual el color del fruto, utilizando la siguiente escala: verde claro, verde, verde oscuro, morado claro, morado y negro).

**Presencia de espinas en el cáliz.** (Ausentes, pocas y muchas).

**Peso del fruto (gramos).** Medido con báscula digital, a todos los frutos obtenidos por cada línea caracterizada.

**Número de pétalos de la flor.** Este carácter se evaluó contando el número de pétalos de las flores después de la antesis.

**Color de la flor.** Se evaluó de forma visual el color de la corola de la flor, utilizando la siguiente escala: blanca, violeta claro y muy violeta.

**Tamaño de la flor.** Evaluación visual del tamaño de la flor (pequeña, mediana y grande).

**Caracterización detallada de la forma de fruto utilizando el programa Tomato Analyzer.** Después del registro del peso de los frutos, se les realizó un corte longitudinal y fueron escaneados utilizando un escáner fotográfico Scanjet G4010 HP a una resolución de 300 dpi y se sometieron a análisis morfométrico con el programa Tomato Analyzer versión 3.0. Obteniéndose 20 descriptores de forma automática incluyendo mediciones básicas (6), índice de forma del fruto (2), formación de bloques (3), homogeneidad (3), forma del extremo proximal del fruto (1), forma del extremo terminal del fruto (1), asimetría (3) y excentricidad (1).

### Extracción metanólica de ácido clorogénico

Para guardar muestras de pulpa, una vez pesados y escaneados, los frutos se congelaron en nitrógeno líquido y después en congeladores a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dichas muestras posteriormente fueron liofilizadas en un liofilizador Virtis Genesis (Wizard 2.0) para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se eliminó el agua desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado

líquido. Las muestras, una vez liofilizadas, se trituraron con un molinillo eléctrico. La extracción metanólica del ácido clorogénico se realizó según el protocolo de Helmja *et al.* (2008). Las muestras liofilizadas (0,1 g) se homogeneizaron en 1,5 mL de metanol: agua (80:20, v/v) más 0,1% (w/v) de 2,3-ter-butil-4-hidroxianisol (BHT). El extracto total se agitó en vórtex vigorosamente, se sonicó durante 45 minutos a temperatura ambiente, y después se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos en una centrífuga Eppendorf 5804R. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2  $\mu\text{m}$ . Las soluciones estándar de ácido clorogénico se prepararon usando el mismo protocolo.

### Determinación del contenido en ácido clorogénico

La determinación del contenido en ácido clorogénico se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de acuerdo con el protocolo de Luthria y Mukhopadhyay (2006). Los extractos se analizaron en un sistema HPLC Infinity LC 1220 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Las alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  fueron inyectados con el muestreador automático 1220 Sistema Infinity LC en un ZORBAX Eclipse Plus C18 (3,5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 12,5 mm; Agilent Technologies) protegida por una columna de seguridad ZORBAX Eclipse Plus C18 (5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 12,5 mm ; Agilent Technologies). El método utilizado fue una modificación del descrito por Prohens *et al.* (2013). El gradiente binario consistió en 0,1% de ácido fórmico (disolvente A) y metanol (disolvente B). El gradiente de la fase móvil fue el siguiente: 0 min, 95A: 5B a 0,5 mL/min; aumento lineal desde 0 hasta 5 min a 10% B en 0,5 mL/min; 5-10 min, aumento lineal a 20% B en 0,5 mL/min; 10 a 18 min, los aumentos lineales a 83% B y 0,5 mL/min; 18 a 23 min, aumento lineal de hasta 100% B en 0,5 mL/min; 23 a 27 min, 100% B en 1,0 mL/min; 27 a 30 min, disminuye a 5% de B a 1,0 mL/min; 30 a 40 min, 95A: 5B a 0,5 mL/min. La cuantificación se basa en la absorbancia a 325 nm. La curva de calibración se calculó utilizando un análisis de regresión lineal no ponderado y en condiciones de linealidad se evaluó con el valor de  $r^2$  ( $r^2 > 0,99$ ).

### Análisis de resultados

La información registrada a través de la caracterización convencional como con el programa Tomato Analyzer fueron analizados utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion versión XVI en el cual se efectuaron los cálculos de análisis de la varianza (ANOVA) para determinar la variabilidad de los caracteres entre las MIILs.

Luego se aplicó la prueba de medias de diferencias sig-

nificativas de Student-Newman-Keuls para un intervalo de confianza de 95%, y también se realizó un Análisis de Componentes Principales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización morfológica convencional y fenómica permitió encontrar diferencias claras entre las líneas para los distintos caracteres.

### Forma del fruto

El 52,38% de las líneas presentaron forma de fruto ahuevado, el 36,51% presentaron forma de pera y un 11,11% presentaron frutos globulares (Foto 1). Estos resultados concuerdan con los resultados de Plazas *et al.* (2014), que indican que la recuperación de los rasgos característicos de *S. melongena* se puede lograr en dos o tres generaciones de retrocruzamientos. Por consiguiente, en la quinta generación de retrocruces se ha recuperado en gran porcentaje la forma amelonada del fruto del parental *S. melongena* (P2) y pocas líneas presentaron características similares al parental *S. incanum* (P1), en este caso la forma globular. En este sentido, Portis *et al.* (2014) utilizando una población F2 obtenida por cruzamiento entre 2 líneas de berenjenas (P1=305E40 x P2=67/3) identificaron QTLs asociados a la forma del fruto en los cromosomas 1, 3, 7, 8, 11 y 12. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las líneas seleccionadas para dichos cromosomas presentaron una moderada variabilidad para este carácter.



Foto 1. Formas de fruto que presentaron las MIILs (pera, globular y ahuevado).

### Color del fruto

Este carácter se evaluó de forma visual, cuando los frutos se encontraban en madurez comercial. El color que predominó fue el morado claro en un 62% de las líneas, seguido del color morado en un 23% y un 14,52% tonos de color verde, que iban desde el verde claro, verde y verde oscuro (Foto 2). Cabe recordar, que los parentales utilizados originalmente para el desarrollo de las MIILs *S. incanum* (MM577) y *S. melongena* (ANS26) y el híbrido F1 resultante de este cruzamiento presentan color

de fruto verde, morado y morado claro respectivamente. Por lo cual, se observó que se va recuperando el color de fruto del parental recurrente (*S. melongena*) y que la presencia de antocianos en el fruto es dominante a la falta de pigmentos antociánicos (Doganlar *et al.*, 2002).

Con respecto a este carácter, Toppino *et al.* (2016) identificaron un QTL en el cromosoma 5 involucrado en la producción de antocianos responsable del color del fruto y un segundo QTL identificado en el cromosoma 10. Este último parece ser el mismo QTL identificado previamente por Doganlar *et al.* (2002). Cabe mencionar que estos autores utilizaron parentales diferentes a los utilizados en el presente trabajo. En relación a esto, los resultados concuerdan en cierta parte con dichos autores en la presencia de un QTL ubicado en el cromosoma 10 asociado con el color del fruto. En este cromosoma también se ha descrito la presencia de un factor de transcripción (Sm-MYB1) que tiene un papel fundamental para la activación de la ruta de los pigmentos antociánicos (Zhang *et al.*, 2014). Cabe recordar, que los compuestos fenólicos de la piel del fruto representan una fracción mínima de los polifenoles totales, y que los más abundantes se encuentran en la pulpa y son los que presentan múltiples propiedades beneficiosas para la salud humana (Stommel y Whitaker, 2003).



Foto 2. Escala de tonalidades de colores que presentaron las MIILs: verde claro, verde, verde oscuro, morado claro y morado.

### Presencia de espinas en el cáliz

Los resultados de la evaluación para este carácter mostraron que el 67,7% de las líneas presentaron pocas espinas en el cáliz, un 30,6% no presentaron espinas, y la única línea que se ubicó en el nivel más alto de presencia de espinas fue la línea C6-20 con muchas espinas en el cáliz, esto puede deberse a que las líneas seleccionadas para el cromosoma 6 se encuentran aún en la generación 2 de retrocruzamientos (BC2), lo que podría explicar la presencia de muchas espinas en dicha línea. Los resultados obtenidos también confirman que los alelos de la berenjena cultivada para este carácter son recesivos como han descrito otros autores (Doganlar *et al.*, 2002; Gramazio *et al.*, 2014; Portis *et al.*, 2014) y que un gen principal podría controlar la presencia de espinas en este

cruzamiento interespecífico (Plazas, 2014). De todas maneras, este carácter parece estar influido por el ambiente, por lo cual sería interesante analizarlo en ambientes diferentes.

### Peso del fruto (g)

En general, en casi todas las líneas se ha recuperado el tamaño del fruto del parental *S. melongena* que presentó un peso promedio del fruto de 177,85 gramos. Mientras que según lo publicado por Arce *et al.* (2008) utilizando la misma accesión del parental *S. incanum* del presente trabajo, esta presenta un peso de sus frutos de entre 3,8 y 8 gramos. La media de la colección de MIILs fue de  $239,12 \pm 99,04$  gramos, existiendo frutos desde 67,83 g de la línea C7-2 que presentó el peso más bajo, hasta 690,90 g de la línea C7-1 con el peso del fruto más alto de la colección de MIILs. Hubo cinco líneas que presentaron pesos inferiores a 100 g. En relación a este carácter, estudios actuales de Portis *et al.* (2014), identificaron QTLs asociados al peso del fruto de una población de berenjenas ubicados en los cromosomas 2, 3 y 12. A este respecto los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) y del método de diferencias significativas de Student-Newman-Keuls del peso del fruto de la colección de MIILs, agruparon a las líneas seleccionadas para estos cromosomas en un mismo grupo presentando valores similares de peso entre ellas.

### Color y número de pétalos de las flores

El color de las flores que predominó en la caracterización fue el color violeta claro en un 63% de las MIILs, seguido de los colores muy violeta y blanco con 19 y 18% respectivamente. En general, las MIILs en su mayoría mostraron color de flor violeta claro similar al parental recurrente (*S. melongena*) y pocas mostraron color muy violeta que caracteriza al parental donante (*S. incanum*). Cabe mencionar, que actualmente no se conoce un estudio en berenjena donde se hayan identificado QTLs que estén asociados específicamente al color de los pétalos de las flores, a diferencia de lo mencionado a la acumulación de antocianos responsables del color de la piel del fruto (Cericola *et al.*, 2014).

Por otro lado, en relación al número de pétalos por flor los datos oscilaron de cinco a ocho pétalos, en general la media de la colección de MIILs fue de  $7 \pm 0,71$  pétalos. Cinco líneas presentaron 5 pétalos por flor, característico del P1 (*S. incanum*). El resto de líneas presentaron de seis a siete pétalos por flor, semejante al número que presenta comúnmente el P2 (*S. melongena*).

### Tamaño de flor

El 80,6% de las líneas presentaron tamaño mediano de flor, en un 14,5% presentaron flores grandes y el 4,9% las presentaron pequeñas. Las tres líneas con flores pequeñas pertenecen a las seleccionadas para el cromosoma 6, esto puede deberse a que estas líneas aún se encuentran en la segunda generación de retrocruzamientos. Mientras que las líneas que presentaron las flores más grandes en general fueron las seleccionadas para el cromosoma 1.

### Contenido en ácido clorogénico (CGA)

Los resultados de la determinación del contenido en CGA por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), presentaron una media de  $2,206 \pm 0,69$  mg/g. El parental *S. melongena* (AN-S-26) presentó un contenido en CGA de 2,534 mg/g, mientras que del parental *S. incanum* no se tuvo muestras de carne del fruto en este trabajo, pero en un estudio reciente de Prohens *et al.* (2013) revelaron un contenido de CGA de la accesión MM577 de *S. incanum* de dos a tres veces más que *S. melongena*. Los resultados indican que hubieron seis líneas que superaron claramente al P2 mostrando contenidos superiores a 3 mg/g. Esto sería un aspecto importante a resaltar, ya que se ha incrementado el contenido en CGA en el fondo genético de *S. melongena*, y las líneas con los contenido más altos se podrían cruzar entre ellas de forma que se pueden obtener materiales con un contenido mejorado en dicho carácter de interés nutraceutico.

En un estudio actual, los seis genes implicados en la vía de síntesis de polifenoles y el ácido clorogénico se han localizado en un mapa interespecífico estudiando genes candidatos (Gramazio *et al.*, 2014). Por otra parte, Toppino *et al.* (2016) estudiaron en una población F2 resultante del cruce entre dos líneas de mejora de berenjena, QTLs asociados a propiedades bioquímicas (incluyendo el ácido clorogénico), caracteres morfológicos y fisiológicos en dos localidades diferentes, identificando dos QTLs ubicados en los cromosomas 4 y 6 asociados al contenido en CGA. Analizando esta información con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pudo observar que de las líneas con valores más altos en contenido en ácido clorogénico se encuentran líneas seleccionadas para el cromosoma 3, 4, 6 y 7, que coincide con lo observado por dichos autores. Estudios como los mencionados, junto con trabajos similares al presente, identificación de QTLs, variación y expresión de estos genes ayudarán a dilucidar los factores genéticos claves involucrados en el contenido de ácido clorogénico permitiendo así incrementarlo en la berenjena cultivada.

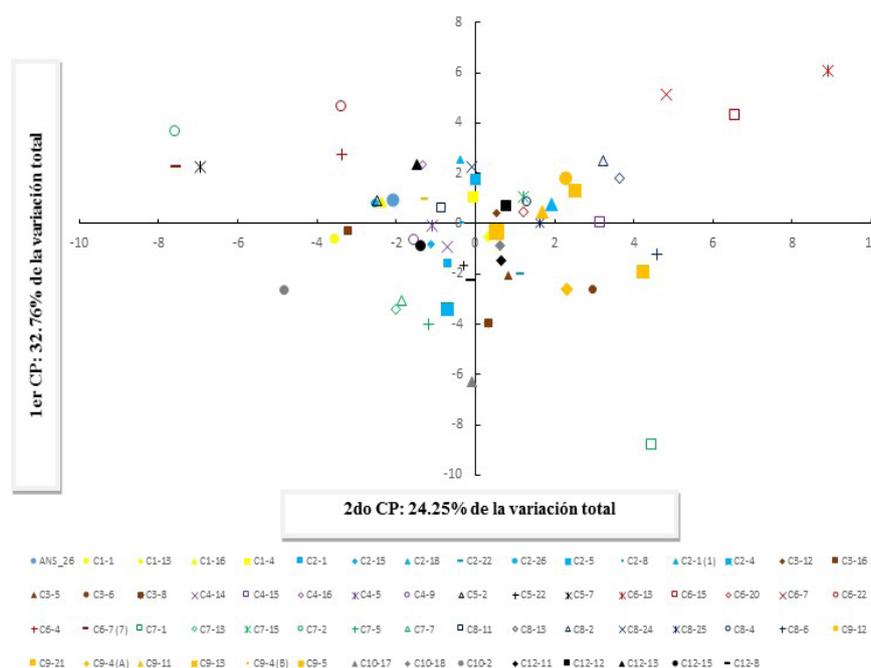
## Análisis de caracteres cuantitativos de la forma del fruto

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) realizados a los 21 caracteres evaluados mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en 20 caracteres de la forma del fruto.

## Análisis multivariante

El primer y segundo componente de ACP representa el 32,75% y el 24,40% de la variación total entre las MIILs.

Se consideraron como relevantes los caracteres con valores de correlación con la primera y segunda componente principal mayores a 0,15. La distribución de las MIILs en un gráfico de ACP de 2 dimensiones muestra que en general, las líneas no se alejan mucho entre sí, tanto en el primer como segundo componente. De las líneas seleccionadas para el cromosoma 7 la C7-1 se separa considerablemente de las demás, esto puede deberse a que de esta línea se obtuvo un único fruto de autofecundación y este fue de gran tamaño (Figura 2).



**Figura 2.** El primer (eje x) y segundo (eje y) componente principal. Diagrama de dispersión de las MIILs basado en 28 caracteres.

Por otro lado, las líneas seleccionadas para el cromosoma 6, presentaron el rango más amplio de variación separándose mucho entre ellas, esto puede atribuirse a que estas líneas se encuentran en la generación dos de retrocruzamiento hacia el parental *S. melongena*, por lo cual aún poseen muchas introgresiones de genes indeseables del parental donante en heterocigosis.

## CONCLUSIONES

La caracterización fenotípica y fenomica hallaron una considerable variabilidad en los caracteres evaluados entre las MIILs. Esto ofrece valiosas oportunidades para la selección en programas de mejora, ya que permitirá

seleccionar aquellas que sean representativas de acuerdo a cada carácter de interés, y la posibilidad de cruzarlas entre sí para aumentar o mejorar dichos caracteres, y posteriormente evaluar su comportamiento en diferentes ambientes.

La disponibilidad de un conjunto de datos fenomicos de la forma del fruto obtenidos con el software Tomato Analyzer representa un avance con respecto a la caracterización manual, y es de gran utilidad para la caracterización de germoplasma y cultivares, así como para la selección en programas de mejora de la berenjena. Proporcionando datos cuantitativos sobre muchos caracteres de la forma del fruto, que no se obtienen utilizando

descriptores morfológicos medidos manualmente. Por ejemplo, en la caracterización convencional respecto a la forma del fruto, estos se agruparon en tres categorías (pera, ahuevado y globular). Mientras que, los resultados obtenidos utilizando el software Tomato Analyzer permitieron observar diferencias entre las MIILs dentro de las categorías mencionadas.

Las MIILs que actualmente se están desarrollando junto con la selección asistida por marcadores (MAS) permitirá en un futuro cercano dilucidar el control genético e identificar QTLs de caracteres importantes como la forma, tamaño y color del fruto, el contenido en antocia-

ninas, la espinosidad, resistencias y tolerancias a estreses bióticos y abióticos.

El mejoramiento para propiedades bioactivas en los vegetales es cada vez más importante en los programas de mejora de cultivos hortícolas. Los resultados del presente estudio en cuanto al contenido en CGA de las MIILs, mostraron que hubo líneas que superaron claramente al parental *S. melongena*. Por lo cual, dichas líneas se podrían cruzar entre ellas de forma que se pueden obtener materiales con un contenido mejorado en dicho carácter de interés nutraceutico.

## LITERATURA CITADA

- Arce, J., J. Prohens y M. Hurtado. 2008. Caracterización de generaciones de una familia interespecífica obtenida a partir del cruzamiento entre berenjena (*Solanum melongena*) y su ancestro silvestre (*S. incanum*). Tesis de Grado. Universitat Politècnica de Valencia. 2008. 124p.
- Blas, A., Q. Yu, O. Veatch, O.J. Paull, R.E. Moore and P.H. Ming. 2012. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. *Molecular breeding*. 29:457-466.
- Brand-Daunay, M. and P. Hazra. 2012. Eggplant. In: Prohens J., F. Nuez (Eds.), *Handbook of Plant breeding: Vegetables II*. Springer, NY, USA, pp163-220.
- Burgos-Morón, E. and J. Calderón-Montaño. 2012. The Coffee Constituent Chlorogenic Acid Induces Cellular DNA Damage and Formation of Topoisomerase I- and II-DNA Complexes in Cells. *Journal of agricultural Food Chemical*. 60: 7384-7391.
- Cericola, F., E. Portis, and S. Lanteri. 2014. Linkage disequilibrium and genome-wide association analysis for anthocyanin pigmentation and fruit color in eggplant. *BMC Genomics*. 15:896.
- Cho, A., S. Jeon and M. Kim. 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical*. 48:937-943.
- Coman, C., O. Rugină and C. Socaciu. 2012. Plants and natural compounds with antidiabetic action. *Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40:314-325.
- Das, S., U. Raychaudhuri, M. Falchi, A. Bertelli, P.C. Braga and D.K. Das. 2011. Cardioprotective properties of raw and cooked eggplant (*Solanum melongena* L). *Food & function*. 2:395-399.
- Dempewolf, H., R. Eastwood and L. Guarino. 2014. Adapting agriculture to climate change: A global initiative to collect, conserve, and use crop wild relatives. *Agroecology and Sustainable Food system*. 38:369-377.
- Doganlar, S., A. Frary, M. Daunay, R. Lester and S. Tanksley. 2002. Conservation of gene function in the Solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics* 161: 1713-1726.
- Dos Santos, M., M. Almeida and N. Lopes. 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Pharmaceutical Bulletin*. 29:79-86.
- Eshed, Y. and D. Zamir. 1995. An 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. 2014. <http://faostat.fao.org/>. Fecha de consulta: 13/12/2016.
- Flower, C., Moore, G. y Hawtin, G., 2013. The International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture.
- Gonzalo M. and E. Van Der Knaap. 2008. A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. *Theoretical and Applied Genetics*. 116:647-656.
- Gramazio P., J. Prohens, M. Plazas, I. Andujar, J. Herraiz, E. Castillo, S. Knapp, R. Meyer and S. Vilanova. 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.
- Grubben, G., H. Tindall and J. Williams. 1977. Tropical vegetables and their genetic resources. AGPE: IBP-GR/77/23, Eds H. D. Tindall and J.T. Williams (Rome: International board Plant Genetic Resources), 43-37.
- Helmja K., M. Vaher and T. Püssa. 2008. Evaluation of antioxidative capability of the tomato (*Solanum lycopersicum*) skin constituents by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*. 29:3980-3988.
- Hirakawa, K., Shirasawa, K. y Miyatake, K., 2014. Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.). The representative solanum species indigenous to the old world. *DNA*.
- Hurtado, M. 2016. Mejora genética de la berenjena (*S. melongena* L.). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 2016. 278p.
- Hurtado M., S. Vilanova, M. Plazas, P. Gramazio, J. Herraiz, I. Andújar and J. Prohens. 2013. Phenomics of fruit shape in eggplant (*Solanum melongena* L.) using Tomato Analyzer software. *Scientia Hort*. 164: 625-632.
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources). 1990. Descriptors for eggplant. International board for plant Genetic Resources, Rome, Italia.
- Lippman, Z., Y. Semel and D. Zamir. 2007. An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current opinion in genetics & development*. 17:545-552.
- Mutegei, E., A. Snow and M. Rajkumar. 2015. Genetic diversity and population structure of wild/weedy eggplant (*Solanum insanum*, Solanaceae) in southern India: Implications for conservation. *Journal of botany*. 102:140-148.
- Plazas, M. 2014. Caracterización y mejora genética de la berenjena (*Solanum melongena*) para compuestos bioactivos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 2014. 311p.
- Plazas, M., I. Andujar, S. Vilanova, M. Hurtado, P. Gramazio; F.J. Herraiz and J. Prohens. 2013. Breeding for chlorogenic acid content in eggplant: interest and prospects. *Notulae Botanicae. Horti Agrobot*. 41(1):26-35.
- Plazas, M., I. Andújar, S. Vilanova P. Gramazio, J. Herraiz and J. Prohens. 2014. Conventional and phenomics characterization provides insight into the diversity and relationships of hypervariable scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) and gboma. *Frontier in Plant*. 5: 318.
- Portis, E., L. Barchi, L. Toppino, S. Lanteri, N. Acciarri, N. Felicioni, F. Fusari, V. Barbierato, F. Cericola, G. Vale and G. Rotino. 2014. QTL mapping in eggplant reveals clusters of yield-related loci and orthology with the tomato genome. *PLoS One* 2014, 9:e89499.
- Prohens, J., J. Blanca and F. Nuez. 2005. Morphological and molecular variation in a collection of eggplants from a secondary center of diversity: Implications for conservation and breeding. *Journal of the American*

Society for Horticultural Science. 130: 54-63.

- Prohens, J., M. Plazas, M.D. Raigón, J.M. Seguí-Simarro, J.R. Stommel and S. Vilanova. 2012. Characterization of interspecific hybrids and first backcross generations from crosses between two cultivated eggplants (*Solanum melongena* and *S. aethiopicum*). *Euphytica*. 186:517-538.
- Prohens, J., A. Rodríguez-Burruezo, M.D. Raigón and F. Nuez. 2007. Total phenolic concentration and browning susceptibility in a collection of different varietal types and hybrids of eggplant: implications for breeding for higher. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132:638-646.
- Prohens, J., B. Whitaker, M. Plazas, S. Vilanova, M. Blasco, P. Gramazio and J.R. Stommel. 2013. Genetic diversity in morphological characters and phenolic acids content resulting from an interspecific cross between eggplant, *Solanum melongena*, and its wild. *Annals of applied*. 162: 242-257.
- Rodríguez, G., J. Moyseenko and M. Robbins. 2010. Tomato Analyzer: a useful software application to collect accurate and detailed morphological and colorimetric data from two-dimensional objects. *J. Visualized Exp.* 37, <http://dx.doi.org/10.3791/1856>.
- Rotino, G., T. Sala and L. Toppino. 2014. Eggplant. *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, Pratap, A., Kumar, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2014; Volume 2, pp.381-409.
- Singh, A., D. Luthria and T. Wilson. 2009. Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*. 114:955-961.
- Stommel, J. and B. Whitaker. 2003. Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset. *Journal Amer Soc Hort Sci*. 128: 704-710.
- Toppino, L., L. Barchi, R. Scalzo, E. Palazzolo, G. Francese, M. Fibiani, A. D'Alessandro, V. Papa, V. Laudicina, L. Sabatino, L. Pulcini, T. Sala, N. Acciarri, E. Portis, S. Lanteri, G. Mennella and G. Rotino. 2016. Mapping Quantitative Trait Loci Affecting Biochemical and Morphological Fruit Properties in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Frontiers in plant Sci*. 7:256.
- Vorontsova, M., S. Stern, L. Bohs and S. Knapp. 2013. African spiny *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae): a thorny phylogenetic tangle. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 173:176-193.
- Zamir, D., 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature reviews genetics*. 2:983-989.
- Zhang, Y., Z. Hu and G. Chu. 2014. Anthocyanin accumulation and molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-associated genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of agricultural. Food Chem*. 62:2906-2912.