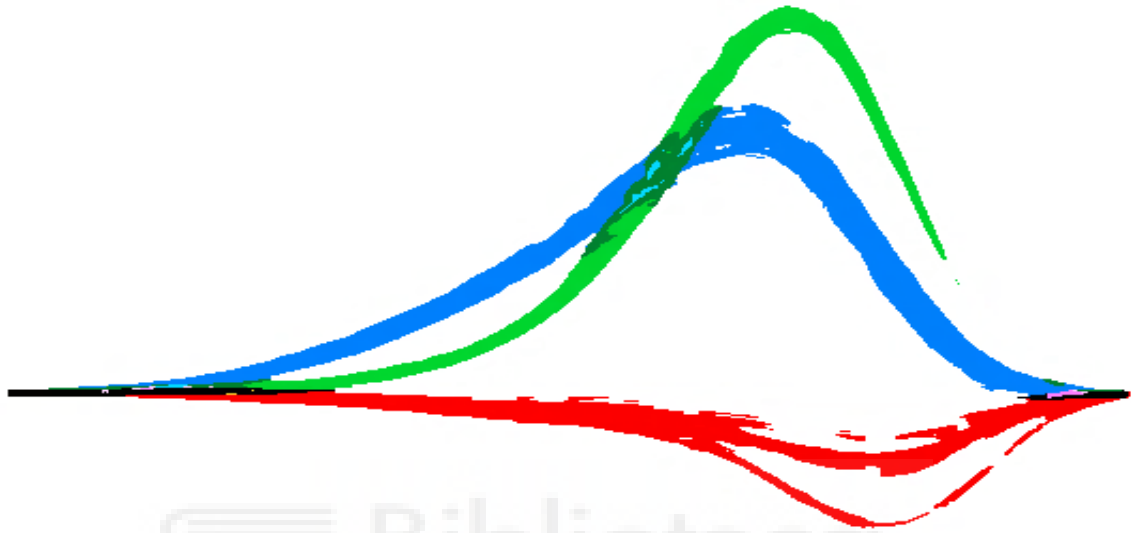




UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías
Agrarias, Agroambientales y Alimentarias



**PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA
DE TOMATE TRADICIONAL UMH:
NUEVAS TÉCNICAS MOLECULARES, REGISTRO
DE LÍNEAS Y AGRICULTURA DE RESILIENCIA**

TESIS DOCTORAL

Pedro Carbonell Cerdá
2021

Director
Juan José Martínez Ruiz
Codirector
Santiago García Martínez



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,
Agroambientales y Alimentarias

**PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA DE
TOMATE TRADICIONAL UMH: NUEVAS
TÉCNICAS MOLECULARES, REGISTRO DE
LÍNEAS Y AGRICULTURA DE RESILIENCIA**

TESIS DOCTORAL

Pedro Carbonell Cerdá

2021

Esta Tesis Doctoral se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., **Carbonell, P.** & Ruiz, J.J. (2016). New breeding lines resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the 'De la pera' tomato type: UMH 1353 and UMH 1354. *HortScience* 51(4):456–458. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.4.456>

García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., **Carbonell, P.**, Salinas, J.F., Cabrera, J.A. & Ruiz, J.J. (2020). UMH1400 and UMH1401: New Cherry Tomato Breeding Lines Resistant to Virus. *HortScience* 55(3):395–396. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14710-19>

Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J.F., García-Martínez, S. & Ruiz, J.J. (2018). Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer resistance from wild types to local landraces— From the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS). *Diversity*, 10 (1), 12. <https://doi.org/10.3390/d10010012>

Carbonell, P., Salinas, J.F., Alonso, A., Grau, A., Cabrera, J.A., García-Martínez, S. & Ruiz, J.J. (2020). Effect of low inputs and salinity on yield and quality – A 3-year study in virus-resistant tomato (*Solanum lycopersicum* L.) breeding lines and hybrids. *Scientia Horticulturae*, 260, 108889. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108889>



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

En Orihuela, a 25 de febrero de 2021.

Esta memoria ha sido presentada por **Pedro Carbonell Cerdá**, Ingeniero Agrónomo y Máster en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo, para la obtención del título de doctor.

PEDRO|
CARBONELL|
CERDA

Firmado digitalmente
por PEDRO|CARBONELL|
CERDA
Fecha: 2021.03.01
18:23:28 +01'00'

D. Pedro Carbonell Cerdá



Esta Tesis Doctoral titulada "**Programa de mejora genética de tomate tradicional UMH: nuevas técnicas moleculares, registro de líneas y agricultura de resiliencia**" ha sido dirigida por el **Dr. Juan José Ruiz Martínez**, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández, y codirigida por el **Dr. Santiago García Martínez**, Profesor Titular e Investigador del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández, los cuales autorizan su presentación bajo la modalidad de tesis por compendio de publicaciones.

JUAN
JOSE|RUIZ|
MARTINEZ

Firmado digitalmente por
JUAN JOSE|RUIZ|
MARTINEZ
Fecha: 2021.02.25
11:54:22 +01'00'

Dr. Juan José Ruiz Martínez

GARCIA
MARTINEZ
SANTIAGO -
48376579N

Firmado digitalmente
por GARCIA MARTINEZ
SANTIAGO
Fecha: 2021.02.25
11:22:42 +01'00'

Dr. Santiago García Martínez



Dr. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada "**Programa de mejora genética de tomate tradicional UMH: nuevas técnicas moleculares, registro de líneas y agricultura de resiliencia**" de la que es autor el Ingeniero agrónomo **Pedro Carbonell Cerdá** ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Juan José Ruiz Martínez (UMH)** y la codirección del **Dr. Santiago García Martínez (UMH)**, actuando como tutora de la misma la Dra. María Ángeles Botella Marrero (UMH). Considero que la tesis es conforme en cuanto a forma y contenido a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA por tanto, es apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a 25 de febrero de dos mil veintiuno.

**JUANA|
FERNANDE
Z|LOPEZ**

Firmado digitalmente
por JUANA|
FERNANDEZ|LOPEZ
Fecha: 2021.02.25
12:27:18 +01'00'

Dra. Juana Fernández López

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores Juan José Ruiz y Santiago García. A Juanjo por alumbrar mi camino durante estos años con su experiencia; cada palabra, cada enseñanza y cada corrección tuyas son un faro en la noche. A Santi por enseñarme tantas cosas y darme la oportunidad de evolucionar, pero sobre todo por estar siempre cerca. Ha sido un auténtico honor estar a vuestro lado en esta experiencia.

Nunca agradeceré lo suficiente el haber estado al lado de Arantxa Alonso antes y durante la Tesis. Es mi referente desde las prácticas de laboratorio de la carrera y lo seguirá siendo siempre. Todo lo que he aprendido estos años lleva tu sello y, aunque no tengas firma oficial en esta Tesis, para mí eres la Directora de Honor. ¡Viva el txacolí!

Guardaré para siempre todos los picnics, las tormentas de ideas locas, los robos de contraseñas y los almuerzos cantineros junto al gran *breeder* Adrián Grau. Aunque no me crea, un (gran) pedazo de mi memoria archiva la información de todas aquellas tardes de enrobine. Algún día triunfarás, y espero que te acuerdes de mí.

Le doy mil gracias a Salinas por acompañarme desde aquellos viajes a horas intempestivas a Mazarrón, y sobre todo por hacer más fácil mi complicada relación con las plantas. Como mínimo, te debo unas cuantas clases de *dolçaina*. A José Ángel, por todos esos menús de cantina a nuestras espaldas, los cafés al Sol y las eternas batallas para ver quién tiene la razón. Gracias también a Javier Vives por mejorar cada día la vida del resto de la tripulación tomatera.

A todos mis amigos *sequiteros* por estar siempre junto a mí y hacer más llevadera la existencia, especialmente al Monxi y al Primo. Tenemos que ponernos las pilas, nuestra empresa requiere de muchos almuerzos para mantenerse operativa, y necesitamos financiar un Birmingham II para la era post-COVID.

A todos los amigos que me rodean del mundo musical, y sobre todo a mis compañeros de Adlibitum. Este año se está haciendo largo sin su compañía y su arte en las calles.

A mis hermanos José Fernando, Álvaro y Miguel, por existir. La vida es más lúcida a vuestro lado, a pesar de todas las dificultades. Esperemos que Serralba nos saque de pobres.

Agradezco especialmente a mis padres, mis abuelos y mi tía Mari Luz su apoyo incondicional, y por todo el cariño y aliento que me habéis dado siempre.

A Lorena, por tantas cosas que necesitaría una tesis entera para escribirlas.



Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al apoyo económico otorgado por el proyecto de investigación AGL2011-26957 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, el Programa Horizonte 2020 de la Unión Europea y la ayuda VALi+D (ACIF/2016/212) concedida por el Programa Operativo del Fondo Social Europeo (FSE) 2014-2020 de la Comunidad Valenciana.

ÍNDICE

ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Importancia económica del tomate	7
1.2. Las variedades tradicionales de tomate	11
1.2.1. La búsqueda del sabor	11
1.2.2. Origen, pérdida y recuperación de las variedades españolas	16
1.2.3. La gran amenaza y la mejora genética como solución	24
1.2.4. La variabilidad genética en las lecciones de tomate	27
1.3. Programa de mejora de variedades tradicionales de tomate EPSO-UMH	29
1.3.1. Caracterización y selección de las variedades tradicionales	33
1.3.2. Cruzamientos y retrocruzamientos	34
1.3.3. Selección asistida por marcadores (SAM)	35
1.3.4. Registro de líneas e híbridos UMH	41
1.3.5. Presente y futuro en el programa: introgresión del gen <i>ty-5</i>	43
1.4. Las líneas de mejora UMH y la agricultura de resiliencia	46
1.5. Efecto de la introducción de genes de especies silvestres relacionadas	47
2. OBJETIVOS	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
4. PUBLICACIONES	61
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	126
6. CONCLUSIONES	141
7. PERSPECTIVAS DE FUTURO	144
8. REFERENCIAS	147

ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

Esta memoria se ha redactado de acuerdo con la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche, bajo la modalidad de **tesis por compendio de publicaciones**. La estructura desarrollada es la siguiente:

- * **Resumen general y abstract**
- * **Introducción:** importancia del cultivo del tomate, descripción e importancia de las variedades tradicionales de tomate, descripción del programa de mejora EPSO-UMH, etc.
- * **Objetivos:** objetivos principales y secundarios de la Tesis Doctoral
- * **Resumen de materiales y métodos**
- * **Artículos científicos publicados:** transcripción literal de los artículos científicos publicados que componen la tesis, organizados según los dos objetivos principales:

Objetivo I: *Contribución al programa de mejora genética de tomate EPSO-UMH*

Contiene los artículos *New breeding lines resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the 'De la pera' tomato type: UMH 1353 and UMH 1354* y *UMH1400 and UMH1401: New Cherry Tomato Breeding Lines Resistant to Virus*, en los que se describen nuevas variedades obtenidas en el programa de mejora, y el artículo *Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer resistance from wild types to local landraces—From the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS)*, que incluye una revisión de las técnicas moleculares utilizadas en el programa de mejora de tomate de la EPSO-UMH desde su inicio.

Objetivo II: *Estudio del comportamiento de líneas de mejora e híbridos UMH con resistencias a virus en condiciones de agricultura de resiliencia*

Compuesto por el artículo *Effect of low inputs and salinity on yield and quality –A 3-year study in virus-resistant tomato (Solanum lycopersicum L.) breeding lines and hybrids*, donde se analiza el comportamiento de diversas líneas de mejora e híbridos Muchamiel y De la pera bajo condiciones de bajos insumos y salinidad moderada.

- * **Resumen de resultados y discusión**
- * **Conclusiones generales de la Tesis**
- * **Perspectivas de futuro**
- * **Referencias bibliográficas**

RESUMEN

Durante las últimas décadas, el sector del tomate en España ha basado su estrategia en la reducción de costes, apoyado en la producción de variedades híbridas modernas de gran rendimiento, pero de escasa calidad. Esto, junto a otros factores, está amenazando la viabilidad de muchas explotaciones al no ser capaces de hacer frente a los costes de producción. Por ello, están surgiendo diferentes iniciativas que buscan recuperar el cultivo de tomate tradicional, el cual alcanza mayores precios en el mercado y suele ser reconocido por su gran calidad. La susceptibilidad de las variedades tradicionales de tomate a diferentes virus ha originado la puesta en marcha de programas de mejora genética públicos, enfocados en introducir genes de resistencia en estas variedades para mejorar las expectativas de los agricultores. Uno de los más longevos es el programa de mejora de tomate de la EPSO-UMH, en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral.

Uno de los objetivos principales de la tesis fue realizar nuevas aportaciones a este programa de mejora. De esta forma, se han registrado oficialmente dos líneas de tipo De la pera y dos de tipo Cherry pera con genes de resistencia a diferentes virus, y características agronómicas y de calidad aceptables. Se han diseñado marcadores moleculares basados en SNPs para el control de los genes *Ty-1* y *ty-5* mediante la técnica HRM. Además, se ha logrado incorporar la técnica HRM al programa para la selección de los genes *Tm-2a*, *Ty-1*, *Sw-5* y *ty-5*, convirtiéndose en nuestra técnica rutinaria de análisis genético, con una eficiencia superior al uso de CAPS. Finalmente, se ha iniciado una nueva fase del programa de mejora orientada a la complementación de la resistencia a TYLCV en líneas de mejora UMH mediante la introgresión del gen *ty-5*, habiéndose realizado los cruzamientos entre los parentales y la selección de los tres primeros retrocruces, mediante el genotipado en HRM y la evaluación fenotípica de los individuos durante cada ciclo.

Por otro lado, consideramos que la investigación debe poner el foco en el desarrollo de una agricultura sostenible y resiliente, que sea capaz de absorber los impactos medioambientales derivados de la necesidad de producir alimento para la creciente población mundial. Como segundo objetivo principal se planteó un estudio de tres años para evaluar las características agronómicas y la calidad de distintas líneas de mejora e híbridos Muchamiel y De la pera UMH cultivados bajo condiciones de bajos insumos y salinidad moderada. Los resultados mostraron una gran estabilidad en el tipo De la pera cultivado en bajos insumos, así como un ligero incremento del contenido de azúcares y la acidez del fruto en todas las líneas e híbridos, sin apenas impacto en el rendimiento. Además, en este ensayo se evaluó el efecto de los genes de resistencia sobre el rendimiento y la calidad, concluyendo que la introgresión del gen *Ty-1* afecta negativamente a varios de los parámetros analizados, tal y como ya se había descrito en trabajos previos.

ABSTRACT

In the last decades, the tomato business in Spain has based its strategy in cost reduction supported by the production of modern hybrid varieties with great yields, but poor quality. This, together with other factors, is threatening the viability of many farms not being able to deal with production costs. In that way, several enterprises are emerging to recover the culture of the traditional tomatoes, which reach higher prices in the market and are usually recognized for its good quality. The susceptibility to virus of the traditional tomatoes has originated the implementation of public breeding programs for introducing resistance genes in these varieties to improve the expectations of farmers. One of the longest is the tomato breeding program of the EPSO-UMH, which represents the framework of current PhD Thesis.

One of the main objectives of the thesis was to perform new contributions to this breeding program. Thus, two De la pera and two Cherry pera breeding lines with resistance genes to different viruses and acceptable agronomic and quality characteristics were officially registered. Molecular markers based on SNPs were design to select the *Ty-1* and *ty-5* genes through the HRM technique. In addition, it was possible to incorporate the HRM technique to the program for genotyping the *Tm-2a*, *Ty-1*, *Sw-5* and *ty-5* genes, becoming our routine genetic technique, with an efficiency higher to CAPS. Finally, a new phase of the breeding program has been developed, which is oriented to the complementation of the TYLCV resistance in UMH breeding lines through the introgression of the *ty-5* gene. Crosses between the elite lines were performed and the three first backcrosses were obtained, doing use of genotyping by means of HRM technique and the phenotypic evaluation of the individuals in every cycle.

On the other hand, we consider essential that research must focus in developing sustainable and resilient agricultural systems, which are able to absorb the environmental impacts derived from the necessity of food production for the growing world population. As second main objective a 3-year study was proposed to evaluate the agronomic and quality characteristics of different Muchamiel and De la pera breeding lines and hybrids grown in low inputs and moderate salinity conditions. Results showed a great stability for De la pera plants grown in low inputs, as well as a light increase in sugar and acidity content of the fruit in all the lines and hybrids, with hardly any impact in yield. In addition, the effect of the resistance genes on yield and quality was evaluated, concluding that *Ty-1* introgression negatively affect to several analysed parameters, as it had described in previous works.

1 INTRODUCCIÓN



1.1. Importancia económica del tomate

El tomate pertenece a la familia de las Solanáceas, siendo conocido como *Solanum lycopersicum* L. (Peralta et al., 2005), tal y como Linneo lo denominó en 1753. Es una especie originaria de la zona sudamericana que incluye Perú, Ecuador, Bolivia, Colombia y el norte de Chile, en la cual habitan numerosas especies silvestres relacionadas. Según Blanca et al. (2015), el proceso de domesticación del tomate se desarrolló en Mesoamérica a partir de alguna especie semi-domesticada procedente de Sudamérica antes de la llegada de los europeos. Tras el descubrimiento de América, el tomate fue llevado a Europa y otras partes del mundo (Nathan & Scobell, 2012). Italia y España fueron los primeros países en introducirlo en su cultura gastronómica, mientras que en el resto del mundo se incorporó más tarde a la dieta.

La dispersión del tomate por todo el globo tuvo un éxito rotundo durante los siguientes siglos y su creciente importancia lo ha convertido en el undécimo cultivo con mayor producción a nivel mundial en la actualidad. En los últimos 20 años, la superficie cultivada de tomate en el mundo se ha incrementado en un 30% hasta situarse en 4,8 millones de hectáreas en 2018, mientras que la producción se ha duplicado alcanzando los 182 millones de toneladas (FAO, 2020). Este aumento espectacular se debe fundamentalmente al desarrollo de la capacidad productora de China, que acumula el 24,3% de la producción mundial de media en el periodo 2014-2018, equivalente a 57 millones de toneladas. Le siguen India y Estados Unidos con un 8 y 5,7% respectivamente, mientras que España se sitúa en octava posición con un 2,1% y casi 5 millones de toneladas (FAO, 2020) (Figura 1).

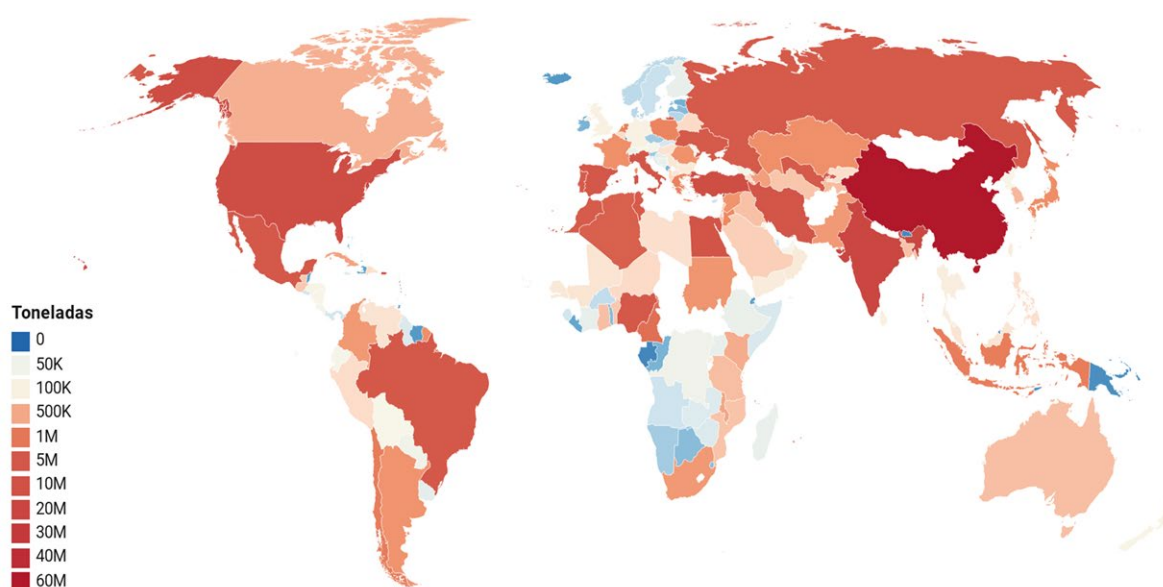


Figura 1. Producción media de tomate en el mundo durante los años 2014-2018 (FAO, 2020).

En España, la mayor parte de superficie dedicada al cultivo de tomate se encuentra en las provincias de la mitad sur. Badajoz es la provincia con mayor superficie con casi 20.000 hectáreas, seguida de Almería (10.000 ha), Sevilla (5.000 ha) y Granada (4.000 ha). A nivel general, la superficie de cultivo se ha mantenido prácticamente estable durante la última década, con valores en torno a 55-60 miles de hectáreas. La producción se ha incrementado sensiblemente, sobre todo en los últimos cinco años, alcanzando los 4,8 millones de toneladas en 2018. El rendimiento del cultivo también ha mejorado en un 10% aproximadamente desde 2007. Por otro lado, el precio por kilogramo percibido por el agricultor disminuyó en 2011, seguramente afectado por la crisis económica, y se mantenido estable hasta 2018. Este año, el agricultor vendió el kilogramo de tomate un 20% más barato que en 2007. Sin embargo, el valor total de la producción se ha recuperado debido al aumento del rendimiento, probablemente gracias al uso de variedades más productivas y la mejora del regadío y las técnicas de cultivo (Figura 2).

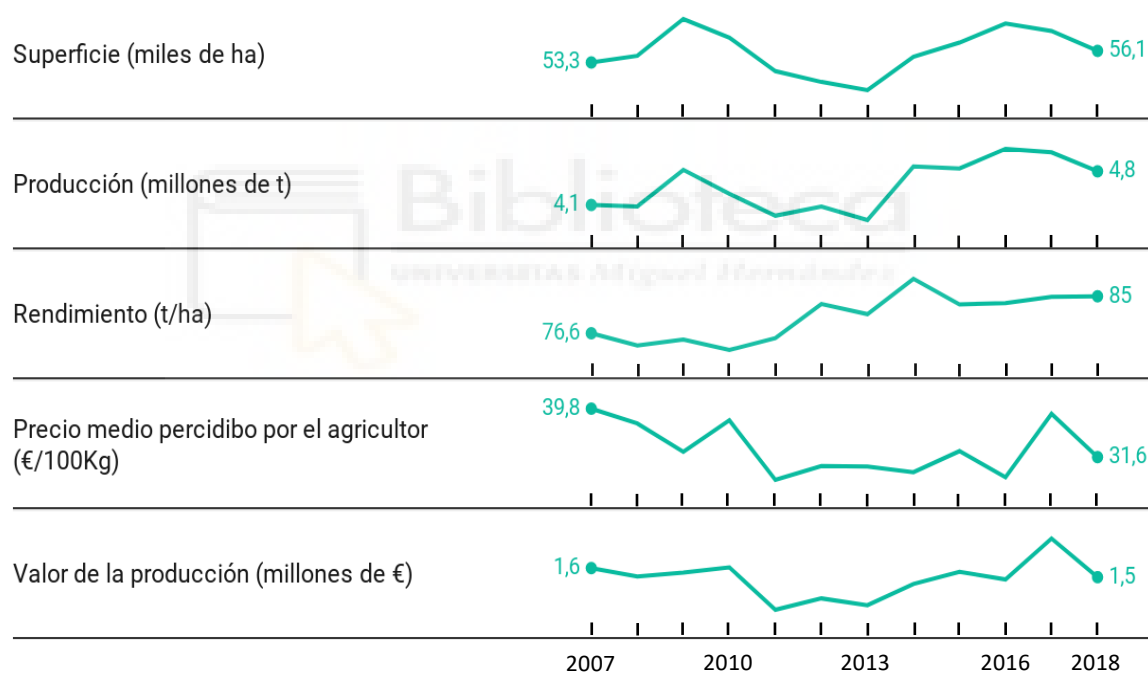


Figura 2. Datos estadísticos en España para tomate durante el periodo 2007-2018 (MAPA, s. f.)

Existen varias razones para explicar el estancamiento y reducción del precio percibido por el agricultor por el kilogramo de tomates. Por una parte, el sector del tomate en España ha basado su estrategia en la reducción del precio de venta apoyado en la producción de grandes cantidades de tomate híbrido moderno, de gran rendimiento y fruto de larga vida, pero de escasa calidad. De esta forma, el desarrollo de acuerdos comerciales de la UE con países del entorno para la importación de productos vegetales, reduce la posibilidad de competir en un mercado saturado de productos

de bajo precio y calidad (Capobianco-Uriarte et al., 2017). Además, encontramos la dificultad que tienen los productores para invertir en proyectos de innovación y marketing que ayuden a generar valor añadido (Pérez Mesa, 2009). Por último, la gran atomización que prevalece en el campo español no permite el impulso de fuerzas productivas que concentren esfuerzos frente a las grandes distribuidoras y comercializadoras (Pérez Mesa, 2009). Todo ello imposibilita la mejora de los precios en origen y hace peligrar la viabilidad de muchas pequeñas y medianas explotaciones.

En la Comunidad Valenciana, el grueso de la superficie y la producción de tomate se encuentra repartido entre las provincias de Alicante y Castellón. Sin embargo, la estructura en la forma de cultivo es muy diferente entre las dos, ya que en Alicante se produce mayoritariamente en invernadero, mientras que el cultivo en Castellón es fundamentalmente al aire libre (Figura 3a). El cultivo en invernadero suele asociarse a una agricultura intensiva, con mayores rendimientos y beneficios debido a un manejo altamente tecnificado y a la exportación del producto. Aunque cabría pensar este tipo de agricultura está aumentando en la Comunidad Valenciana, lo cierto es que la tendencia en los últimos años es justo la contraria. Al observar los datos de superficie de cultivo, vemos que en 2015 subió un 15% la superficie al aire libre, mientras que el cultivo protegido ha ido paulatinamente perdiendo importancia desde 2006. De esta forma, la superficie de tomate al aire libre en 2018 alcanzó las 724 ha mientras que la superficie de invernadero fue de 480, invirtiéndose la estructura que existía en 2006-2007 (Figura 3b).

La producción de tomate en la Comunidad Valenciana descendió de 110 a 76 miles de toneladas en 10 años. Las tres provincias han perdido en torno al 30% de su producción con respecto a los años anteriores a la crisis económica de 2008. Incluso Alicante, que es la provincia con mayor peso en el cultivo de tomate con más de 72.000 toneladas producidas durante los años 2006-2008 (el 65% de la producción en la comunidad), ha ido perdiendo fuerza hasta situarse en poco más de 50.000 toneladas en 2018. Esta notable reducción de la producción se puede asociar a la disminución en la superficie dedicada al cultivo en invernadero, lo cual sugiere que la producción intensiva ya no es tan rentable para muchos productores (Figura 3c).

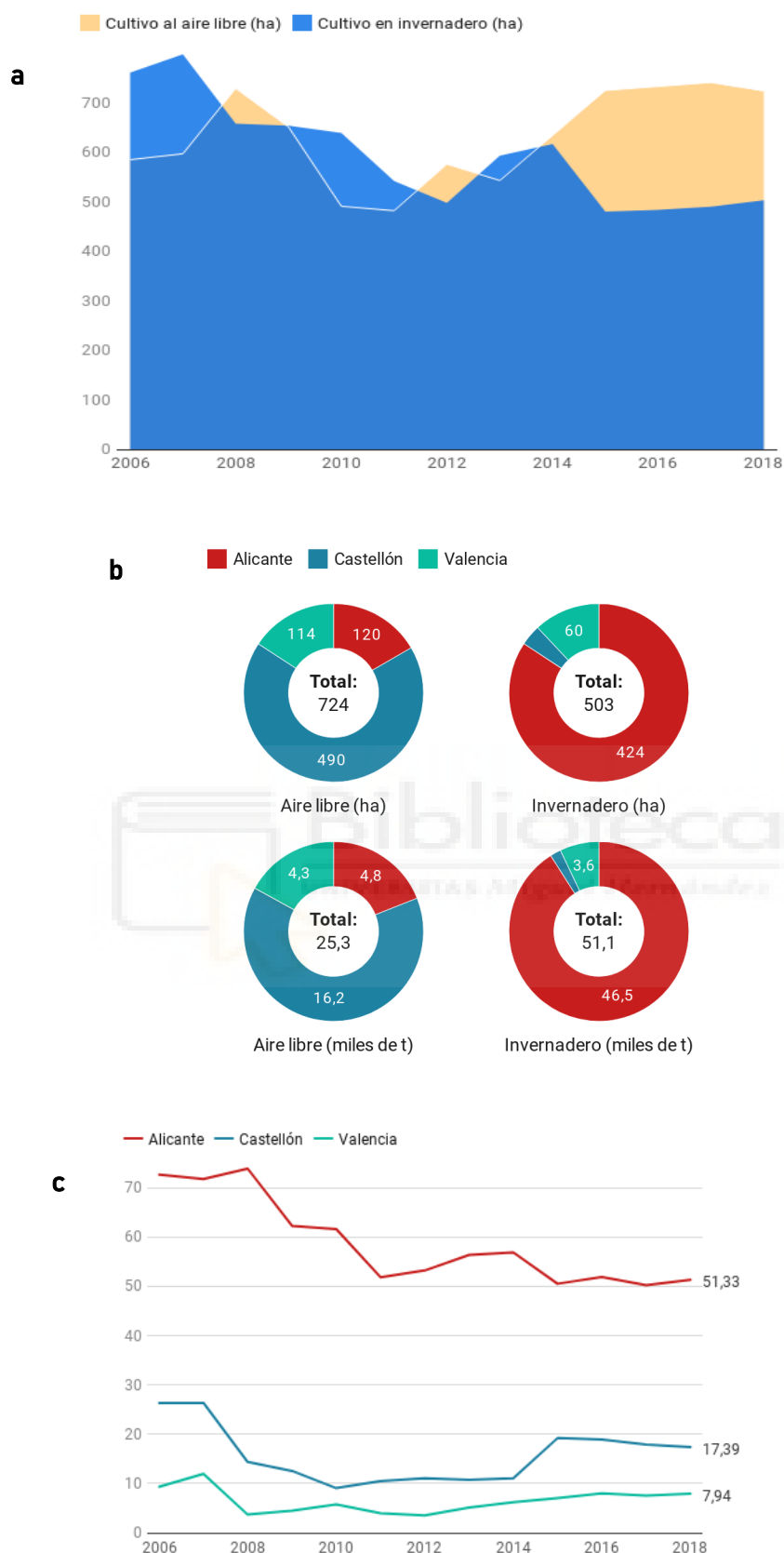


Figura 3. Datos estadísticos correspondientes a la Comunidad Valenciana en tomate: **(a)** superficie según el sistema de cultivo durante 2006-2018, **(b)** superficie (ha) y producción (miles de t) en 2018 según el sistema de cultivo y por provincias y **(c)** producción (miles de t) durante 2006-2018 por provincias (MAPA, s. f.).

1.2. Las variedades tradicionales de tomate

1.2.1. La búsqueda del sabor

Harlan (1975) definió variedad tradicional o *landrace* como una población de un cultivo con tres características básicas: variabilidad de genotipos, una cierta integridad genética que ha evolucionado a través del cultivo en un sistema agrícola tradicional y la adaptación a un ambiente local específico.

En una versión más popular, la guía Michelin propone cinco cualidades que permiten identificar a una variedad tradicional de tomate (Alethea Tan, 2017): no solemos encontrarlas en los supermercados, son estacionales, presentan múltiples colores, tamaños y formas, son más caras y, salvo excepciones, suelen tener una vida corta.

Aunque estos tomates han existido desde hace siglos, el concepto de *variedad tradicional* es bastante reciente, y suele utilizarse para diferenciar las variedades de ámbito local desarrolladas por el paso del tiempo y el instinto de los agricultores de las variedades híbridas modernas, obtenidas desde la segunda mitad del siglo pasado mediante complejos programas de mejora genética. En general, es cierto que las líneas de mejora transformaron la agricultura a nivel mundial, ya que permitieron aumentar notablemente el rendimiento de las cosechas, hacer frente a plagas y enfermedades, y facilitar el transporte y la exportación. Sin embargo, la mejora genética se ha olvidado de una característica que ahora está siendo reclamada con fuerza por el consumidor: el sabor (Gao et al., 2019; Zhao et al., 2019). El mantra *los tomates de ahora ya no saben a tomate* está firmemente asentado en todos los niveles de la sociedad actual, promoviendo también multitud de investigaciones en el ámbito científico. Recientemente, los científicos Tieman y Klee (Klee & Tieman, 2018; D. Tieman et al., 2017) mencionaron que las variedades comerciales modernas contienen significativamente menores niveles de importantes compuestos asociados al sabor que las variedades tradicionales. Podemos comprobar fácilmente que el número de artículos científicos dedicados al sabor y la calidad del tomate ha aumentado considerablemente durante la última década, con Estados Unidos, China, España e Italia a la cabeza (Figura 4). De esta forma, las variedades tradicionales, cuyo cultivo había disminuido, están resurgiendo con fuerza como símbolo de tradición y autenticidad, pero sobre todo como emblemas del sabor y la calidad organoléptica del tomate.

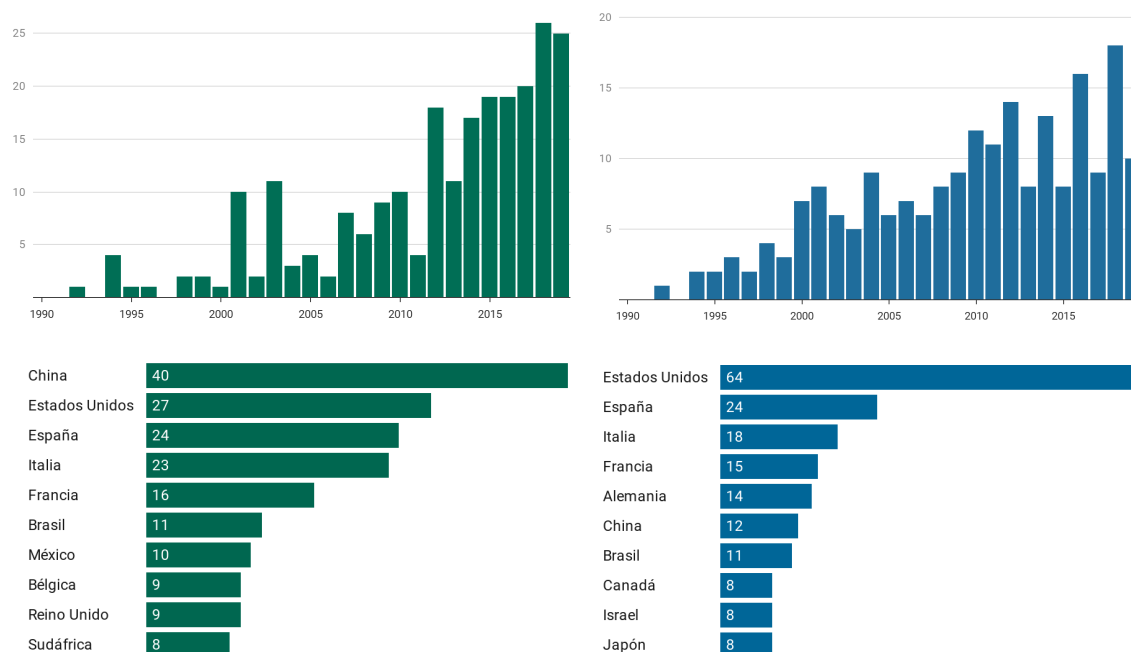


Figura 4. Número de publicaciones científicas durante el periodo 1990-2019 incluyendo la frase 'tomato quality' (verde), y las palabras 'tomato' AND 'flavor' AND 'aroma' (azul) en el título, abstract y/o palabras clave (SCOPUS, marzo 2020).

Quizás sea Estados Unidos el país con una mayor tradición en el cultivo y la comercialización de variedades tradicionales, y donde tienen un mayor estatus en la sociedad actual. Incluso el término que utilizan para referirse a una variedad tradicional, *heirloom* (traducido como *reliquia familiar*), es extraordinariamente descriptivo. Desde finales del siglo pasado, existen populares familias de agricultores que se dedican exclusivamente a la producción de semillas de cientos de variedades tradicionales de tomate (TomatoFest, Baker Creek Heirloom Seeds...), siendo importantísima también la labor de la red de recuperación de semillas Seed Savers Exchange. Ya en el año 2007, en el artículo *The Heirloom Tomato as Cultural Object: Investigating Taste and Space*, la socióloga Jennifer A. Jordan (2007) exploraba las razones del aumento exponencial de la popularidad de los *heirlooms* en los años noventa, que pasaron de ser cultivados en los patios traseros de las casas a aparecer en cocinas de restaurantes, en páginas de periódicos y revistas populares, en las huertas de muchos pequeños agricultores e incluso en mercados especializados a un precio de 7 dólares por libra. El trabajo concluye que la oposición de ciertos sectores al monopolio de la agricultura intensiva, el esfuerzo de los *seedsavers* o conservadores de semillas y el desarrollo de un sentido del gusto y el interés por la experiencia única de probar estos tomates en las grandes urbes, abrieron la puerta de nuevo a muchos pequeños agricultores que intentaban sobrevivir en un mercado fuertemente acaparado por las grandes productoras de híbridos

modernos. Ahora, una pequeña finca familiar en el Chicago rural puede gozar de buena salud económica abasteciendo a restaurantes y mercados especializados de un producto local y exclusivo, tal y como expone la autora.

También Italia, un país que desarrolló el cultivo de tomate de forma muy parecida a España, es reconocido mundialmente por su gran colección de tomates tradicionales de alta calidad (Figura 5). Por ejemplo, el famoso cocinero británico Jamie Oliver, habitual de los programas de cocina de la BBC y experto en gastronomía italiana, ofrece en su web una guía descriptiva de populares variedades tradicionales italianas de tomate en un artículo titulado *A guide of Italian tomatoes*. En él se detalla las características de la variedad San Marzano, con la que se elabora la famosa salsa de la pizza napolitana con Denominación de Origen Protegida (DOP), y se describen cualitativamente variedades como la Principe Borghese, el grupo varietal del *pomodoro* Vesuviano o el conjunto de tomates de tipo *costoluto* (Pete Wrapson, 2015). En el ámbito científico, un gran número de investigaciones recientes han estudiado las características genéticas y fenotípicas de las variedades tradicionales italianas (Baldina et al., 2016; Corrado et al., 2014).

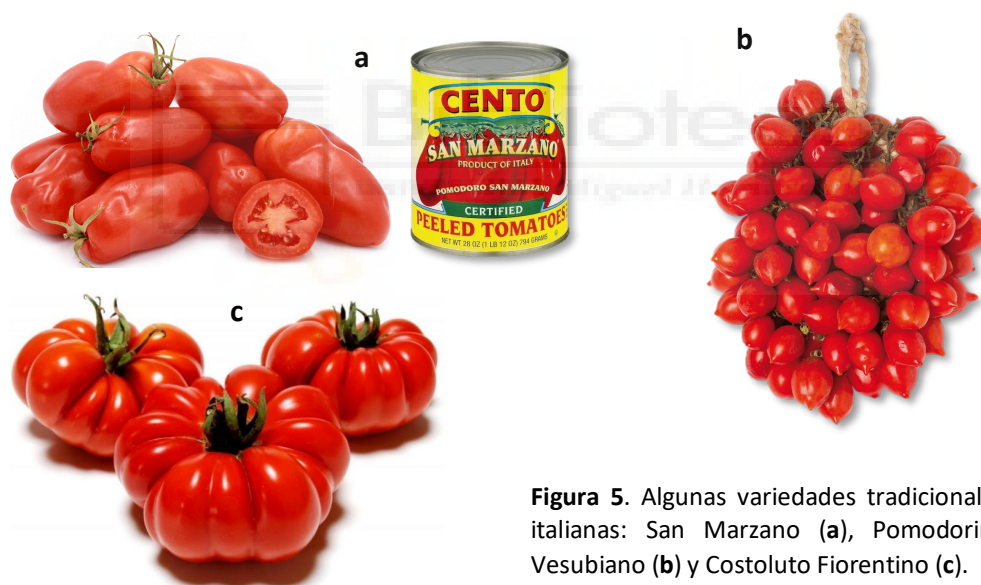


Figura 5. Algunas variedades tradicionales italianas: San Marzano (a), Pomodorino Vesubiano (b) y Costoluto Fiorentino (c).

Es posible que las variedades tradicionales españolas de tomate no sean tan conocidas como las italianas. Sin embargo, la creciente preocupación por la falta de sabor de los tomates que comúnmente podemos adquirir en el supermercado está llevando a muchos consumidores a explorar las posibilidades que ofrece el enorme número de variedades locales que existen en nuestro país. Queda reflejado en la gran cantidad de artículos en periódicos y revistas recientes con titulares altamente explícitos, como *Las 10 variedades de tomate más exquisitas* (Caballero, s. f.), con fotografías de gran calidad y descripciones de tomates como el Muchamiel o el Rosa de Altea, *El tomate vuelve a saber a tomate* (de la Serna, 2019), ofreciendo incluso una relación de pequeños

productores y comercializadores de tomate tradicional o *Ruta gastro: Tomates que (de verdad) saben a tomate... ¿a qué restaurantes peregrinar para degustarlos?* (Hernández, 2017), donde describe detalladamente las variedades Antigua de Tudela, Rosa de Barbastro, el Raf o el Ramallet, y enumera una serie de restaurantes donde poder probarlos. La atracción por las variedades tradicionales de tomate también ha llegado a la televisión, incluyendo infinidad de reportajes sobre el tomate Raf. En uno de los programas de El Comidista TV (La Sexta), se entrevistó a un agricultor de Granollers (Barcelona) que ha dedicado buena parte de su vida a recuperar y comercializar variedades tradicionales de Cataluña a pequeña escala. Él mismo defiende el tomate tradicional como un *mundo de sabores*, y afirma que ‘el cultivo de variedades tradicionales siempre será minoritario, nunca será una cosa masiva que puedas encontrar en las grandes superficies (...), pero cada vez hay más personas que piden tomates por nombres’ (El Comidista TV, 2017). Y son todavía más abundantes las referencias a investigaciones relacionadas con el aroma del tomate y la localización de los *genes del sabor* (El Español, 2019; Gómez, 2020; RTVE, 2017).

En el ámbito científico, el estudio de los mecanismos que influyen en la calidad y el sabor del tomate es un objetivo principal en equipos investigadores de primer nivel, los cuales se han apoyado en las nuevas técnicas de secuenciación masiva del ADN, el desarrollo de la tecnología de análisis metabolómicos y los estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Study*, GWAS). Se han realizado multitud de investigaciones durante los últimos 20 años, cuyo objetivo común ha sido identificar los factores metabolómicos y genéticos más importantes que influyen en el sabor y el aroma del tomate (Tabla 1). En general, estos estudios requieren de un gran esfuerzo porque necesitan material vegetal con una gran variabilidad genética (Gascuel et al., 2017), por lo que muchos de ellos utilizaron extensas colecciones de variedades tradicionales. Este es el caso del proyecto TRADITOM, impulsado recientemente por la Unión Europea, financiado a través del programa Horizonte 2020 con un total de 4,3 millones de euros y coordinado por Antonio Granell y su equipo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). El proyecto contaba además con la participación de numerosas instituciones y empresas europeas de diversa índole, entre ellas el grupo de Biodiversidad Agrícola y Mejora Genética de Variedades EPSO-UMH. TRADITOM tiene como objetivo fundamental proporcionar a los productores una sólida base científica sobre las variedades tradicionales de tomate disponibles. Para ello, se realizó la caracterización genotípica y fenotípica de más de 1500 variedades de tomate tradicional europeo, incluido el análisis de los metabolitos y compuestos asociados a la salud o al sabor del fruto y la búsqueda de genes y QTLs ligados al sabor. En la página web oficial del proyecto se pueden consultar los resultados de las investigaciones, e incluso ofrecen una lista de recetas

típicas de cada país con diferentes variedades tradicionales de tomate como ingredientes principales (*TRADITOM*, s. f.).

Tabla 1. Investigaciones metabolómicas y genéticas más importantes relacionadas con el sabor y el aroma del tomate y publicadas durante el periodo 2000-2020.

Desarrollo de métodos de determinación de volátiles en tomate	Chen y Sidisky 2011; Pardo-García et al. 2013; Farneti et al. 2013; Selli et al. 2014; Rambla et al. 2015; Sawaddipanich y Chanthai 2016; Ghizzoni 2019; Li et al. 2020; Rambla y Granell 2020
Análisis de los perfiles aromáticos del fruto para la comparación de variedades, ensayos de manejo del cultivo (injerto, fertilización, riego...), ensayos postcosecha...	Ortiz-Serrano y Gil 2010; Aguiló-Aguayo et al. 2010; Baldwin et al. 2011; Casals et al. 2011; Strano et al. 2011; Raffo et al. 2012; Krumbein y Schwarz 2013; Renard et al. 2013; Figueira et al. 2014; Patana-Anake y Barringer 2015; Du et al. 2015; Farneti et al. 2015; Wang et al. 2015; Ponce-Valadez et al. 2016; Wang et al. 2016a; Kreissl y Schieberle 2017; Wang et al. 2017; Vela-Hinojosa et al. 2018; Wang et al. 2018a; Zhu et al. 2018b; Lee et al. 2018; D'Angelo et al. 2018; Hu et al. 2019; Lee et al. 2019; Paolo et al. 2019
Identificación y estudio de las enzimas de la ruta metabólica LOX en fruto y localización de genes asociados	Matsui et al. 2000; Chen et al. 2004; Shen et al. 2014; Gao et al. 2019
Identificación de los metabolitos relacionados con el aroma en el fruto y sus rutas de biosíntesis	Baldwin et al. 2000; Tandon et al. 2000; Li et al. 2003; Simkin et al. 2004; Tikunov 2005; Tieman et al. 2006a; Baldwin et al. 2008; Klee 2010; Dávila-Aviña et al. 2011; Bai et al. 2011; Mageroy et al. 2012; Granell y Rambla 2013; Rambla et al. 2013; Ilg et al. 2014; Wang et al. 2016c; Li et al. 2019
Identificación de los metabolitos en fruto que influyen en las preferencias de los consumidores	Baldwin et al. 2008; Vogel et al. 2010; Klein et al. 2010; Cebolla-Cornejo et al. 2011a; Tieman et al. 2012; Piombino et al. 2013; Baldwin et al. 2015; Tieman et al. 2017; Wang y Seymour 2017; Klee y Tieman 2018; Cortina et al. 2018; Jeyaprakash et al. 2020
Identificación de QTLs y genes relacionados con la regulación de las rutas de biosíntesis de los metabolitos relacionados con el aroma en fruto (GWAS y transcriptómica)	Tieman et al. 2006b; Cañoles et al. 2006; Zantor et al. 2009; Domínguez et al. 2010; Klee y Tieman 2013, 2018; Tikunov et al. 2013; Baldassarre et al. 2015; Zhang et al. 2015; Liu et al. 2016; Rambla et al. 2017, 2016; Bauchet et al. 2017; Zou et al. 2018; Wu et al. 2018; Zhao et al. 2019; Gao et al. 2019; Jian et al. 2019
Efectos de la introgresión de genes de especies silvestres relacionadas en los perfiles aromáticos de las variedades modernas	Zhu et al. 2018; Schouten et al. 2019

1.2.2. Origen, pérdida y recuperación de las variedades españolas

El primer contacto documentado de los españoles con el tomate domesticado fue en la ciudad mesoamericana de Tenochtitlan, tras su conquista por Hernán Cortés en 1521 (López-Terrada, 2014). En las Crónicas de las Indias, se detallan las muchas formas y colores de los tomates que se vendían en los mercados de esta ciudad, que eran parte esencial de la dieta y la cultura de sus habitantes. El tomate pasó pronto a formar parte de la cocina de los conquistadores, lo que probablemente explique la rapidez con la que se incorporó a la gastronomía en España, tan sólo unos años después de la llegada de Cortés a América. Aunque no existen referencias tempranas de su uso culinario en nuestro país, las primeras recetas italianas con tomate conocidas especifican una forma de cocinarlo *alla spagnuola*, es decir, al estilo español. El primer escrito en España donde aparece el tomate como alimento es en 1608, en las listas de la compra del Hospital de la Sangre de Sevilla (López-Terrada, 2014). En el siglo XVII, las referencias del uso de esta hortaliza son más abundantes, siendo incluso inmortalizada en 1646 por el pintor Esteban Murillo en su cuadro *La cocina de los Ángeles* (Figura 6), expuesto en el Museo Nacional del Louvre de París.



Figura 6. *La cocina de los Ángeles* de Bartolomé Esteban Murillo (1646, Sevilla).

A finales del siglo XVII, el cultivo del tomate empieza a aparecer en tratados de agricultura, en los que se hace referencia a la diversidad de clases que existen, y pasa a estar relativamente extendido a principios del siglo XVIII (López-Terrada, 2014). Esta rápida expansión conllevó un cultivo localizado en muchas regiones al mismo tiempo, favoreciendo una selección genética sujeta tanto a la intuición y al criterio de cada familia de agricultores como a las condiciones edáficas y ambientales. Probablemente serían seleccionadas aquellas plantas de gran rusticidad y vigor, pero también las que producían un fruto de buena calidad, al ser una hortaliza ligada desde el principio con la gastronomía popular. De esta forma, el tomate importado de América evolucionó en una

gran cantidad de diferentes ecotipos o *landraces* más o menos definidos fenotípicamente y adaptados a las condiciones locales de cada región (Cebolla-Cornejo et al., 2012).

Estos ecotipos son lo que se conocen actualmente como variedades tradicionales. Existen multitud de grupos y clases diferentes, con distinta forma, color, tamaño y, en general, con una gran calidad organoléptica. La transformación súbita que experimentó la agricultura en todo el mundo a mediados del siglo pasado, unido a una serie de factores sociales y económicos, han llevado a buena parte de ellas a la práctica desaparición. Tal y como explican Cebolla-Cornejo et al. (2007), la progresiva pérdida del cultivo de variedades tradicionales en Valencia tiene su origen en una sucesión de eventos, que pueden extrapolarse al resto de regiones y resumirse en:

- i. La sustitución de estas variedades por variedades modernas e híbridos adaptados a las técnicas de cultivo actuales de altos insumos, permitiendo obtener mucho mejor rendimiento y hacer frente a los costes de producción.
- ii. La baja viabilidad de las pequeñas explotaciones donde se han cultivado tradicionalmente, lo cual destruye a su vez cualquier posibilidad de relevo generacional.
- iii. La gran susceptibilidad de las variedades tradicionales a la incidencia de enfermedades víricas importadas.

En definitiva, la mayoría de las zonas donde todavía se cultivan variedades tradicionales están compuestas por pequeños huertos de poca importancia agrícola, y la producción de tomate suele estar destinada al autoconsumo o al mercado local. Si añadimos la presencia de agricultores fundamentalmente de avanzada edad y la incidencia de enfermedades, las posibilidades que tienen estas variedades de sobrevivir son muy escasas (Ruiz De Galarreta et al., 2016).

Para evitar esta pérdida de biodiversidad y la erosión genética, los bancos de germoplasma españoles han estado durante años recogiendo y caracterizando las diferentes variedades tradicionales de tomate que aún es posible encontrar. En el Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF), perteneciente al Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), hay clasificadas casi 3.000 entradas de variedades tradicionales de tomate procedentes de todas las provincias españolas. Son particularmente importantes las colecciones procedentes de la provincia de Barcelona, que alcanza las 249 accesiones, así como las de Huesca, Valencia, Murcia o Alicante, que superan las 120 (Figura 7) (CRF del INIA, 2019).

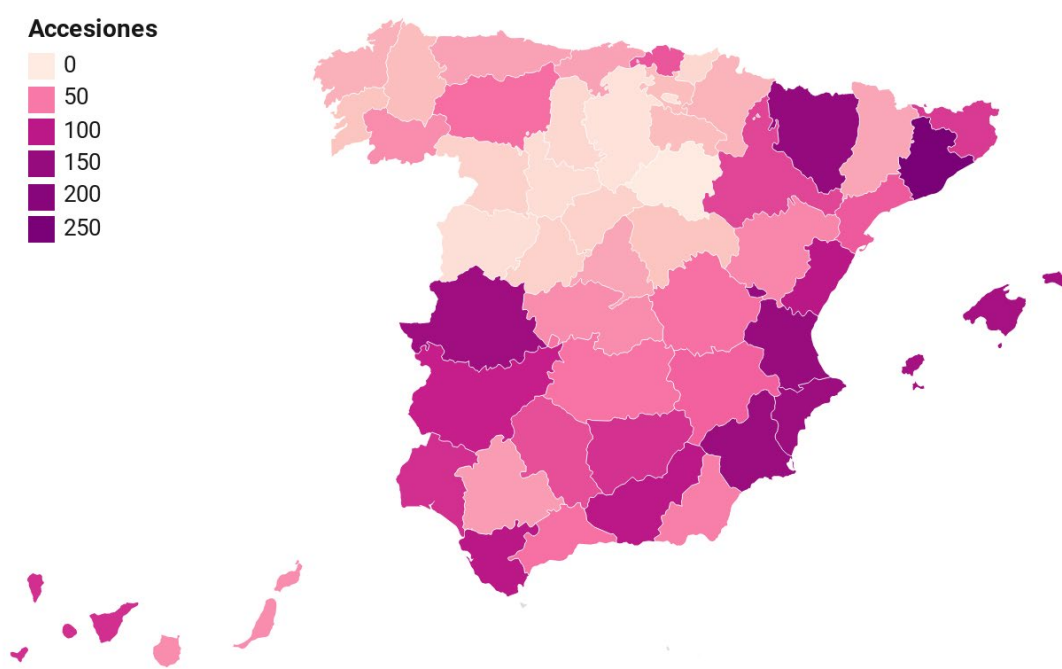


Figura 7. Número de accesiones de tomate tradicional en España, por provincias (CRF del INIA 2019).

Como buena parte de la cuenca mediterránea, la Comunidad Valenciana es una zona de tradición agrícola, con sistemas de regadío y cultivo perfeccionados a lo largo de la historia por las diferentes culturas que han ocupado este lugar. No es de extrañar que la tradicional huerta Valenciana haya sido nombrada en 2019 como Sistema Importante del Patrimonio Agrícola Mundial (SIPAM) por la FAO (FAO, 2019), y tampoco que sea una de las zonas con mayor diversidad en variedades de tomate tradicional. En el banco de germoplasma del INIA encontramos hasta 372 entradas de variedades tradicionales de tomate en la Comunidad Valenciana: 145 en Valencia, 126 en Alicante y 101 en Castellón, la mayoría de ellas recogidas y caracterizadas por el Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Muchas proceden de pequeños huertos de autoconsumo, y algunas incluso podrían haberse perdido por completo en la actualidad debido al desuso (Cebolla-Cornejo et al., 2012). Sin embargo, hay otras variedades que son más conocidas y cultivadas. Una forma de comprobar su importancia es contabilizar el número de entradas en el inventario, así como el número de poblaciones distintas en las que se ha recogido. Por provincias, observamos que en Valencia es el tomate valenciano la variedad más importante, ya que cuenta con 30 registros procedentes de 20 poblaciones distintas. En Alicante, el grupo varietal Muchamiel registra 24 entradas de diferentes poblaciones como Mutxamel, que tiene la mitad de ellas, San Joan d'Alacant, Novelda e incluso Orihuela. Por último,

el tomate De penjar o De colgar es el más registrado en la provincia de Castellón, con 28 entradas de 16 poblaciones.

La realidad es que estas tres variedades, junto a otras como el De la pera de la Vega Baja del Segura, forman parte de la cultura y la gastronomía que tradicionalmente ha identificado a la Comunidad Valenciana. Se caracterizan por ser ampliamente conocidas entre la población, y se han ganado el respeto de los consumidores gracias a su excepcional calidad organoléptica. Y es cierto que la tendencia actual es apostar por variedades que ofrezcan un sabor y calidad diferenciados, ya que hay gran cantidad de consumidores reclamando una alternativa de calidad a los híbridos modernos, considerados muchas veces como tomates sin sabor. De hecho, hay grupos de consumidores dispuestos a pagar bastante más por estos productos que por los que encuentran en el supermercado habitual (Cebolla-Cornejo et al., 2012; Martínez-Carrasco et al., 2014; J. Ruiz & García-Martínez, 2009). Además, existen sectores de la población que reclaman una agricultura sostenible con el medioambiente, con interés en productos locales y/o tradicionales (Martínez-Carrasco et al., 2014). La producción de tomate tradicional puede reunir todas estas condiciones, ofreciendo una alternativa viable para pequeños y medianos agricultores (Dinis et al., 2011).

El cultivo de variedades locales en la Comunidad Valenciana está recuperándose poco a poco por medio de asociaciones de productores que, aunando tradición y sostenibilidad, están ofreciendo al consumidor un producto de calidad diferenciada. Por ejemplo, el tomate valenciano es comercializado directamente a través de la cooperativa de El Perelló con su logotipo, mientras el De Penjar está amparado bajo la marca de calidad CV, la cual también está siendo solicitada para el tomate Muchamiel. Otras variedades, como el tomate De la pera de la Vega Baja del Segura, son vendidos por los propios agricultores en los mercados locales.

Un buen ejemplo de recuperación del tomate tradicional lo encontramos en El Perelló, Valencia. En el año 1992, la Cooperativa Valenciana Unió Protectora d'El Perelló comenzó a recuperar la *tomaca valenciana*, nombre por el cual se conoce al grupo varietal del tomate valenciano, compuesto fundamentalmente por los tipos Masclat y Chato. En el periodo 2006-2017, la producción de “el caviar rojo de la huerta mediterránea”, como ellos mismos han bautizado a este tomate, aumentó de 50 a más de 730 toneladas (Soler et al., 2017). Además, la cooperativa establece unas normas básicas para asegurar un cultivo sostenible, así como el control de la sanidad y la trazabilidad del producto, ofreciendo al consumidor una calidad certificada y garantizando a los agricultores un precio mínimo de venta (Tomates del Perelló s.f.) (Figura 8).

En la provincia de Castellón, se fundó en el año 2007 la Asociación de Productores y Comercializadores de la Tomata de Penjar de Alcalà de Xivert, que producen y comercializan el tomate de colgar típico de la comarca del Baix Maestrat bajo el amparo la Marca de Calidad CV,

certificada por la Comunidad Valenciana. Los agricultores asociados mantienen un cultivo tradicional de encañado al aire libre, con el uso de riego por goteo, la preferencia por los abonos de origen animal, el uso reducido de pesticidas y el respeto por la rotación de cultivos. Tradicionalmente, el tomate recolectado es sometido a una cuidadosa selección según su calidad, y después es cosido por el pezón formando los *poms* o racimos. Aunque la mayor parte de la producción se comercializa a granel y sin coser, existe la posibilidad de comprar este producto *gourmet* en cajas de madera por 12 euros por kilogramo (Tomate de Penjar s.f.) (Figura 8).



Figura 8. Tomate Valenciano de la cooperativa de El Perelló comercializado en cajas (izda.), y racimos individuales de tomate De Penjar comercializados en lotes de cuatro cajitas en la tienda online de la Asociación de Productores y Comercializadores de la Tomata de Penjar d'Alcalà de Xivert (dcha.).

En 2009 la UMH firmó un convenio de colaboración con ASAJA, la principal organización de agricultores en Alicante y el Ayuntamiento de Muchamiel, orientado a la recuperación del cultivo del tomate Muchamiel. Fruto de estos esfuerzos, en 2019 nace la Asociación de Productores y Comercializadores de Tomate Muchamiel en la localidad de Mutxamel (Alicante), con la “vocación de representar, defender y promocionar la producción y comercialización del tomate Muchamiel. Entre sus primeros objetivos está la realización de las gestiones oportunas para la creación de la marca de calidad CV” (Ayuntamiento de Mutxamel, s. f.), cuya concesión se prevé antes de 2021.

Las variedades tradicionales también están resurgiendo en otras regiones (Figura 9), como es el caso del tomate Rosa de Altea, comercializado por agricultores de la comarca de la Marina Baixa (Alicante) y que llega incluso a mercados de abastos de Madrid, Barcelona o Bilbao como un producto *gourmet* (Diario La Marina Plaza 2014). En otras regiones españolas, como el Valle de Guadalhorce de Málaga, está regresando al campo la variedad Huevo de Toro (Peláez, 2016) y, en la zona del Alto Aragón, el tomate tradicional Rosa de Barbastro sigue aumentando su producción (Pano, 2019). El tomate Moruno o tomate Reliquia de la huerta de Carabaña está recobrando importancia en la provincia de Madrid (Revista Sobremesa 2019), y el tomate de Los Palacios y

Villafranca, conocido como *bombón colorao*, se comercializa a través de una Indicación Geográfica Protegida (IGP) (Tomate de los Palacios 2020). Y no sólo están renaciendo a nivel local, ya que algunas empresas de semillas y de diseño de variedades (Vilmorin, Ramiro Arnedo...) también están pujando con fuerza en la batalla por el sabor y la calidad del tomate con nuevas variedades de características tradicionales, comercializadas en todo el estado.



Figura 9. Variedades tradicionales comercializadas con una etiqueta distintiva. En el sentido de las horas del reloj, el tomate Rosa de Altea, el Rosa de Barbastro, el tomate de Los Palacios y el Huevo de Toro de Guadalhorce.

El propósito principal de estas iniciativas es la supervivencia del pequeño agricultor mediante la protección, el cultivo y la comercialización de un tomate diferenciado. Por supuesto, la creación de marcas de calidad o denominaciones de origen son fundamentales para establecer la imagen de un tomate de calidad diferenciada, con una serie de características distintivas que van a permitir elevar su popularidad e incentivar su consumo. Ya existen muchos productos agroalimentarios locales que son comercializados de esta forma en la Comunidad Valenciana, y también en otras regiones con ejemplos muy conocidos como la berenjena de Almagro o los Calçots de Valls, que además son dos variedades tradicionales recuperadas (Figura 10). También el cultivo en sistemas agroecológicos o sostenibles con el medioambiente está ganando fuerza entre los productores de

variedades locales, ya que va añade valor al producto y contribuye a mejorar el precio en origen (Ruiz De Galarreta et al., 2016).



Figura 10. Denominaciones de Origen (a), Indicaciones Geográficas Protegidas (b), marcas de calidad CV (c), marcas Colectivas y de Garantía (d) de productos agroalimentarios de la Comunidad Valenciana, e IGP de la berenjena de Almagro y el Caçot de Valls (e).

Otro objetivo de la recuperación de variedades locales debe ser la lucha contra la pérdida de biodiversidad agrícola y la erosión genética. La uniformidad genética en los cultivos debido a la reducción del número de variedades utilizadas en la agricultura intensiva moderna tiene consecuencias fatales para la sociedad ante los cambios repentinos (Fowler & Mooney, 1990). Frente a la amenaza que supone el cambio climático, urge la necesidad de proteger la producción de alimentos mediante una diversidad genética suficiente que permita la adaptación a ambientes y condiciones altamente cambiantes. Por lo tanto, el cultivo de variedades tradicionales puede ofrecer una alternativa al avance de la agricultura intensiva de monocultivo, reduciendo de esta forma la erosión genética y creando sistemas agrarios más sostenibles (Guerrero Lara et al., 2019).

Las instituciones públicas también están realizando un esfuerzo por dar a conocer las variedades tradicionales y ponerlas en valor, siendo conscientes de la oportunidad que existe de conservar una agricultura rentable para el pequeño agricultor y sostenible para el medioambiente. En el caso de la Comunidad Valenciana, es de reciente creación el *Catálogo valenciano de variedades tradicionales de interés agrario* (Figura 11) (Consell Agrari Municipal de Valencia, 2018), en el que no sólo se pretende promover y dar a conocer variedades tradicionales de tomate, sino también otros cultivos históricos de la región como el pimiento, las *bajocas*, la calabaza o el melón. También está el *Catálogo de tomates tradicionales de la Comunidad de Madrid* (Lázaro et al., 2014) elaborado por el IMIDRA, o el *Catálogo de especies conservadas en el centro de investigación La Orden-Valdesequera* (González et al., 2012) creado por el CICYTEX e impulsado por el gobierno de Extremadura.



Figura 11. Portada del Catálogo valenciano de variedades tradicionales de interés agrario y ficha descriptiva del tomate Muchamiel que aparece en él (Consell Agrari Municipal de Valencia, 2018).

Por último, el mundo científico también está investigando y aportando datos relevantes para poner en valor diversos aspectos de las variedades tradicionales de tomate. La referencia a nivel europeo la encontramos en el proyecto TRADITOM, contribuyendo con gran cantidad de investigaciones utilizando variedades de tomate españolas, italianas o griegas. En España, durante la última década se han realizado numerosos estudios en los que se han evaluado los parámetros agro-morfológicos y productivos de las variedades españolas (Cebolla-Cornejo et al., 2013; Cortés-Olmos, Valcárcel, et al., 2015; M. R. Figàs et al., 2015; García-León et al., 2018; Gragera-Facundo et al., 2011; Massaretto et al., 2018), las características nutricionales y de calidad organoléptica del fruto (Alonso et al., 2009; Carbonell-Barrachina et al., 2006; Casals et al., 2018; Cebolla-Cornejo et al., 2011, 2008; Cortés-Olmos et al., 2011, 2014), así como el estudio genético y poblacional de las mismas (Cebolla-Cornejo et al., 2013; Cortés-Olmos, Vilanova, et al., 2015; García-Martínez et al., 2013), etc..

1.2.3. La gran amenaza y la mejora genética como solución

Algunos de los problemas que presentan a priori las variedades tradicionales, como el bajo rendimiento, pueden ser paliados al obtener un tomate muy apreciado por su calidad en los mercados especializados. Sin embargo, su susceptibilidad a ciertas virosis limita el cultivo en muchas zonas productoras. Al contrario que los híbridos modernos, las variedades tradicionales no presentan resistencias o tolerancias genéticas a virus, los cuales suelen transmitirse muy rápidamente y ser muy dañinos, ocasionando graves pérdidas económicas a los agricultores (Cebolla-Cornejo et al., 2012; Picó et al., 2002; J. Ruiz & García-Martínez, 2009).

Los virus más importantes que afectan al tomate en España son el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), el virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) y el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (Picó et al., 2002) (Tabla 2). Fueron detectados por primera vez hace algunas décadas en nuestro país, y han ocasionado graves pérdidas desde entonces en cultivos que carecen de resistencia genética en toda el área mediterránea. Sin duda, este es el mayor problema al que deben hacer frente los agricultores y una de las principales causas por las que muchos de ellos renuncian cultivar las variedades tradicionales (Cebolla-Cornejo et al., 2012).

Tabla 2. Transmisión, daños y primera detección en España de ToMV, TYLCV y TSWV

	Transmisión	Daños que afectan a la producción	Detección en España
ToMV	Mecánicamente y por semilla	Reducción del tamaño de la planta y del número de frutos, caída de flores.	1977 (Jordá & Alfaro, 1977)
TYLCV	<i>Bemisia Tabaci</i>	Caída severa de flores en plantas jóvenes, reducción del número de frutos en adultas	1992 (Picó et al., 1996)
TSWV	<i>Frankliniella occidentalis</i>	Necrosis y muerte de ramilletes florales, síntomas severos en frutos	1987 (Roselló et al., 1996)

Existen otros virus que también afectan al tomate, como el virus del mosaico del pepino (PepMV), detectado en el año 2000 en España (Jordá et al., 2001), o el virus que provoca el Cribado o Torrado del tomate (ToTV), que apareció en 2001 (Jordá et al., 2003). Ninguno de los dos es actualmente un problema serio para el cultivo de tomate, ya que hay disponible vacunación para PepMV (<https://www.abiopep.com/>), y la incidencia del Torrao es muy baja como para ser considerada peligrosa. Sin embargo, el recién llegado virus rugoso del tomate (*Tomato rugose fruit virus*, ToBRFV), que fue detectado en diciembre de 2019 por primera vez en España en un invernadero de Almería (EPPO RS 2019/238), sí es considerado una gran amenaza. Este tobamovirus apareció en Israel en 2015, dispersándose rápidamente por numerosos países y originando grandes pérdidas productivas al no existir resistencias genéticas conocidas (Oladokun et al., 2019). La

amenaza es tal, que la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPPO) la ha añadido a la lista de alertas de plagas y enfermedades potencialmente peligrosas, y la Comisión de la Unión Europea ha establecido medidas para prevenir su diseminación por el todo el territorio europeo. Es probable que llegue a afectar a miles de hectáreas de tomate debido a su alta transmisibilidad, por lo que será una nueva amenaza que habrá que combatir en el futuro.

La selección intuitiva de genotipos durante la domesticación del tomate supuso una irremediable pérdida de diversidad genética en el tomate cultivado con respecto a las especies silvestres relativas, debido a sucesivos eventos de cuellos de botella (Blanca et al., 2015). Gao et al. (2019) explicaron que los genes relacionados con respuestas defensivas de la planta a patógenos sufrieron una selección desfavorable, por lo que las variedades cultivadas tradicionales no suelen presentar los alelos de resistencia o tolerancia a patógenos que sí poseen sus parientes silvestres. Muchos de estos genes se han descrito y localizado en el genoma durante los últimos 50 años, y se han introgresado en el tomate cultivado mediante programas de mejora genética tradicionales (Causse et al., 2016). Algunos de los más utilizados son los que confieren resistencia o tolerancia a ToMV, TYLCV y TSWV, procedentes de las especies relativas *S. peruvianum* y *S. chilense*, entre otras (Tabla 3).

Tabla 3. Genes de resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV más estudiados y utilizados en mejora de tomate.

Virus	Gen de resistencia	Procedencia	Cromosoma	Referencia
ToMV	<i>Tm-2</i>	<i>S. peruvianum</i>	9	Young & Tanksley, 1989
	<i>Tm-2a</i>	<i>S. peruvianum</i>	9	Zhang et al., 2002
TYLCV	<i>Ty-1, Ty-3</i>	<i>S. chilense</i>	6	Verlaan et al., 2013
	<i>Ty-2</i>	<i>S. habrochiaties</i>	11	Yang et al., 2014
	<i>Ty-4</i>	<i>S. chilense</i>	4	Ji et al., 2009
	<i>ty-5</i>	<i>S. peruvianum*</i>	4	Y. Wang et al., 2018
	<i>Ty-6</i>	<i>S. chilense</i>	10	Gill et al., 2019
TSWV	<i>Sw-5</i>	<i>S. peruvianum</i>	9	de Oliveira et al., 2018
	<i>Sw-7</i>	<i>S. chilense</i>	12	Padmanabhan et al., 2019

*Según Anbinder et al. (2009), aunque no hay consenso sobre su origen (Yan et al., 2018)

Aunque el genoma de las especies silvestres de tomate comenzó a ser utilizado hace casi cien años para introducir genes de resistencia en el tomate cultivado (Rick, 1986), es a partir de 1970 cuando se intensifica su uso en los programas de mejora modernos. Muchos de estos genes son todavía imprescindibles en el desarrollo de nuevas variedades resistentes. Por ejemplo, el reciente estudio de Schouten et al. (2019) reveló que la proporción de variedades de tomate modernas con el gen *Tm-2a* aumentó de un 58% en 1970 a un 93% en la década de 2010. Muchos otros genes

también se están introduciendo desde entonces, como los pertenecientes a la familia *Cf* (procedentes de *S. pimpinellifolium*), que confieren resistencia a la cladosporiosis (*Cladosporium fulvum*), o el gen *Mi-1* de *S. peruvianum*, que proporciona resistencia al nemátodo *Meloidogyne incognita*. La lista de genes exóticos fijados en *S. lycopersicum* mediante programas de retrocruzamientos es muy larga, contribuyendo incluso a incrementar la diversidad genética de muchas variedades e híbridos actuales (Figura 12) (T. Lin et al., 2014; Schouten et al., 2019).

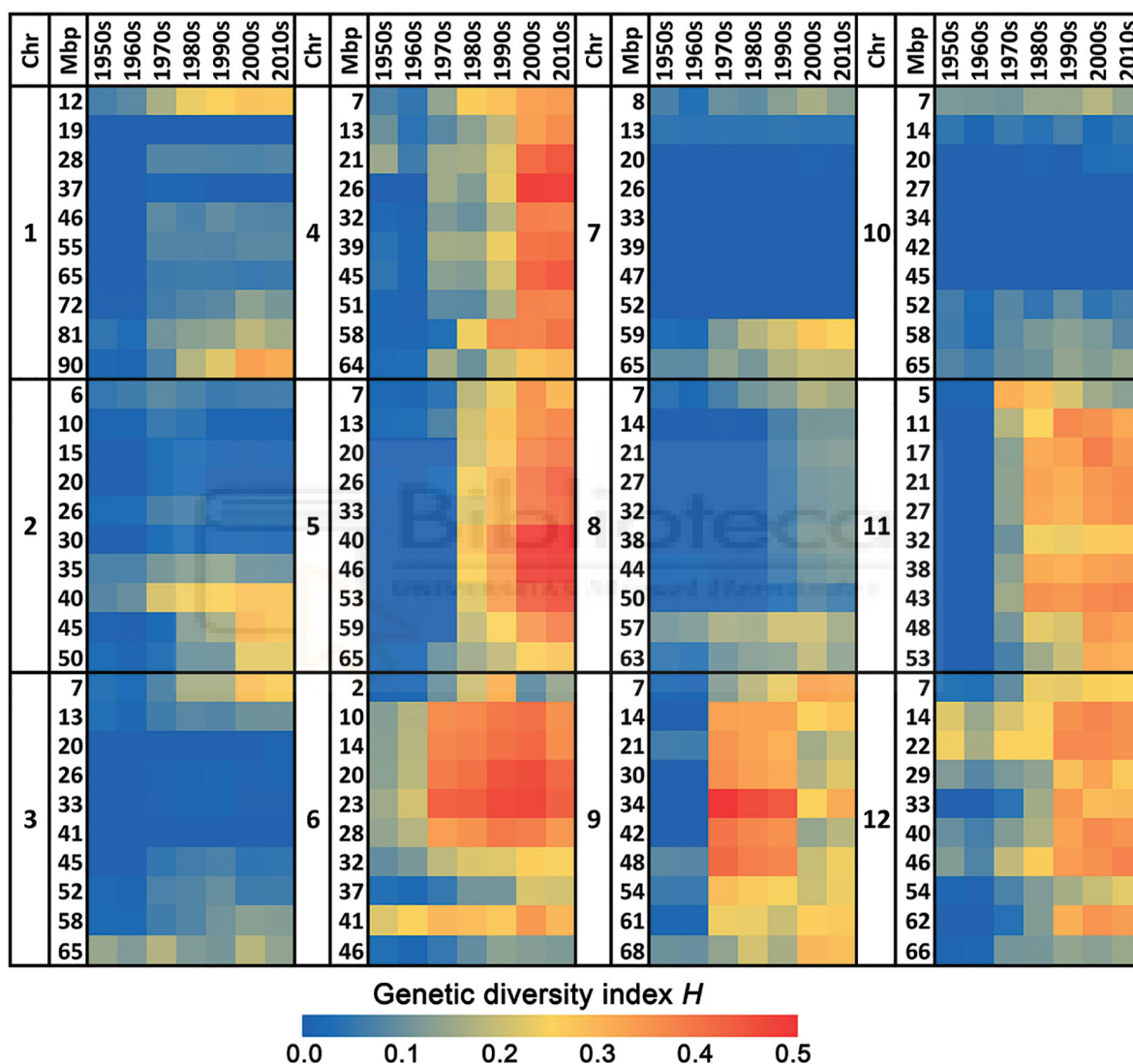


Figura 12. Diversidad genética en los 12 cromosomas de variedades comerciales de tomate desde la década de 1950 hasta la de 2010. El color azul indica baja variabilidad genética para el respectivo fragmento de cromosoma (Mpb), mientras que el color rojo indica una alta diversidad genética (Schouten et al., 2019).

Por tanto, la introducción de genes de resistencia en variedades tradicionales de tomate mediante mejora genética ofrece una solución viable a la incidencia de virus. En España, probablemente el ejemplo más evidente es el programa que el grupo de Biodiversidad y Mejora Genética de la UMH comenzó a desarrollar en 1998, cuyo objetivo es introducir genes de resistencia

a ToMV, TYLCV y TSWV en los tomates Muchamiel y De la pera, dos variedades tradicionales alicantinas. Tras años de retrocruzamientos y fijación de los genes, se han obtenido diversas líneas con resistencias que mantienen gran parte del genoma y el fenotipo tradicional (García-Martínez et al., 2011, 2012, 2014, 2015, 2016, 2020a, 2020b). Por otro lado, los grupos de mejora genética y biodiversidad de la UPV, el COMAV y la Fundació Miquel Agustí (FMA) están trabajando en la introducción del alelo *Tm-2a* en la Tomaca Valenciana d'El Perelló (M. R. Figàs et al., 2017) y en varios tipos de tomate De Penjar (M. Figàs et al., 2018), así como en la introducción de resistencias a ToMV y a *Fusarium oxysporum* f. sp en variedades de tomate del Vall d'Albaida (Valencia) y Cataluña como el Rosa Apuntat, el tomate Del Pebre o el Pera Girona (Termes Coll, 2019).

Además, la búsqueda e introducción de resistencias a diferentes patógenos es habitual en gran variedad de variedades locales de manzano, peral, patata, avellano, albaricoque o judía, con la participación de diversos centros de investigación públicos (Ruiz De Galarreta et al., 2016).

1.2.4. La variabilidad genética en las lecciones de tomate

Las variedades tradicionales presentan fenotipos muy diversos en relación al color y forma del fruto, el rendimiento o la composición aromática, aunque a nivel genético esas diferencias son escasas y pueden reducirse a un puñado de genes (Schouten et al., 2019). Como ya hemos expuesto, estos cultivares poseen una variabilidad genética muy limitada en comparación con sus ancestros silvestres, debido al efecto de los sucesivos cuellos de botella acontecidos durante el proceso de domesticación y migración del tomate (Blanca et al., 2015) (Figura 13). Sin embargo, es importante conocer la variabilidad genética que contienen para que la selección del material vegetal de partida en un programa de mejora sea precisa y robusta.

El tomate es considerado una especie modelo debido a su crecimiento de ciclo corto, genoma de pequeño tamaño y disponibilidad pública de extensa información genómica. Así, las técnicas moleculares han evolucionado extraordinariamente durante los últimos treinta años en esta especie. Los marcadores moleculares más utilizados para estudiar la variabilidad de variedades tradicionales y especies silvestres de tomate han sido los microsatélites o SSRs (Alvarez et al., 2001; Bredemeijer et al., 2002; García-Martínez et al., 2006; He et al., 2003; Kiani & Siahchereh, 2018; Y. P. Lin et al., 2019; Mazzucato et al., 2010; Mercati et al., 2015; Zhou et al., 2015), aunque también existen numerosos estudios que han desarrollado inter-microsatélites o ISSRs (Aguilera et al., 2011; Kiani & Siahchereh, 2018), RFLPs (Tanksley et al., 1992), AFLPs (García-Martínez et al., 2006), RAPDs (Carelli et al., 2006), sondas (GATA)₄ (Andreakis et al., 2004; García-Martínez et al., 2013) y SCARs (Gonias et al., 2019).

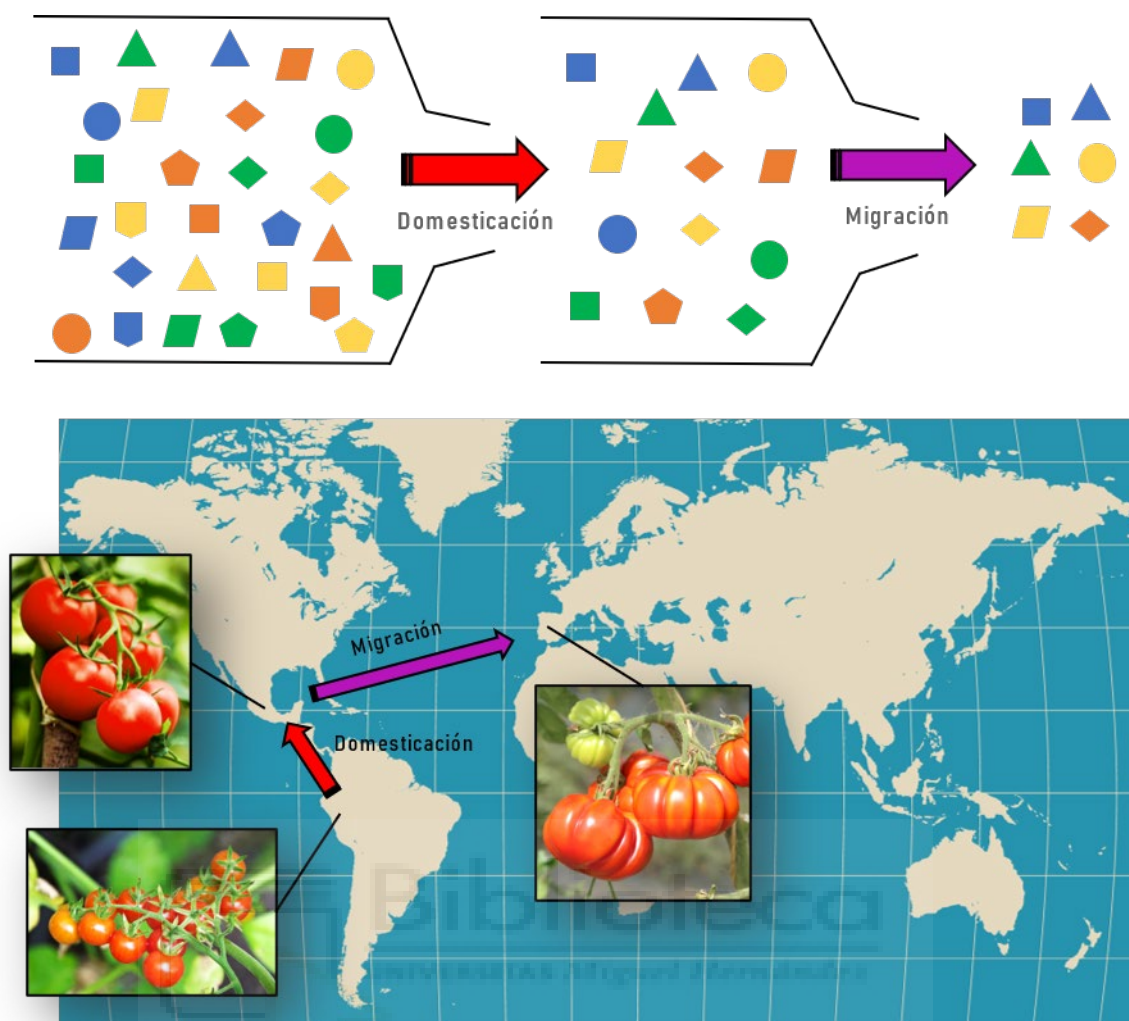


Figura 13. Pérdida de diversidad genética en el tomate cultivado respecto a sus parientes silvestres debido a los cuellos de botella originados por los procesos de domesticación y migración.

En la actualidad, el desarrollo y abaratamiento del genotipado de última generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) ha revolucionado esta clase de estudios, ya que ha permitido el uso casi ilimitado de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) y polimorfismos de inserción-delección (InDels). Por ejemplo, Cortés-Olmos, Vilanova, et al., (2015) utilizaron 32 SNPs para diferenciar una colección de 63 accesiones de tomate tradicional valenciano, Wang et al. (2019) realizó un estudio comparativo de 191 variedades usando 120 SNPs y 109 InDels, y Jin et al. (2019) fueron capaces de distinguir 324 accesiones mediante 56 InDels.

El grupo Biodiversidad Agrícola y Mejora Genética de la UMH tiene una gran experiencia en la identificación y el estudio de la variabilidad genética en variedades tradicionales de tomate, utilizando varios tipos de marcadores. Un resumen aparece en el artículo de revisión de Carbonell et al. (2018), que forma parte de esta Tesis Doctoral.

1.3. Programa de mejora de variedades tradicionales de tomate EPSO-UMH

En la Iniciativa de colaboración mundial para el fortalecimiento de la capacidad de fitomejoramiento (GIPB), la FAO manifiesta la importancia de la mejora genética en agricultura:

“La intensificación sostenible de la producción agrícola mediante una utilización mejor de la diversidad genética a través de estrategias de mejora genética es uno de los mejores enfoques para responder al desafío del aumento de la producción y asegurar el uso sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (RFAA). El fitomejoramiento es una ciencia reconocida, que puede ensanchar la base genética y la capacidad de adaptación de los sistemas agrícolas aunando las técnicas de selección con tecnologías modernas. Exige un compromiso de largo plazo y recursos nacionales, regionales e internacionales, esenciales para la obtención de cultivares mejorados más productivos, de mejor calidad y con mayor capacidad de adaptación a la evolución de las condiciones ambientales” (FAO, s. f.).

La mejora genética permite modificar genéticamente las plantas para el beneficio de la humanidad. Se estima que es responsable de un 50% del aumento de la productividad agrícola en los últimos 100 años (FAO, s. f.). Es una técnica que contribuye a mejorar la seguridad alimentaria, y tiene múltiples beneficios sociales y económicos relacionados con el desarrollo rural y la lucha contra la pobreza. Es fundamental para la construcción de una agricultura sostenible y resiliente mediante el diseño de líneas vegetales adaptadas a ambientes cambiantes, resistentes enfermedades o con una mayor eficiencia en el uso del agua y los nutrientes.

El tomate ha sido objeto de estudios genéticos desde principios del siglo XX, ya que es una especie que se adapta bien a los estudios mendelianos (Gilbert, 1912). Durante la primera parte del siglo, los investigadores contribuyeron a comprender las particularidades del genoma del tomate, se avanzó en el conocimiento de la heredabilidad de caracteres como el pedicelo *jointless* (Butler, 1936) o el peso del fruto (Fogle & Currence, 1950) y se descubrieron los primeros genes (Barton et al., 1955). Más tarde, se profundizó en el estudio de las especies silvestres de tomate y los cruces interespecíficos en el género *Lycopersicum* (Hogenboom, 1972; Szteyn, 1962; Wann & Johnson, 1963). En las décadas de 1970 y 1980 hubo un crecimiento exponencial en el número de programas de introducción de resistencias a patógenos a partir de los genomas silvestres, así como la obtención de líneas con tamaños y pesos de fruto mayores (Schouten et al., 2019). A continuación, se incrementó el uso de las introgresiones procedentes de *S. pimpinellifolium* para la obtención de tomates de pequeño tamaño y aumentó la variabilidad en los diferentes componentes que influyen en la calidad del tomate y los colores del fruto (Schouten et al., 2019). Durante los últimos diez años, el desarrollo de la secuenciación masiva del ADN y de otras técnicas de análisis ha permitido ahondar en aspectos como la localización de genes asociados a los compuestos volátiles más importantes para el aroma del tomate.

La sustitución de variedades tradicionales por líneas de mejora ha contribuido a generar una gran erosión genética en prácticamente todas las especies cultivadas (Ruiz De Galarreta et al., 2016). Sin embargo, la mejora genética también es una técnica capaz de revertir esta situación e incluso de incrementar la diversidad en el acervo genético del tomate cultivado. De hecho, Blanca et al. (2015) y Schouten et al. (2019) demostraron que la variabilidad genética en los tomates actuales es muy superior a las de las viejas variedades comerciales europeas de mediados del siglo XX, debido a la introgresión de genes de resistencia procedentes de especies silvestres relacionadas durante los últimos cincuenta años. Por otro lado, sabemos que las variedades tradicionales, junto a las especies silvestres emparentadas con el tomate, son recursos que aportan gran variabilidad genética relacionada con la adaptación a ambientes desfavorables y con características como la calidad, el tamaño, el color o los compuestos nutricionales del fruto (Casañas et al., 2017; Cebolla-Cornejo et al., 2013; Gascuel et al., 2017). Por tanto, los programas de mejora de material tradicional enfocados a la introducción de genes silvestres de interés son adecuados para obtener líneas que aporten diversidad genética y ofrezcan alternativas sostenibles.

Bajo este punto de vista, el programa de mejora genética de variedades tradicionales de tomate de la EPSO-UMH nace en 1998 con el objetivo de introducir resistencias genéticas a virus en las variedades tradicionales Muchamiel y De la pera. Es un programa de mejora clásico basado en la técnica de retrocruzamiento o *backcrossing* (BC), la selección temprana de genotipos mediante marcadores moleculares y la selección fenotípica de los mejores retrocruces. El uso del retrocruzamiento, propuesto por Harlan y Pope (1922) por primera vez en plantas, permite transferir caracteres de interés de una fuente de resistencia o parental donante en el fondo genético de una línea élite o parental recurrente. Tras cada ciclo de retrocruzamiento, se obtienen individuos con una mayor proporción de genoma de parental recurrente, alcanzando finalmente líneas homocigotas para el gen introgresado mediante la autofecundación del último retrocruce (Figura 14). Teóricamente, son necesarias cuatro generaciones de retrocruces para recuperar el 98% del genoma recurrente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta proporción es variable entre los individuos de cada retrocruce debido a la recombinación durante la meiosis. Además, pueden existir regiones donde la recombinación sea menos frecuente, especialmente en fragmentos precedentes de especies silvestres relacionadas con el tomate, dificultando la recuperación del genoma recurrente. Por tanto, el número ciclos puede variar dependiendo de la cantidad de individuos que podamos cultivar y de la subjetividad del criterio del mejorador.

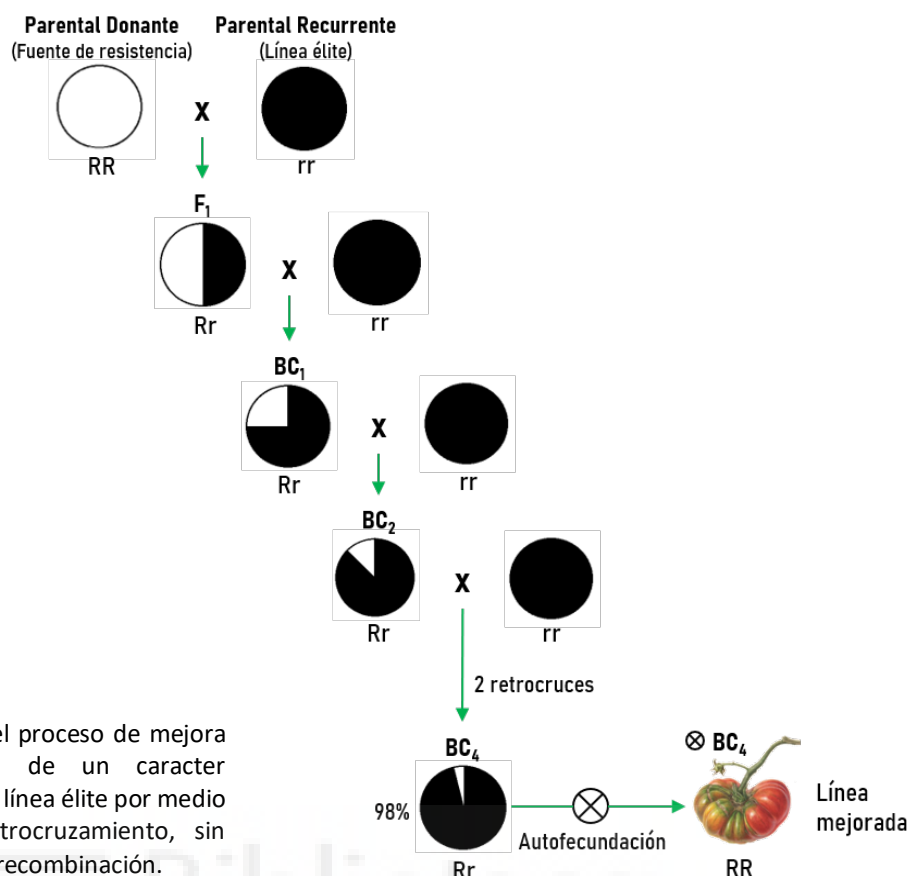


Figura 14. Esquema del proceso de mejora para la introgresión de un carácter dominante (RR) en una línea élite por medio de la técnica de retrocruzamiento, sin considerar eventos de recombinación.

El programa de mejora de la EPSO-UMH ha evolucionado notablemente durante sus 22 años de vida. Al comienzo del mismo, se caracterizaron accesiones Muchamiel y De la pera, obtenidas en varias prospecciones. Una vez seleccionadas las líneas élite, se cruzaron con el parental donante de los genes *Tm-2a*, *Ty-1* y *Sw-5*, obteniéndose la generación F₁. A partir de aquí se generaron las distintas generaciones de retrocruces (BC₁, BC₂...), seleccionando en semillero las plantas con los genotipos de resistencia esperados y en campo aquellas con el fenotipo más parecido a los parentales recurrentes. Fueron necesarios numerosos ciclos de retrocruzamiento (de cuatro a cinco años) y un ciclo de autofecundación para obtener líneas con el suficiente parecido a la línea élite. Durante los últimos 10 años, se han realizado multitud de ensayos con las líneas obtenidas, desde evaluaciones agronómicas y de calidad a estudios profundos de la interacción *Genotipo x Ambiente* (GxE). También se han cruzado algunas líneas de mejora Muchamiel y De la pera con otras variedades tradicionales para la obtención de híbridos con resistencias en heterocigosis y gran calidad de fruto. Se han registrado varios de estos híbridos Muchamiel y también numerosas líneas de tipo Muchamiel, De la pera y Cherry. Por último, en 2017 comenzó un programa paralelo para complementar la resistencia a TYLCV mediante la introducción del gen recesivo *ty-5* en algunas líneas de mejora UMH (Figura 15).

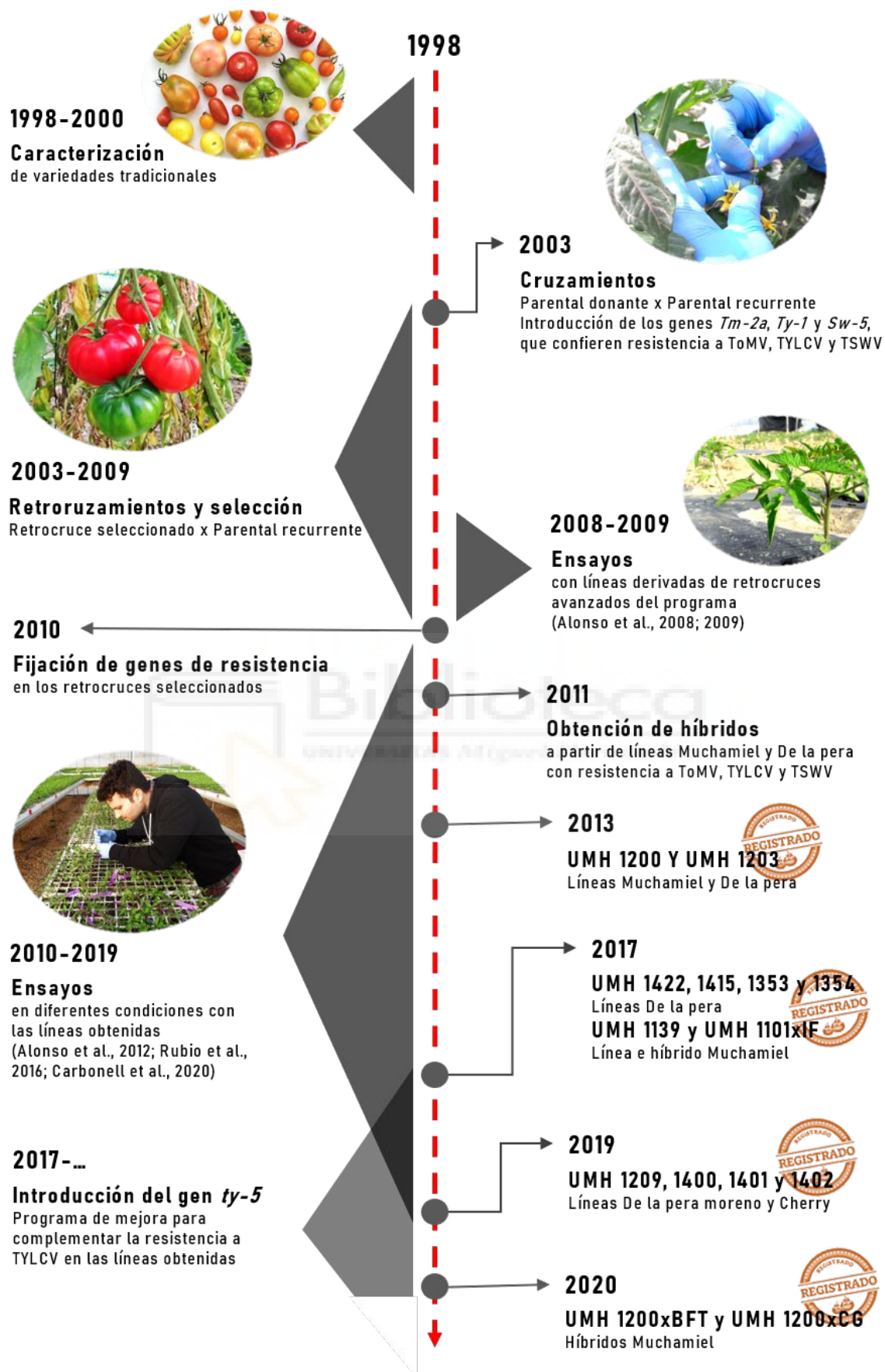


Figura 15. Programa de mejora genética de tomate tradicional EPSO-UMH.

1.3.1. Caracterización y selección de las variedades tradicionales

La caracterización de las variedades tradicionales de tomate Muchamiel y De la pera se extendió durante los tres primeros años del programa de mejora de la EPSO-UMH. Fue una etapa crítica y de larga duración, pues era sumamente importante conocer profundamente el material de partida. Las accesiones se evaluaron en diferentes ensayos en los que se estudiaron características como el rendimiento, peso de fruto, cuajado, número de frutos, incidencia de enfermedades y otros parámetros basados en descriptores de tomate (IPGRI, 1996), los cuales permiten homogeneizar la información con independencia del evaluador. Además, se midieron en laboratorio algunos caracteres relacionados con la calidad del fruto, como el contenido en sólidos solubles o la acidez. Algunas de las caracterizaciones se recogen en los Trabajos Fin de Carrera *Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "De la pera"* (García-Martínez, 1998) y *Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "Muchamiel"* (Alonso, 1998). A partir estos datos se seleccionaron las accesiones Muchamiel 18 (M18) y De la pera 21 (P21) como parentales recurrentes principales de cada tipo varietal para el programa de mejora.

Las características relacionadas con el fruto fueron los datos de mayor relevancia para el programa de mejora. En las descripciones recogidas, se especifica que los cultivares de tipo Muchamiel producen frutos de textura tierna y sabor suave, tamaño mediano-grande (de 180 a 300 g), relativamente chatos y acostillados y usualmente con hombro verde durante los primeros estadios de la maduración. Los frutos del tipo De la pera varían desde la forma ovalada-alargada a una forma bombilla bien definida con hombros verde oscuro y sin acostillado, peso entre 75 y 125 g, textura firme y pulpa jugosa de gran sabor (Ruiz et al., 2006) (Figura 16).



Figura 16. Variedades Muchamiel (izda.) y De la pera (dcha.).

1.3.2. Cruzamientos y retrocruzamientos

El programa de mejora UMH se diseñó para la introducción simultánea de diferentes genes de resistencia a virus en las variedades Muchamiel y De la pera seleccionadas. Para ello, se eligió el híbrido comercial F₁ Anastasia (Seminis Vegetable Seeds) como fuente de resistencia, un tomate redondo de gran vigor y producción, muy cultivado en la década de 1990. Este híbrido contiene el gen *Tm-2a* en homocigosis otorgando resistencia a ToMV, y los genes *Ty-1* y *Sw-5* en heterocigosis proporcionando tolerancia a TYLCV y resistencia a TSWV, respectivamente.

El cruzamiento entre las líneas élite seleccionadas y la fuente de resistencia se realizó de forma manual en invernadero. El porcentaje de frutos cuajados con producción de semillas osciló entre el 10 y el 40% (García-Martínez, 2006), dependiendo de la posición de la flor en el ramillete, temperatura, iluminación o humedad.

La selección genotípica de retrocruces es otro punto crítico del programa. Hasta la aparición de los marcadores moleculares en los programas de mejora modernos, se observaba la respuesta fenotípica de las plantas a la inoculación del virus y se seleccionaban aquellas que no manifestaban síntomas. Sin embargo, esto da lugar a la aparición frecuente de *escapes*, es decir, plantas sin resistencias que no se han infectado. Al no presentar síntomas, pasan al siguiente ciclo de retrocruces poniendo el riesgo todo el proceso de mejora. Para evitar esta situación, en el programa de mejora UMH se comenzó a utilizar marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia, los cuales permiten diferenciar genéticamente las plántulas retrocruzadas en el laboratorio.

Tras la selección genética mediante marcadores, se evaluaron fenotípicamente una serie de caracteres agromorfológicos y de calidad entre la población segregante de retrocruces, con el objetivo de elegir aquellas plantas con características deseables y el mayor parecido posible a los parentales recurrentes. Los parámetros evaluados más importantes fueron el vigor de la planta, el cuajado, el número de frutos y de flores y, especialmente, el tamaño, la forma y contenido en azúcares y acidez y otras características relacionadas con el fruto. La presión de selección de retrocruces fue alta, y sólo las mejores plantas (entre una y tres) siguieron en el programa.

Fueron necesarios de 5 a 9 ciclos de retrocruzamiento para obtener líneas con suficiente parecido a los parentales tradicionales. Considerando la distancia genética entre los parentales, la naturaleza híbrida de Anastasia y la influencia de eventos aleatorios de recombinación, es natural que fuese inevitable realizar un mayor número de ciclos de retrocruzamiento que los cuatro teóricos propuestos en condiciones ideales (Vogel, 2009).

1.3.3. Selección asistida por marcadores (SAM)

Una de las principales ventajas de que el tomate sea una planta modelo es la disponibilidad de gran cantidad de información genética publicada. Por ejemplo, en los últimos 10 años se han ensamblado y anotado seis genomas completos de tomate, el último de ellos (SL4.0) secuenciado *de novo* con tecnologías como PacBio y publicado en 2019 (Solgenomics, 2019). Todos estos esfuerzos facilitan el acceso a infinidad de polimorfismos que permiten el diseño de marcadores moleculares, los cuales son muy preciados en los programas de mejora genética modernos.

Un marcador molecular es una secuencia de ADN asociada a un determinado gen con una posición conocida en el genoma. La forma más habitual de utilizar un marcador molecular en mejora es la selección de un gen de interés o un QTL (*quantitative trait loci*) tras cada cruzamiento y retrocruzamiento. Es lo que se conoce como selección asistida por marcadores o SAM (Foolad & Panthee, 2012), la cual permite reproducir los resultados en cualquier situación, sin depender de los efectos del ambiente. Además, ofrece la posibilidad de conocer el genotipo de nuestras plántulas de forma precoz en semillero, pudiendo seleccionar y transplantar al invernadero sólo aquellas que nos interesan, ahorrando espacio y tiempo.

Uno de los marcadores moleculares más populares en la selección de retrocruces son los CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*). Se basa en fragmentos cortos de ADN amplificados mediante PCR y digeridos posteriormente con enzimas de restricción, produciendo patrones de bandas en geles de agarosa que permiten la diferenciación entre individuos homocigotos y heterocigotos (Pavan et al., 2014). Los CAPS son capaces de capturar la variación genética proporcionada por diferentes tipos de polimorfismos, como SSRs, SNPs o InDels (Kim et al., 2020; Pavan et al., 2014), caracterizados por tener herencia co-dominante, alta reproducibilidad y gran abundancia en el genoma (Nadeem et al., 2018). Este tipo de marcadores se ha utilizado ampliamente en programas de mejora de tomate enfocados en la introducción de resistencias a virus (Kim et al., 2020; Kumar et al., 2014; Panthee et al., 2013).

Durante el programa de mejora de la EPSO-UMH se utilizaron marcadores CAPS ligados a cada uno gen de los genes de resistencia introducidos (Tabla 4; Figura 17). En el caso del gen *Tm-2a*, se diseñaron marcadores usando las secuencias alélicas *Tm-2a* (AF536201) y *tm-2* (AF536199), disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Lanfermeijer et al., 2003). Para el control del gen *Ty-1* se utilizó el marcador ApsF-2, diseñado específicamente para el programa a partir del loci de isoenzimas Aps (Rick, 1974). El marcador Sw-5 asociado al gen *Sw-5* se generó a partir de los primeros mapeados del locus *Sw-5* (Folkertsma et al., 1999). El diseño y la puesta a punto de estos marcadores formaron parte de la Tesis Doctoral

de García-Martínez (2006). Una síntesis al respecto aparece uno de los artículo pertenecientes a tesis aquí desarrollada (Carbonell et al. 2018).

Tabla 4. Características de los marcadores CAPS utilizados en el programa de mejora UMH.

	Locus	Secuencia primers (5'-3')	Amplicón PCR (pb)	Enzima restricción
To-3	<i>Tm-2a</i>	F - AGGTTGTTGCACCGATTGAT R - AAGCCGTTCCGATAAACTGA	527	<i>BsuRI</i>
Mx-To	<i>Tm-2a</i>	F - TGACTGCAGGCATGTTAAGG R - TCCACAAATATTCCTCCA	718	<i>TaqI</i>
ApsF-2	<i>Ty-1/Ty-3</i>	F - TGATAGGGTTTCGGATGAGG R - CGTTCATTCTCAACCCATT	1010	<i>TaqI</i>
Sw-5	<i>Sw-5</i>	F - AAGCCGAATTATCTGTCAAC R - GTTCCTGACCATTACAAAAGTAC	213	<i>TruI</i>

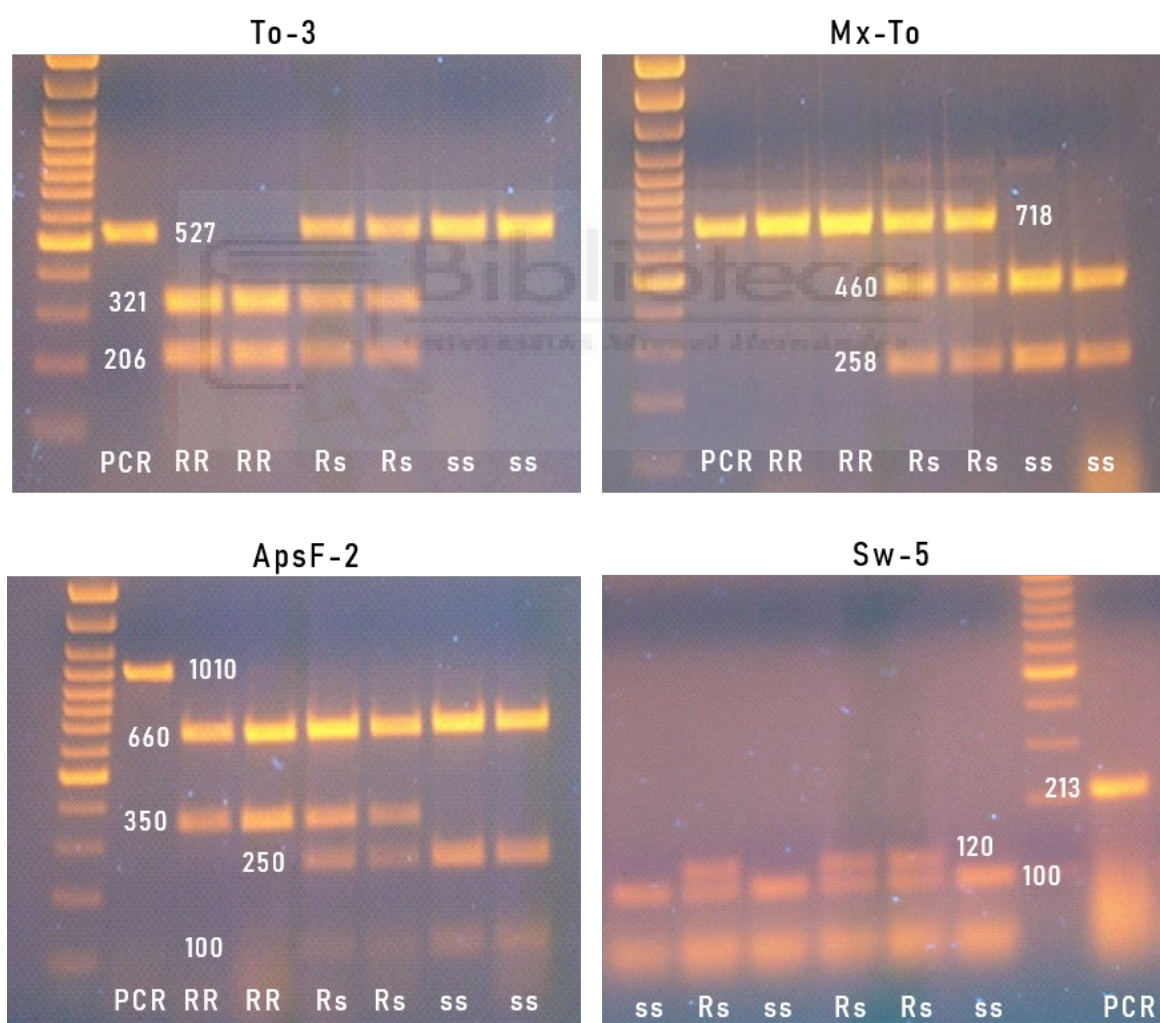


Figura 17. Geles de agarosa con los patrones de bandas (en pares de bases, *pb*) asociados a cada genotipo para los marcadores CAPS utilizados en el programa de mejora EPSO-UMH. El marcador de peso molecular empleado es el 100 pb de Fermentas. Genotipos: homocigoto resistente (**RR**), homocigoto sensible (**ss**) y heterocigoto resistente (**Rs**).

A pesar de su eficacia, el uso de marcadores CAPS conlleva protocolos de larga duración, siendo una técnica inadecuada cuando hay que genotipar gran cantidad de muestras rápidamente. Por ello, en las etapas recientes del programa de mejora EPSO-UMH se ha comenzado a utilizar una técnica más eficiente. Como parte del trabajo de esta tesis, se han puesto a punto marcadores moleculares basados en polimorfismos SNPs ligados a los genes de resistencia *Ty-1* y *ty-5*, y se ha trabajado en su implementación en el programa junto a otros marcadores diseñados previamente (Alonso et al., 2015). Mediante estos marcadores y la técnica de análisis de fusión de alta resolución o HRM (*High Resolution Melting*), hemos desarrollado nuevos procedimientos en laboratorio que permiten el procesado de un gran conjunto de muestras en muy poco tiempo.

La técnica HRM es un análisis post-PCR relativamente nuevo, capaz de identificar variaciones en las secuencias de ácidos nucleicos. Está basado en la visualización de las temperaturas de fusión de cadenas de ADN con pequeñas diferencias en el contenido de GC (guanina-citosina), lo cual es adecuado para variaciones polimórficas de tipo SNP o InDel (Reed et al., 2007). Es necesario el uso de un colorante fluorescente intercalante en el ADN de doble cadena (usualmente SYBR green) y un instrumento de PCR en tiempo real con control preciso de rampa de temperatura y capacidad de monitorizar cada fotograma del proceso de fusión o *melting*. Además, es necesario un *software* específico para procesar y analizar los resultados. Existen varios desarrolladores que ofrecen material, instrumental y *software* específico para HRM, como Thermo-Fisher o Bio-Rad. En nuestro caso, utilizamos el instrumento Lightcycler® 480 de Roche y el *software* asociado, así como los reactivos proporcionados por esta marca (Figura 18).

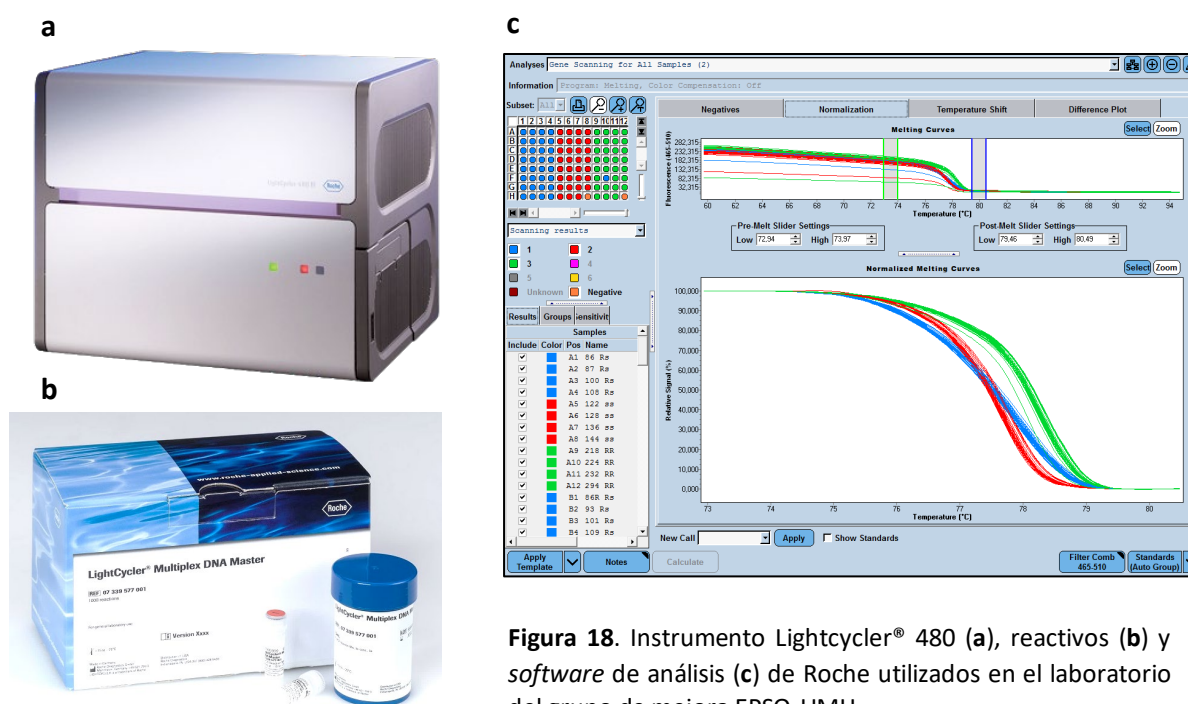


Figura 18. Instrumento Lightcycler® 480 (a), reactivos (b) y *software* de análisis (c) de Roche utilizados en el laboratorio del grupo de mejora EPSO-UMH.

El análisis HMR es una técnica con múltiples ventajas respecto a otros métodos de genotipado, siendo muy precisa y más barata y rápida (Reed et al., 2007). Por ello, es ampliamente utilizada en una gran variedad de ámbitos y estudios, siendo especialmente popular en medicina y biología molecular para el rápido reconocimiento de mutaciones relacionadas con diversas enfermedades y el diagnóstico de patologías (Anbinselvam et al., 2020; Lu et al., 2020; Martínez-Saucedo et al., 2020), el genotipado de especies y cepas de microorganismos peligrosos (M. Hu et al., 2020), en estudios de la estructura poblacional (Castagnola et al., 2019; Ginart et al., 2019) o incluso en medicina animal (Okutani et al., 2019). Sin embargo, también está aumentando su uso en agricultura (Figura 19), tanto para el diseño de marcadores moleculares asociados a genes de interés y su aplicación en mejora genética (Cho et al., 2015; Ganopoulos et al., 2016; H. J. Lee et al., 2015; Rai et al., 2015; B. C. Zhang et al., 2017) como para determinar la estructura poblacional en diferentes especies cultivadas (MacKay et al., 2008; Solomon et al., 2019; B. Wu et al., 2014) o llevar a cabo mapeados genéticos de un determinado locus (Herrera et al., 2018; C. H. Wang et al., 2016). En definitiva, es una técnica que está revolucionando el análisis de la variación genética por su sencillez y extensa aplicabilidad.

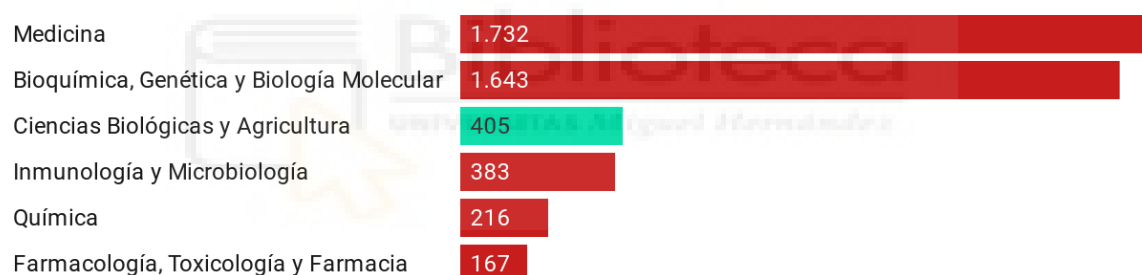


Figura 19. Número de publicaciones según el área de investigación, incluyendo la frase ‘High Resolution Melting analysis’ en el título, *abstract* y/o palabras clave del buscador de SCOPUS (SCOPUS, abril 2020).

En 2015, el grupo de mejora EPSO-UMH llevó a cabo una serie de ensayos en laboratorio para comprobar la eficacia de la técnica HRM en la selección de los genes *Tm-2a*, *Ty-1* y *Sw-5*, utilizando líneas de tomate obtenidas en el programa de mejora de tomate tradicional (Alonso et al., 2015). Se diseñaron cebadores con el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) para amplificar pequeñas secuencias de ADN de locus asociados a cada uno de los genes, escogiendo marcadores moleculares de tipo SNP en los tres casos. Se tuvo en cuenta las recomendaciones necesarias para optimizar los resultados, como que el tamaño del amplicón fuera menor a 150 pb y la temperatura de anillamiento de los cebadores en torno a 60°C. Se comprobaron ocho cebadores para *Tm-2a*, dos para *Ty-1* y tres para *Sw-5* en una colección de más de 300 plantas pertenecientes a 40 familias distintas de tomate incluyendo líneas de mejora UMH, híbridos comerciales y variedades

tradicionales. De esta forma, se eligió una pareja de cebadores para cada gen, teniendo en cuenta la calidad de la amplificación en PCR y la precisión para distinguir los genotipos tras el *melting*.

Durante esta Tesis Doctoral, se diseñó y se puso a punto un nuevo marcador ligado al gen *Ty-1* para resolver ciertos problemas asociados a los marcadores diseñados anteriormente, y también se puso a punto un marcador para el control del gen *ty-5*, el cual es fundamental en el programa de introducción de este gen en las líneas UMH. Estos dos marcadores, junto a los diseñados por Alonso et al. (2015) para la selección de los genes *Tm-2a* y *Sw-5*, han sido implementados en HRM para el genotipado de individuos antes de su trasplante a invernadero o campo, convirtiéndose en una de las técnicas de rutina en el laboratorio durante los últimos cuatro años (Tabla 5).

El uso de marcadores moleculares en programas de mejora no se restringe únicamente a la selección de uno o varios genes de interés durante los retrocruzamientos, sino que también es posible utilizarlos para acelerar la recuperación del genoma recurrente (Hospital, 2005; Vogel, 2009). La tecnología Infinium array 7720 SNP (Illumina) desarrollado por el *Solanaceae Coordinate Agricultural Project* (SolCAP) (Hamilton & Robin Buell, 2012; Sim et al., 2012) nos proporciona la posibilidad de genotipar nuestros parentales y conocer la variación genética existente entre ellos (más datos en <http://solcap.msu.edu>). Esta información es extremadamente útil para poder estimar la tasa de recuperación de genoma élite en las plantas retrocruzadas, permitiendo escoger aquellas con el mayor porcentaje sin necesidad de esperar a fenotipar la planta adulta. En teoría, si han ocurrido eventos aleatorios de recombinación positiva en algunas de las plantas retrocruzadas, es posible recuperar genoma élite incluso más rápido que en condiciones ideales de herencia mendeliana, pudiendo ahorrar de dos a cuatro ciclos de retrocruzamiento (Howell et al., 2014; Vishwakarma et al., 2016). Esta técnica, que también es conocida como retrocruzamiento asistido por marcadores (*marker-assisted backcrossing*, MABC), ya ha sido utilizada para mejorar la eficiencia de programas de mejora en tomate (Kim et al., 2019), cebada (Howell et al., 2014), trigo (Randhawa et al., 2009; Vishwakarma et al., 2016) o cacahuete (Shasidhar et al., 2020).

El grupo de mejora de la UMH, en colaboración con los grupos del Dr. Antonio Granell y del Dr. Antonio Monforte, ambos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), centro mixto de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), genotipó una colección de variedades tradicionales de tomate y algunas líneas de mejora con el chip SolCAP, cuyos resultados se están procesando actualmente. Además, fruto de la participación del grupo de mejora UMH en el proyecto europeo TRADITOM (coordinado por el Dr. Antonio Granell), comenzó un programa de mejora de tomate canario en 2017 financiado por Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife S.A. (CULTESA), utilizando MABC. A partir del chip SolCAP se seleccionaron 30 marcadores SNP, que se utilizan para genotipar las

plantas retrocruzadas mediante la Plataforma Sequenom de la Universidad de Valencia, permitiendo la rápida recuperación del genoma recurrente con resultados prometedores

Tabla 5. Marcadores de HRM diseñados para el programa de mejora UMH.

Ta: Tamaño del amplicón en la PCR; Tm: temperatura de *melting* media de los cebadores

Resistencia	Locus (ID NCBI)	Marcador	Cebadores (5'→3')	Ta (pb)	Tm (°C)
ToMV	<i>Tm-2</i> (AF536199)	T1	CCGCGCATGATGTATTTGGT AGCTTAGGATTAGAACCGAAGAACT	116	59,5
		T2	TTCAGTGATCCGAGTGAGCAAA GGAATGCTTCAGAGTTCAAGGC	103	59
		T3	TTTCAGTGATCCGAGTGAGCAA TTGGAGGGAATGCTTCAGAGTT	110	59
		T4	ACAGAGATCATCGTTTGGATG CGGGCATGCCAACTATGGAA	100	59
		T5	TCATCGTTTGGATGATGACT GGGCATGCCAACTATGGAAAC	92	58
		T6	GCCAATGCTTCACCTGACTTG CATGCCTGCAGTCACCACTA	93	60
		T7	AGTTGGGCCAATGCTTCACC CCTGCAGTCACCACTATGGC	95	60,5
		T8	GGAACATGACTTGCTTACGCT GGTCTCTAGACGTGTGAGCTT	92	59
TYLCV	<i>Ty-1/Ty-3</i> (NC_015443)	C1	TGATGTTGACGAACTTTGCTT TGGCGTTACCCAACAAGACA	147	58
		C2	TTGATGTTGACGAACTTTGCT GGCGTTACCCAACAAGACAG	147	58
		C3*	GAATTGGAGATTCTGGACCTG TTGTCTGATAAGCTGCATTAGTGT	175	58,5
		C4*	GCTATCATACGATCAGAGCATCA GCATCAGAACTTCATTTGATTG	101	59
		C5*	ACTTTTATGACAAGGCCAGCTT TCAAGGGTAGGTACAAGGTAGGA	100	59
TSWV	<i>Sw-5</i> (AA824939)	B1	CAGAGTCAACCTGGTCAACGA ACCATTCTTGTA AAACTTAAGGGGA	118	59
		B2	GTCAACCTGGTCAACGATGG ACCATTCTTGTA AAACTTAAGGGG	114	58
		B3	CGATGGTACCGATGGATCGAA TCAATAAACAGTATGACCAGCAAAA	137	58
TYLCV	<i>pelota</i> (KC447287)	ty-5*	TTGTTCTGATGGTTCTGGT TTTCTTCATCTGGGGTTTCA	112	53

*Marcadores diseñados y/o puestos a punto durante esta Tesis.

En sombreado, marcadores utilizados en el programa de mejora durante esta Tesis.

1.3.4. Registro de líneas e híbridos UMH

Desde el año 2011, el grupo de Biodiversidad y Mejora Genética de la UMH ha enviado varias líneas de mejora e híbridos UMH de tipos Muchamiel, De la pera, Cherry y De la pera morunos a la Oficina Española de Variedades Vegetales (<https://www.mapa.gob.es/>), logrando el registro y el título de obtención varietal de casi todos ellos (Tabla 6).

Las líneas UMH 1200 (Muchamiel) y UMH 1203 (De la pera), con los genes de resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV en homocigosis, se registraron en el año 2013. En general, ambas presentan características similares a los parentales tradicionales, aunque mostraron una reducción de la producción alrededor del 30-50% en ensayos realizados al aire libre (García-Martínez et al., 2011, 2012). En este sentido, Alonso et al. (2008) observaron efectos negativos relacionados con el gen *Ty-1* en homocigosis en caracteres productivos y de calidad del fruto, lo cual se confirmó posteriormente en un trabajo con líneas isogénicas Muchamiel y De la pera (Rubio et al. 2016). Estas conclusiones motivaron la obtención de líneas sin resistencia a TYLCV para evitar la pérdida de productividad y calidad asociada a la introgresión del *Ty-1*.

De todas las líneas obtenidas en el programa sin el gen *Ty-1*, se ha registrado una de tipo Muchamiel (UMH 1139), cuatro De la pera (UMH 1422, UMH 1415, UMH 1353 y UMH 1354) y dos de tipo Cherry (UMH 1401 y UMH 1402). Con ligeras diferencias morfológicas y de productividad, todas ellas son similares a los parentales tradicionales, especialmente en la calidad organoléptica del fruto (García-Martínez et al., 2014, 2015, 2016).

En 2019 se registraron dos interesantes líneas homocigóticas para los tres genes de resistencia. Por un lado, la línea UMH 1209 procede de una planta seleccionada en la sexta generación de retrocruzamiento del programa de mejora del tomate De la pera, cuyo fruto mostró espontáneamente un color achocolatado al madurar. Tras cuatro ciclos de autofecundación sin observar segregación para el color, se envió a registro la descrita como De la pera moruno. En este proceso también se obtuvo la línea UMH 1155, otra línea De la pera moruno pero sin resistencia a TYLCV (García-Martínez et al., 2020a). Por otro lado, también se registró la línea UMH 1400, procedente de una accesión de tomate cherry tradicional con fruto de cierta forma aperada (García-Martínez et al., 2020b).

Por último, se han registrado tres híbridos de tipo Muchamiel con los tres genes de resistencia en heterocigosis. UMH 1101xIF, que es un cruce entre la línea Muchamiel triple resistente UMH 1101 y la variedad americana Indische Fleisch (IF), se caracteriza por tener frutos de color rojo achocolatado, piel fina y buenos niveles de azúcares y acidez. El híbrido UMH 1200xBFT, registrado recientemente, comparte la mayoría de estas características, ya que se trata de un cruce entre UMH 1200 y la variedad rusa Black from Tula, con color de fruto achocolatado al

madurar y sabor muy dulce. En cambio, el híbrido UMH 1200xCG es un cruce entre UMH 1200 y una accesión del tipo varietal italiano Costoluto Genovese, caracterizándose por un acostillado muy acentuado. Todos ellos consiguen buenas producciones y una gran calidad de fruto, superando a otras importantes variedades comerciales en ensayos y catas comparativas realizadas por la Fundación Cajamar de la Comunidad Valenciana en el centro experimental de Paiporta (sin datos publicados). Sin embargo, estos híbridos no poseen muchas de las características del tomate Muchamiel al estar cruzados con otro tipo de variedades. Así, se obtuvieron nuevos híbridos para responder a las necesidades de los productores de tomate tradicional, cruzando líneas Muchamiel y De la pera triple resistentes con accesiones tradicionales de ambos tipos varietales.

Las líneas UMH 1353, UMH 1354, UMH 1400 y UMH 1401 fueron evaluadas agrónomicamente y organolépticamente durante el periodo 2011-2015, en ensayos repetidos anualmente. Durante esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el análisis de los datos obtenidos y se ha participado en la redacción de dos artículos que ya han sido publicados, en los cuales se detalla el origen y las características de cada una de las líneas, incluyendo las comparaciones con el parental recurrente correspondiente y con otras líneas UMH de características parecidas.

Tabla 6. Líneas e híbridos UMH enviados y registrados en la Oficina Española de Variedades Vegetales.

M: Muchamiel; P: De la pera; Pm: De la pera moruno; C: Cherry; HM: híbrido Muchamiel

Genotipos: homocigoto resistente (RR), homocigoto sensible (ss) y heterocigoto resistente (Rs)

	Tipo	Resistencias	Título de obtención varietal			Referencia
		ToMV TYLCV TSWV	Envío	Registro	Nº	
UMH 1200	M	RR RR RR	2011	2013	2618	García-Martínez et al. (2011b)
UMH 1203	P	RR RR RR	2011	2013	2619	García-Martínez et al. (2012)
UMH 1422	P	RR ss ss	2013	2017	2768	García-Martínez et al. (2014)
UMH 1139	M	RR ss RR	2013	2017	2769	García-Martínez et al. (2015a)
UMH 1415	P	RR ss RR	2013	2017	2770	García-Martínez et al. (2014)
UMH 1101xIF	HM	Rs Rs Rs	2014	2017	2786	-
UMH 1353	P	RR ss RR	2014	2017	2787	García-Martínez et al. (2016b)
UMH 1354	P	RR ss RR	2014	2017	2788	García-Martínez et al. (2016b)
UMH 1209	Pm	RR RR RR	2015	2019	2886	García-Martínez et al. (2020a)
UMH 1400	C	RR RR RR	2015	2019	2887	García-Martínez et al. (2020b)
UMH 1401	C	RR ss RR	2015	2019	2888	García-Martínez et al. (2020b)
UMH 1402	C	RR ss RR	2015	2019	2889	-
UMH 1200xBFT	HM	Rs Rs Rs	2017	2020	2928	-
UMH 1200xCG	HM	Rs Rs Rs	2017	2020	2929	-

En sombreado, líneas cuyo análisis agronómico y de calidad dio lugar a dos artículos durante esta Tesis Doctoral.

1.3.5. Presente y futuro en el programa: introgresión del gen *ty-5*

En el año 2017, el grupo de Biodiversidad y Mejora Genética de la UMH decidió complementar la resistencia a TYLCV en algunas líneas de mejora obtenidas anteriormente. Aunque el gen *Ty-1* concede una tolerancia fuerte a TYLCV, sabemos que este virus es capaz de romper las resistencias genéticas (García-Cano et al., 2008; Granier et al., 2019; Scott, 2006) debido a su alta tasa de mutación (Mejía et al., 2005). Existen distintas estrategias que se pueden adoptar para evitar esta situación y conseguir una mayor y mejor protección frente a este virus. Una de las más robustas es la combinación o piramidación de dos o más genes de tolerancia a TYLCV en la misma línea de mejora (Elbaz et al., 2016; Hutton et al., 2015; Prasanna et al., 2015; Vidavski et al., 2008).

Hasta la fecha, se han descubierto seis genes que confieren tolerancia a TYLCV en tomate: *Ty-1/Ty-3*, *Ty-2*, *Ty-4*, *ty-5* y *Ty-6*. Los genes alélicos *Ty-1/Ty-3* y el gen *Ty-2* son los más utilizados actualmente en los programas mejora genética de todo el mundo (Yan et al., 2018), ya que proporcionan un alto grado de tolerancia a la enfermedad y tienen carácter dominante. El gen *Ty-4* confiere un bajo nivel de resistencia, por lo que no es muy usado, y *Ty-6* ha sido descubierto recientemente (Yan et al., 2018). En el caso del gen *ty-5*, su carácter recesivo restringe su utilización en programas de mejora genética (Lapidot et al., 2015), sobre todo a la hora de obtener híbridos, al ser necesario que ambos parentales contengan el alelo en homocigosis. Sin embargo, algunos estudios han observado un alto grado de resistencia a TYLCV precisamente cuando *ty-5* se presenta en homocigosis, siendo incluso más robusta cuando se combina con otros genes como *Ty-2* (Elbaz et al., 2016). En este caso, se convierte en una opción excelente para la obtención de líneas puras, como es el caso de gran parte del programa de mejora de tomate UMH.

La complementación de la resistencia a TYLCV llevada a cabo por el Biodiversidad y Mejora Genética de la UMH se basó en la introducción del gen *ty-5* en diversas líneas de mejora UMH mediante un plan de cruzamientos y retrocruzamientos. Se escogieron dos líneas de mejora Muchamiel y cuatro De la pera con diferentes combinaciones de genes de resistencia y las mejores características productivas, morfológicas y de calidad de fruto posibles.

El gen ty-5

El alelo recesivo *ty-5* fue descubierto en el antiguo cultivar Tyking (Royal Sluis, Holanda), siendo identificado en el cromosoma 4 como locus *ty-5* (Anbinder et al., 2009; Hutton et al., 2012). Aunque Anbinder et al. (2009) sugirió que el origen de *ty-5* estaba asociado a un complejo de accesiones de *S. peruvianum*, Lapidot et al. (2015) encontró una transversión T por G en el primer exón del gen *pelota* entre diferentes accesiones de tomate cultivado, proponiendo este gen como responsable de la resistencia dentro del locus *ty-5*.

Wang et al. (2018c) llevaron a cabo el mapeo fino de la región del *ty-5* en el cromosoma 4. En un fragmento de 970 kbp, evaluaron el genotipo de 940 SNPs y 184 InDels anotados al comparar genéticamente plantas con fenotipos resistente y sensible a TYLCV. El gen *ty-5* se localizó en un intervalo genómico de 14,5 Kpb determinado por dos de estos SNPs, correspondientes a las posiciones físicas 3.116.418 y 3.130.934 pb del cromosoma 4. Este gen se corresponde con el gen *pelota*, el cual es un factor de vigilancia de RNA mensajero relacionado con la disociación de ribosomas, aunque no hay evidencia real de que proporcione resistencia a TYLCV. Dentro de *pelota* se localizaron dos SNPs en el promotor y uno en el primer exón entre los alelos resistente (*ty-5*) y sensible (*Ty-5*) (Figura 20), y se observó que la expresión de ambos no varía entre plantas infectadas y plantas libres del virus. Por tanto, los autores de este estudio sugieren que el alelo sensible *Ty-5* podría ser importante para la reproducción del virus en la célula, y que el SNP localizado en la región exónica de *pelota* represente una mutación que impida que esto ocurra.

El SNP del exón, asociado a la transversión T por G, permitió el diseño del marcador molecular de HRM asociado al *ty-5* que se utiliza en nuestro programa de mejora (Tabla 5).

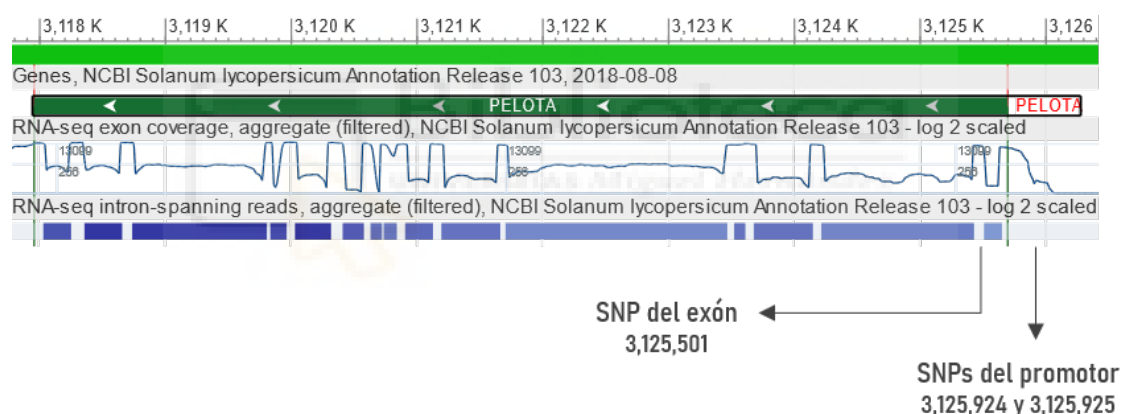


Figura 20. Gen *pelota* en el cromosoma 4 del tomate (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/101251671>). Se indica la posición física (pb) de los tres SNPs identificados por Wang et al. (2018c) entre los alelos *Ty-5* y *ty-5*.

Desarrollo del programa de introgresión del gen *ty-5*

Los cruzamientos entre las líneas UMH y la fuente de resistencia TX 468-RG (cedida por Rafael Fernández-Muñoz, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora' de Málaga, CSIC) se realizaron en el ciclo de otoño de 2017. La generación F₁ se retrocruzó en primavera de 2018 para obtener las plantas del BC₁, que se genotiparon y trasplantaron en otoño de ese mismo año. Las plantas adultas se seleccionaron fenotípicamente y se extrajeron las semillas BC₂. El proceso de selección genotípica y fenotípica se repitió en los ciclos de primavera y otoño de

2019, obteniendo los BC₃ y BC₄, respectivamente. Durante el ciclo de primavera-verano de 2020, se ha obtenido el retrocruce 5 (Figura 21).

En otoño de 2020, se seleccionarán plantas BC₅ de las líneas UMH 1200 y UMH 1406 con los genes de resistencia en heterocigosis. Se autofecundarán para obtener todas las combinaciones de genes de resistencia en homocigosis y estudiar el efecto de su introducción en caracteres agronómicos y de calidad.

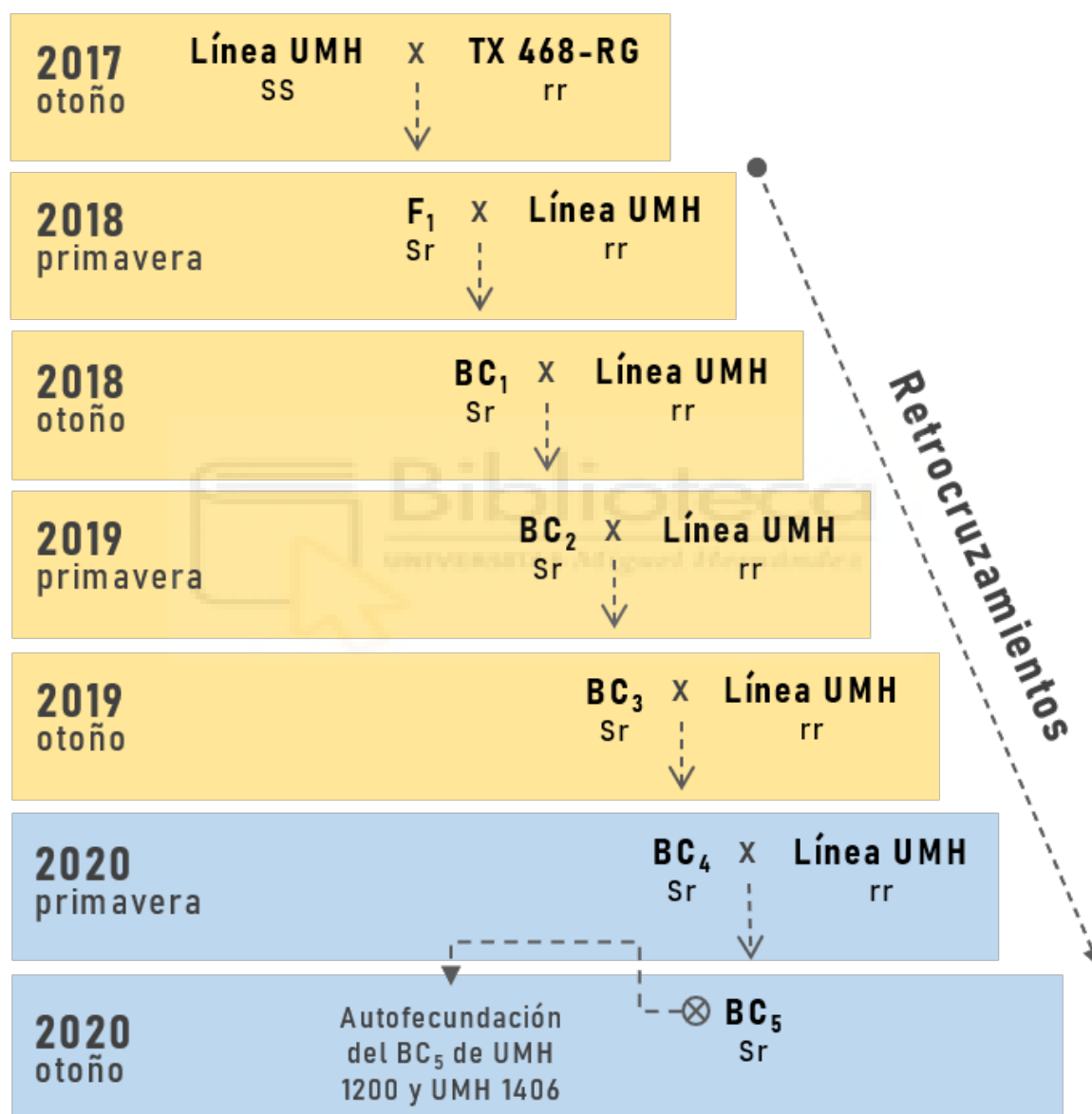


Figura 21. Esquema del programa de introducción del gen *ty-5* en las líneas de mejora UMH. En color amarillo aparecen las fases realizadas por completo durante el periodo de esta tesis. El alelo resistente *ty-5* es recesivo, por lo que **SS** se refiere al genotipo homocigoto sensible, **rr** al homocigoto resistente y **Sr** al heterocigoto sensible.

1.4. Las líneas de mejora UMH y la agricultura de resiliencia

La producción agrícola ha mejorado sustancialmente el acceso a alimento a un gran número de personas durante las últimas décadas. Sin embargo, este desarrollo ha originado también impactos sociales y medioambientales como la escasez de agua, la degradación del suelo o la pérdida de biodiversidad, amenazando la viabilidad de la agricultura en muchas regiones del mundo. De hecho, muchos éxodos rurales actuales en el planeta están relacionados con la pérdida de fertilidad del suelo y el creciente número de desastres ambientales derivados del cambio climático. Asegurar el acceso de calidad a la agricultura por parte de las comunidades más vulnerables debe ser un objetivo básico para la lucha contra la pobreza (ONU, 2018).

En la agricultura moderna se utilizan variedades mejoradas con alta dependencia a sistemas de altos insumos (Ceccarelli, 1996). Sin embargo, reducir el aporte de fertilizantes debe ser prioritario en el futuro, al mismo tiempo que se asegura la producción a nivel mundial. Y esto sólo es posible a través de la selección de variedades locales adaptadas a sistemas de bajos insumos y programas de mejora enfocados a la obtención de líneas con genotipos favorables en estos ambientes (Gallais & Coque, 2005; Vance, 2001). Las variedades tradicionales son un excelente punto de partida para estos programas, ya que muchas de ellas fueron seleccionadas por los agricultores en ambientes de bajos insumos y condiciones de estrés.

El cultivo en zonas no óptimas, como son aquellas con suelos salinizados o suministro de agua de riego salina, también debe ser contemplado. Las regiones áridas y semiáridas con agricultura de regadío de la zona mediterránea están altamente expuestas al fenómeno de salinización debido a las altas tasas de evapotranspiración, el bajo nivel de precipitaciones, la sobreexplotación y la intrusión marina (Munns, 2005; Pulido-Bosch et al., 2018). De esta forma, es fundamental conocer profundamente cómo debe ser el manejo del cultivo en estas zonas y estudiar qué variedades presentan tolerancia, no sólo para evitar los efectos negativos de la salinidad, sino también para desarrollar herramientas que mejoren la calidad del fruto. De hecho, se sabe que es posible aumentar el contenido en azúcares y acidez en variedades de tomate con alto grado de tolerancia a la salinidad cuando son cultivadas en ambientes salinos (Iglesias et al., 2015; Magán et al., 2008).

Durante esta Tesis Doctoral, se estudió la repuesta de seis líneas de mejora y dos híbridos Muchamiel y De la pera a la reducción drástica de fertilización y al riego con agua moderadamente salina. Se realizaron tres ensayos repetidos durante los ciclos de primavera de 2016, 2017 y 2018 en la finca de la EPSO-UMH, con el objetivo de evaluar el rendimiento y la calidad del fruto de las líneas e híbridos procedentes de variedades adaptadas a las condiciones del sureste peninsular. Los resultados de este estudio se muestran y se analizan en uno de los artículos que forman parte de la tesis (Carbonell et al., 2020).

1.5. Efecto de la introducción de genes de especies silvestres relacionadas

En una serie de ensayos realizados con líneas de introgresión (*Near Isogenic Lines*, NILs) de tomate Muchamiel y De la pera con diferentes combinaciones de resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV, (Rubio et al., 2016) encontraron descensos de hasta el 50% en producción en aquellas que contenían el gen *Ty-1*, así como una reducción en el contenido de acidez, afectando directamente a la calidad del fruto.

La introducción de genes procedentes de especies relativas silvestres es una práctica muy extendida desde la década de 1970. Sin embargo, no se conocen en profundidad los efectos de pleiotropía de estos genes sobre otras características fenotípicas, y tampoco qué influencia tiene el *linkage drag* o efecto de arrastre de ligamiento, el cual es debido a la falta de recombinación genética en las zonas cercanas al gen de interés. Dependiendo de diversos factores, como la posición del gen en el cromosoma o la presencia de inversiones cromosómicas, la introgresión de un gen de interés suele conllevar la introducción simultánea de genes asociados muy difíciles de eliminar mediante el retrocruzamiento. Por ejemplo, la introgresión del gen *Ty-1* en tomate lleva asociado un fragmento de 36 Mb de la especie silvestre *S. chilense*, lo que supone alrededor del 75% del cromosoma 6 (Hutton & Scott, 2017). La longitud de esta introgresión ha permanecido casi invariable debido a la supresión de recombinación originada por dos reordenamientos cromosómicos cuando *Ty-1* fue introgresado en el tomate cultivado a partir de *S. chilense* LA1969 (Verlaan et al., 2011). El fragmento ligado al gen *Tm-2a* es incluso mayor, permaneciendo invariable desde la década de 1970 en un altísimo porcentaje de las variedades de tomate modernas (Schouten et al., 2019). La introgresión de esta resistencia conlleva la introducción de 53 Mb procedentes de *S. peruvianum*, un 70% de la longitud del cromosoma 9 (Schouten et al., 2019; G. Zhu et al., 2018).

Algunos autores han evaluado la influencia de la introgresión de genes silvestres en características de interés en tomate (Brouwer & St. Clair, 2004; Tanksley et al., 1998) o tabaco (Lewis et al., 2007), concluyendo que los genes asociados al gen de interés son responsables de alteraciones fenotípicas en algunos casos. Sin embargo, la dimensión real de este fenómeno en tomate es prácticamente desconocida. Desde esta perspectiva, dentro del ensayo con líneas de mejora e híbridos UMH en condiciones de bajos insumos y salinidad realizado para esta Tesis Doctoral, se han evaluado de los efectos de la introducción de los genes *Tm-2a*, *Ty-1* y *Sw-5* sobre parámetros agronómicos y de calidad del fruto.

2

OBJETIVOS



El propósito principal de esta Tesis Doctoral fue desarrollar diferentes aspectos del programa de mejora de tomate del grupo de Biodiversidad y Mejora Genética de la UMH. Para ello, se plantearon dos objetivos principales diseccionados en varios subobjetivos cada uno:

- I. *Contribución al programa de mejora genética de tomate EPSO-UMH.*
 - a. Obtención de nuevas líneas de tomate.
 - b. Diseño y puesta a punto de nuevos marcadores moleculares para HRM.
 - c. Implementación de la técnica HRM en el programa de mejora.
 - d. Complementación de la resistencia a TYLCV mediante la introgresión del gen *ty-5* en líneas de mejora UMH.

- II. *Estudio del comportamiento de líneas de mejora e híbridos UMH con resistencias a virus en condiciones de agricultura de resiliencia.*
 - a. Evaluación de caracteres productivos y de calidad de líneas e híbridos UMH de tipo Muchamiel y De la pera en condiciones de cultivo de bajos insumos y riego con salinidad moderada.
 - b. Evaluación del efecto de la introgresión de genes de resistencia procedentes de especies silvestres de tomate en diversos parámetros agronómicos y de calidad.

3 MATERIALES Y MÉTODOS



Contribución al programa de mejora genética de tomate EPSO-UMH

Ensayos previos al registro de líneas de mejora

Antes del registro de las líneas UMH obtenidas en el programa de mejora, se llevaron a cabo una serie de ensayos para evaluar sus características agronómicas y de calidad y realizar la comparativa con el parental tradicional correspondiente.

En el caso de las líneas UMH 1353 y UMH 1354, se realizaron cuatro ensayos en el ciclo de primavera-verano de los años 2011-2014. El primero de ellos fue al aire libre y el resto bajo el invernadero de malla de la finca EPSO-UMH. En el caso de las líneas UMH 1400 y UMH 1401, se llevaron a cabo tres ensayos en la primavera de los años 2013, 2014 y 2015 bajo el invernadero de malla. En cada ensayo, se establecieron dos repeticiones de 6-7 plantas para cada una de las líneas, con crecimiento vertical a un tallo y densidad de 2,5 plantas/m². La fertilización fue la convencional para tomate en la zona.

Se evaluó el rendimiento comercial, el peso medio del fruto, el número de frutos por planta y el contenido de acidez (%) y sólidos solubles totales del fruto (°Brix). Se realizaron ANOVAS para cada uno de los parámetros evaluados en cada año de ensayo por separado, comparando las líneas UMH 1400 y UMH 1401 con el parental cherry tradicional, y las líneas UMH 1353 y UMH 1354 con la accesión De la pera P21 y otras líneas de mejora UMH De la pera.

Diseño de marcadores moleculares para HRM

Durante la tesis, se diseñó un marcador asociado al gen *Ty-1* y se puso a punto el marcador del gen *ty-5* facilitado por el Dr. Rafael Fernández-Muñoz (Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora' de Málaga, CSIC), adecuados ambos para la técnica HRM.

El diseño del nuevo marcador de *Ty-1* se basó en la selección de polimorfismos de tipo SNP procedentes del array SolCAP (Sim et al., 2012), ubicados en la región de los genes Solyc06g051170, Solyc06g051180 y Solyc06g051190 del genoma SL2.50 ITAG2.4 (Sol Genomics Network, SGN; <http://solgenomics.net/>), los cuales codifican conjuntamente el gen *Ty-1* (Verlaan et al., 2013). Se escogieron los SNPs solcap_sl_snp_100298, solcap_sl_snp_44625 y solcap_sl_snp_44650, correspondientes con tres loci polimórficos entre variedades tradicionales Muchamiel y De la pera sin resistencias genéticas y líneas de mejora UMH con el gen *Ty-1* (datos no publicados). A partir de ellos, se diseñaron diferentes cebadores mediante el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) y se seleccionaron los más adecuados para HRM en base al tamaño del amplicón de PCR, la temperatura de *melting* y el grado de complementariedad.

Puesta a punto de marcadores moleculares para HRM

Para comenzar la puesta a punto de los nuevos marcadores de *Ty-1*, se utilizaron las concentraciones de los reactivos y las condiciones de PCR y *melting* de los marcadores diseñados anteriormente por Alonso et al. (2015). Como material vegetal, se escogieron plantas homocigóticas resistentes (conteniendo *Ty-1* en homocigosis) y sensibles a TYLCV para evaluar qué marcador distinguía con más claridad estos genotipos.

En la puesta a punto del gen *ty-5* se utilizó la línea de mejora TX 468-RG como control homocigoto resistente, la cual fue facilitada por el Dr. Fernández-Muñoz. También se emplearon líneas de mejora UMH sin *ty-5* como control homocigoto sensible, e híbridos entre estas y TX 468-RG como individuos heterocigotos. Se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de MgCl₂ y cebadores, así como a diferentes temperaturas de anillamiento de los cebadores, número de ciclos de PCR y duración de cada etapa de la PCR.

Análisis HRM

Para la extracción de ADN, se comenzó utilizando el método recomendado del CTAB (Murray & Thompson, 1980). Poco después se reemplazó por el método del SDS (Dellaporta et al., 1983), ya que es más sencillo y no requiere trabajar en campana de extracción de gases. En todos los análisis posteriores se resuspendió el precipitado de ADN en 50 µl de agua estéril, realizándose a continuación una dilución 1/10 para reducir la concentración inicial de 150-300 ng/µl a 15-30 ng/µl, que es lo recomendable para HRM. En todas las pruebas se utilizaron dos controles homocigotos resistentes, dos heterocigotos y dos homocigotos sensibles asociados a cada uno de los marcadores.

Para realizar la PCR y la etapa de *melting* se utilizó el instrumento Lightcycler® 480 de Roche y su *software* asociado, así como las placas de 96 pocillos y los reactivos proporcionados por esta marca. El volumen total de reacción fue de 10 µl, la cual se compone por 9,5 µl de mezcla y 0,5 µl de ADN de cada una de las muestras. El *Master mix* 5x de Roche incluye la AptaTaq Fast DNA Polimerasa, dNTPs, el colorante intercalante del ADN y el tampón de mezcla.

La mezcla de reacción para los marcadores T4 y B3 se compone de un volumen de 5 µl de *Master mix* 5x, 1,2 µl de MgCl₂ 25 nM (concentración final de 3 mM), 0,2 µl de cada cebador (concentración final de 0,2 mM) y 2,9 µl de agua del kit de Roche. Las condiciones de PCR y *melting* fueron las mismas para ambos marcadores, con un primer paso de desnaturalización del ADN seguido de 45 ciclos de PCR y un posterior aumento gradual de temperatura o etapa de *melting* (Figura 22). El ciclo umbral (C_t) a partir del cual se produce el crecimiento exponencial de la curva

de PCR es inferior a 30 en los dos marcadores. Para la visualización de los resultados se utilizó el *software* asociado al Lightcycler® 480.

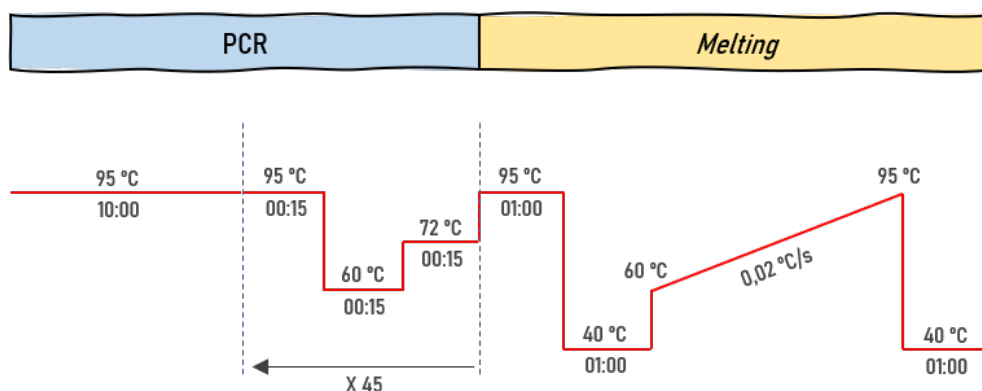


Figura 22. Protocolo de HRM utilizado para los marcadores T4 y B3.

Etapas del programa de introducción del gen *ty-5*

Todos los ciclos de cruzamiento y retrocruzamientos se llevaron a cabo en el invernadero de policarbonato del grupo de Biodiversidad Agrícola y Mejora Genética, ubicado en la finca de la EPSO-UMH de Orihuela, España (38°4'N, 0°58'W y 25m sobre el nivel del mar). Se realizaron dos ciclos por año, uno en primavera-verano y otro en otoño-invierno, empezando en el ciclo de otoño-invierno de 2017. Cada ciclo comprende las etapas de siembra, selección genotípica, trasplante, polinización, selección fenotípica y recolección de frutos (Tabla 7). Las semillas se sembraron en un semillero comercial situado en Albatera (Alicante) y se trasplantaron al invernadero al cabo de 40-50 días, tras realizar la selección genotípica con HRM. El cultivo de las plantas fue hidropónico en sacos de perlita, creciendo en vertical a un tallo principal. Se realizó fertirrigación convencional para tomate, con una conductividad eléctrica (CE) del agua alrededor de 2 dS/m. La polinización fue manual, con el marcado de frutos polinizados mediante la eliminación de sépalos. Tras la evaluación de los retrocruces, se recolectaban los frutos de las plantas seleccionadas para extraer la semilla.

Tabla 7. Calendario aproximado y etapas en cada ciclo de cultivo.

Etapas	Ciclo de primavera						Ciclo de otoño				
	F	M	A	My	J	Jl	A	S	O	N	D
Siembra	■						■				
Genotipado		■					■				
Trasplante		■					■				
Polinización			■	■					■	■	
Fenotipado					■					■	
Recolección					■	■				■	■

Material vegetal del programa de introducción del gen *ty-5*

Como parentales recurrentes se escogieron las líneas de mejora Muchamiel UMH 1200, con resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV, y UMH 1139, con resistencia a ToMV y TSWV. También se eligieron cuatro líneas De la pera: UMH 1203 y UMH 1406, con resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV, UMH 1354, con resistencia a ToMV y TSWV, y UMH 1422, resistente únicamente a TSWV (Figura 23). La línea UMH 1139 es más productiva y posee mayor nivel de acidez en fruto que UMH 1200 (García-Martínez et al., 2011, 2015). Las líneas De la pera UMH 1354 y UMH 1422 presentan características productivas y de calidad de fruto muy superiores a UMH 1203 (García-Martínez et al., 2016), mientras que la línea UMH 1406 se caracteriza por producir un gran número de frutos de tamaño reducido, con un peso medio menor a 70 g.

Como fuente de resistencia conteniendo el gen *ty-5* en homocigosis se utilizó la línea TX 468-RG (Figura 23), obtenida a partir del híbrido comercial Tyking (Royal Sluis, Países Bajos). Las semillas fueron proporcionadas por el Dr. Fernández-Muñoz, perteneciente al grupo de mejora genética de Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora' de Málaga.

Selección fenotípica de retrocruces en el programa de introducción del gen *ty-5*

La selección fenotípica de las plantas adultas se efectuó a partir de las evaluaciones realizadas por tres o cuatro componentes del grupo de mejora, divididos en dos grupos. Se evaluaron todos los retrocruces plantados en el invernadero durante cada ciclo mediante la puntuación de diversas características relacionadas con la planta y, especialmente, con el fruto (Tabla 8). Las escalas de puntuación escogidas en cada ciclo fueron determinadas por consenso entre los distintos evaluadores, estableciendo valores máximos y mínimos asociados a los extremos presentes entre todas las plantas del invernadero. Tras la evaluación de cada característica, se realizaba una valoración global de la planta puntuando 1, 2 o 3, lo cual fue fundamental para la selección de las mejores plantas dentro de cada familia.

Tabla 8. Plantilla de evaluación utilizada en el fenotipado de retrocruces, con escala de puntuación para cada característica. El rizado del fruto se evaluó en los Muchamiel, y la forma bombilla en los De la pera.

Hojas				Planta	Incidencia de virus	
Amarillas	Secas	Necrosis	Color	Vigor		
0-1-2-3-4	0-1	0-1	1-2-3	1-2-3	1-2-3	
Fruto						
Cuajado	Hombro	Forma ideal	Rizado / Forma bombilla	Cicatriz pistilar	Tamaño	Peseta
1-2-3	0-1-2-3	1-2-3-4-5	1-2-3-4-5	1-2-3	1-2-3	0-1-2-3



Figura 23. Líneas de mejora UMH y línea TX 468-RG (planta y frutos) utilizadas como parentales en el programa de introducción del gen *ty-5*. Se especifican en la imagen los genes de resistencia en homocigosis que contiene cada una: *Tm-2a* (ToMV), *Ty-1* (TYLCV), *Sw-5* (TWSV) y *ty-5* (TYLCV).

II

Estudio del comportamiento de líneas de mejora e híbridos UMH con resistencias a virus en condiciones de agricultura de resiliencia

Ensayos de campo

Los ensayos se llevaron a cabo durante la primavera de los años 2016, 2017 y 2018 en la finca experimental de la EPSO-UMH. El cultivo de las plantas fue en suelo, protegidas por un invernadero de malla. En cada condición, se establecieron dos repeticiones de 6-7 plantas cada una para cada línea e híbrido, con crecimiento vertical a un tallo y densidad de 2,5 plantas/m².

Material vegetal

Se utilizaron tres líneas Muchamiel y tres De la pera con diferentes combinaciones de los genes de resistencia *Tm-2a*, *Ty-1* y *Sw-5* en homocigosis, y un híbrido de cada tipo varietal con los mismos tres genes en heterocigosis, obtenidos en el programa de mejora EPSO-UMH. Los híbridos proceden del cruce de una línea Muchamiel (UMH 1101) y la variedad tradicional americana Indische Fleisch (IF) por un lado, y el cruce de una línea De la pera (UMH 1203) y la accesión tradicional De la pera P21 por otro. Ambos híbridos se escogieron por su gran rendimiento y calidad en ensayos preliminares. Los cultivares tradicionales Muchamiel y De la pera no fueron incluidos en el ensayo debido a su gran susceptibilidad a ToMV, el cual es habitual en esta zona.

Condiciones de cultivo

Las líneas y los híbridos crecieron en condiciones de cultivo de tipo convencional, salino y de bajos insumos, en los mismos sectores del suelo cada año. El agua de riego utilizada en los sistemas convencional y salino fue tomada del río Segura, con una conductividad eléctrica (CE) en torno a 0,6 dS/m. En estas dos condiciones, la fertilización fue la comúnmente utilizada en esta zona para tomate, caracterizada por un estercolado antes del trasplante y el suministro de fertilizantes inorgánicos mediante fertirrigación durante el cultivo. Además, en el sector salino se añadió NaCl₂ al riego de forma progresiva, comenzando con un aporte mínimo a los 30-40 días del cultivo hasta alcanzar alrededor de 6 dS/m de CE en el agua de riego durante las últimas 6-7 semanas de cultivo. En bajos insumos no fue aplicado ningún tipo de abonado y se regó con agua potable para asegurar la ausencia de residuos fertilizantes procedentes del río.

Medición de la conductividad eléctrica

En cada condición de cultivo, se midió la CE del agua de riego en dos puntos diferentes y también en el suelo a 15 y 30 cm de profundidad, por medio de dos sondas en cada nivel. La CE del agua de riego se midió diariamente durante 11 semanas (desde mayo hasta el final de julio), mientras la CE de las sondas se midió 2-3 veces cada una de estas semanas.

Recogida de datos

El rendimiento fue expresado como el peso de todos los frutos recogidos por planta (Kg/planta). También se registró el número de frutos totales y el peso medio del fruto por planta. La incidencia de podredumbre apical (*blossom-end rot*, BER) o *peseta* en las líneas De la pera fue calculada como el número de frutos afectados por planta, y el porcentaje de peseta como la ratio entre el número de frutos afectados y el número total de frutos por planta. La recolección se extendió desde el final del mes de junio hasta finales de julio.

Para el análisis de la calidad organoléptica, se seleccionaron tres muestras por repetición y línea, con 3-4 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en el estado de maduración comercial propio de este tipo de tomates (Figura 24). A partir del triturado de las muestras se midió la cantidad de sólidos solubles totales (en °Brix) y el contenido en acidez expresado en % de ácido cítrico.

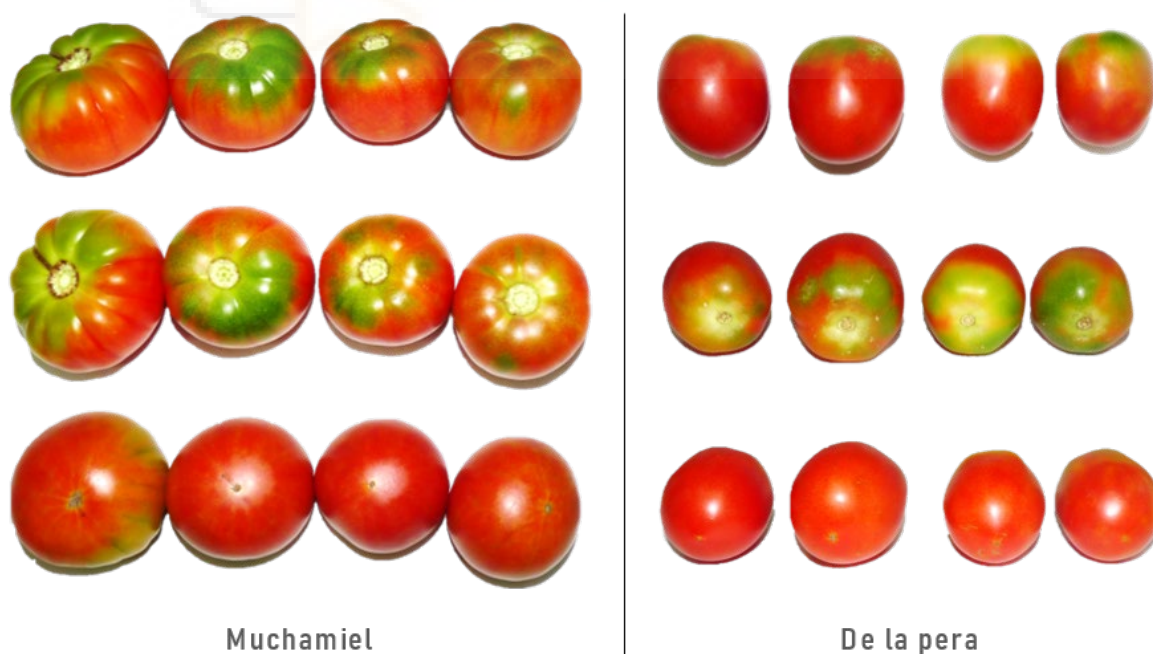


Figura 24. Frutos Muchamiel y De la pera en estado de maduración comercial o 'pintón'. Fotografías en diferente perspectiva de los mismos frutos.

Análisis estadístico

Las plantas afectadas por TYLCV o desórdenes fisiológicos con importantes pérdidas de vigor y rendimiento fueron excluidas del estudio.

Se realizó un análisis ANOVA con un diseño *Split-plot* con los años como bloque (factor aleatorio), las condiciones de cultivo como parcela (fijo) y las líneas como subparcela (fijo) para cada parámetro evaluado, separando por tipo de tomate. Se calcularon los gráficos de interacción y los intervalos LSD al 95% entre las líneas y las condiciones de cultivo. Los ANOVAS y los intervalos LSD se determinaron mediante el procedimiento general de modelos lineales de Statgraphics Centurion XVII v. 17.2.00.

Se calcularon las correlaciones de Pearson y la significancia estadística entre todos los parámetros evaluados con las medias de cada línea para cada parámetro, año y condición. También se calcularon las correlaciones entre los parámetros y las diferentes CEs con las medias de cada condición para cada año.



4

PUBLICACIONES



A continuación, se expone la transcripción literal de las publicaciones científicas que componen esta Tesis Doctoral, organizadas en función de los objetivos marcados:

I

Contribución al programa de mejora genética de tomate EPSO-UMH

García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., **Carbonell, P.**, Ruiz, J.J. (2016). New breeding lines resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the 'De la pera' tomato type: UMH 1353 and UMH 1354. *HortScience* 51(4):456–458. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.4.456>

García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., **Carbonell, P.**, Salinas, J.F., Cabrera, J.A., Ruiz, J.J. (2020). UMH1400 and UMH1401: New Cherry Tomato Breeding Lines Resistant to Virus. *HortScience* 55(3):395–396. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14710-19>

Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J.F., García-Martínez, S., Ruiz, J.J. (2018). Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer resistance from wild types to local landraces— From the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS). *Diversity*, 10 (1), 12. <https://doi.org/10.3390/d10010012>

II

Estudio del comportamiento de líneas de mejora e híbridos UMH con resistencias a virus en condiciones de agricultura de resiliencia

Carbonell, P., Salinas, J.F., Alonso, A., Grau, A., Cabrera, J.A., García-Martínez, S., Ruiz, J.J. (2020). Effect of low inputs and salinity on yield and quality – A 3-year study in virus-resistant tomato (*Solanum lycopersicum* L.) breeding lines and hybrids. *Scientia Horticulturae*, 260, 108889. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108889>

I
Biblioteca
Contribución al programa de mejora genética
de tomate EPSO-UMH

New breeding lines resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the 'De la pera' tomato type: UMH 1353 and UMH 1354

2016

Santiago García-Martínez, Adrián Grau, Aránzazu Alonso, Fernando Rubio, Pedro Carbonell y Juan J. Ruiz

HortScience, 51(4), 456-458

DOI

10.21273/HORTSCI.51.4.456

ISSN

0018-5345

Categoría JCR

Horticulture

Factor de Impacto (2016)

0,848

Factor de impacto (5 años)

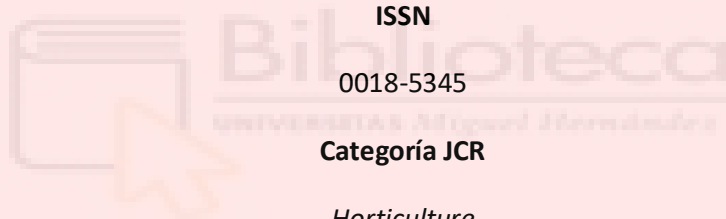
1,162

Cuartil

Q2

Rango

14/36



New breeding lines resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the 'De la pera' tomato type: UMH 1353 and UMH 1354

Santiago García-Martínez, Adrián Grau, Aránzazu Alonso, Fernando Rubio, Pedro Carbonell and Juan J. Ruiz¹

Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel, km 3.2, 03312, Orihuela, Spain.

¹Corresponding author. E-mail: juanj.ruiz@umh.es

Received for publication 9 Dec. 2015. Accepted for publication 24 Feb. 2016.

Additional index words. ToMV, TSWV, *Tm-2a* gene, *Sw-5* gene.

'De la pera' is a tomato landrace that is very popular in a limited area in southeastern Spain. The fruits from this landrace are juicy and have a firm texture, a strong flavor, and a high proportion of seeds and mucilage. The fruit weight ranges between 75 and 125 g, and fruits are elongated-oval to bell-like in shape, with dark green shoulders and no ribs. Like all tomato landraces, De la pera cultivars are highly susceptible to several viruses, such as *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Picó et al., 2002). A breeding program for introgression of resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV into several tomato landraces has been carried out over the last 15 years at the Miguel Hernández University (Spain). The breeding line UMH 1203, homozygous for *Tm-2^a*, *Ty-1*, and *Sw-5* genes, was the first obtained within the 'De la pera' tomato type (García-Martínez et al., 2012). This breeding line has enabled farmers to obtain acceptable harvests despite intense virus incidence conditions. Nevertheless, important decreases in yield have been reported for this breeding line, ranging between 40% and 50% at low virus incidence conditions (García-Martínez et al., 2012). These results are likely due to introgressed genes and/or linkage drag from the wild tomato species from which the resistance genes originally come, as has been previously reported in processing tomatoes (Tanksley et al., 1998) and in tobacco (Lewis et al., 2007). Previous work indicates that the introgression of TYLCV resistance has been responsible for most of the decrease in yield obtained in fresh tomatoes (Rubio et al., 2012). For this reason, breeding lines UMH 1422 (with only ToMV resistance) and UMH 1415 (with ToMV and TSWV resistance) were developed (García-Martínez et al., 2014). These lines have shown better marketable yields than UMH 1203 and yields similar to those of the traditional De la pera cultivar 21 (P21). Furthermore, the new breeding lines UMH 1353 and UMH 1354 are available for cropping in the spring-summer crop cycle, when the level of TYLCV incidence is lower. These new breeding lines UMH 1353 and UMH 1354, with genetic resistance to ToMV and TSWV, have shown higher marketable yields than the previously developed breeding lines UMH 1422 and UMH 1415 (around

35% greater in open field trial and ranging between 15% and 20% greater in mesh-covered net house trials) (Table 1).

Table 1. Yield traits, titratable acidity (TA), and soluble solids content (SSC) of the two new breeding lines. The previously released breeding lines UMH 1415, UMH 1422, and UMH 1203 and De la pera cultivar P21 are included as reference. All the accessions were grown in the spring-summer crop cycle during the last 4 years, under the typical growing conditions of the region.²

	Marketable yield (kg/plant) ^y	Avg fruit wt (g) ^y	Fruit no. per plant ^y	TA (g/100 g) ^x	SSC (°Brix) ^x
Open field, 2011					
UMH 1353	4.89 ^w c	90.5 b	53.8 c	0.57 c	4.59
UMH 1354	4.21 c	80.9 ab	53.2 c	0.49 b	4.46
UMH 1415	3.29 b	75.7 a	43.2 b	0.43 b	4.31
UMH 1203	2.41 a	76.9 a	32.1 a	0.44 b	4.52
P21	4.54 c	114.2 c	40.8 b	0.34 a	4.47
Mesh-covered net house, 2012					
UMH 1353	5.12 c	86.6 b	51.9 c	0.71 b	5.20
UMH 1354	4.57 c	77.6 ab	50.2 c	0.69 b	5.28
UMH 1422	3.94 b	80.5 ab	43.6 b	0.57 ab	5.22
UMH 1415	3.79	94.3 c	36.6 b	0.55 ab	5.00
UMH 1203	2.38 a	72.5 a	29.5 a	0.43 a	5.17
P21	3.56 b	82.5 ab	38.2 b	0.48 a	5.23
Mesh-covered net house, 2013					
UMH 1353	5.73 c	74.2 b	77.6 b	0.40 b	4.57 a
UMH 1354	4.37 b	63.5 ab	71.7 b	0.49 c	4.58 a
UMH 1422	3.97 b	60.5 ab	66.3 b	0.31 a	4.74 ab
UMH 1415	4.09 b	60.6 ab	68.9 b	0.36 ab	4.92 b
UMH 1203	2.59 a	54.9 a	46.5 a	0.36 ab	4.62 a
P21	3.03 a	71.3 b	42.3 a	0.35 a	4.71 ab
Mesh-covered net house, 2014					
UMH 1353	4.77 bc	75.1 b	64.2 b	0.42 c	5.69 abc
UMH 1354	4.99 c	76.6 b	65.2 b	0.36 b	5.48 a
UMH 1422	4.12 b	63.9 a	64.4 b	0.33 b	5.59 ab
UMH 1415	4.32 b	66.8 ab	64.7 b	0.35 b	5.80 bc
UMH 1203	2.49 a	72.1 ab	35.1 a	0.29 a	6.33 d
P21	2.55 a	65.5	40.5 a	0.33 b	5.93 c

²Plants were grown vertically with a single stem, with black plastic mulch to reduce the incidence of weeds, with 2.7 plants/m² in open field and 2.5 plants/m² in mesh-covered net house.

^yMean of 6–8 plants per plot for two replicates.

^xMean of 10 fruits in the same stage of ripening (with >50% of the surface showing red color) per plot for two replicates.

^wMean values in a column followed by a different letter are significantly different according to the Newman-Keuls's multiple range test (P < 0.05).

Origin

The breeding lines UMH 1353 and UMH 1354 were obtained by crossing a De la pera cultivar (accession P21, previously selected for fruit morphological characteristics, uniformity, and high yields) with the commercial cultivar Anastasia F₁ (Seminis Vegetable Seeds, Saint Louis, MO). Anastasia F₁ was used as the donor parent of the *Tm-2^a* and *Sw-5* genes (Pérez de Castro et al., 2007), conferring resistance to ToMV and TSWV, respectively. Six generations of backcrossing were performed to the De la pera cultivar using marker-assisted selection for the virus-resistance genes (Table 2). Several trials were carried out under different infection conditions (mechanical inoculation for ToMV and natural infection for TSWV) to check for the presence of resistance alleles in the first backcross (BC) generations and to assess the effectiveness of the molecular markers. In addition, high selection pressure for desirable 'De la pera' characteristics (bell shape, green shoulder, low sensitivity to blossom-end rot) and good agronomic behavior (proper fruit set, sufficient uniformity among fruits and yields) was applied during the backcrossing process. Progenies for each BC generation were screened with molecular markers for *Tm-2^a* and *Sw-5* genes. All plants containing the set of the two resistance genes (usually between five and 10 plants) were transplanted and then crossed with the recurrent parent. Only the best plants (between two and four) were selected for further backcrossing. After the selfing of two BC₆ double heterozygous plants, followed by two generations of selfing and selection, the pure-breeding UMH 1353 and UMH 1354 lines, homozygous for *Tm-2^a* and *Sw-5* (Table 3), were selected using molecular markers. These lines were then multiplied by self-pollination in a greenhouse under controlled conditions.

Table 2. Primer sequence, PCR conditions, and restriction enzyme using the molecular markers linked to *Tm-2a* and *Sw-5* genes.

Gene	Primer sequence	PCR conditions		
		Cycles (no.)	Annealing temp (°C)	Restriction enzyme
<i>Tm-2^a</i>	AGGTTGTTGCACCGATTGAT AAGCCGTTCCGATAAACTGA	35	55	BsuRI
<i>Sw-5</i>	AAGCCGAATTATCTGTCAAC GTTCTGACCATTACAAAAGTAC	35	50	TruI

PCR = polymerase chain reaction.

Description and Performance

UMH 1353 and UMH 1354 have indeterminate growth with intermediate foliage density and medium-sized fruits (70–90 g) with bell shape and green shoulders (Fig. 1). Both lines are homozygous for the *Tm-2^a* and *Sw-5* resistance genes (Table 3). Between 2011 and 2014, we cultivated UMH 1353 and UMH 1354 breeding lines together with three previously developed breeding lines and the cultivar P21 in different conditions (open field and in mesh-covered net houses) in the spring-summer crop cycle, the most widely used cycle in the traditional area of cultivation for the ‘De la pera’ tomato. In terms of desirable agronomic traits, UMH 1353 and UMH 1354 surpassed UMH 1203 breeding line that contained resistance to ToMV, TYLCV, and TSWV. The increase in marketable yield was especially significant for the UMH 1353 and UMH 1354 lines, which obtained nearly double the marketable yields of the UMH 1203 line (Table 1). The marketable yields of the UMH 1353 and UMH 1354 breeding lines surpassed the yields of the previously developed breeding lines in three of the four studied cycles. The marketable yields of these new lines ranged between 4.21 kg/plant and 5.73 kg/plant, which are high for a tomato landrace. In terms of the number of fruits produced, the increases among the new breeding lines with respect to the previously developed lines were similar to increases in marketable yield (around 50%). With respect to the average fruit weight, however, differences between the lines were less pronounced, with the new lines showing increases of around 15% to 20% with respect to the other lines studied. Furthermore, UMH 1353 and UMH 1354 obtained titratable acidity values similar to or higher than the other breeding lines. In terms of soluble solids content, significant differences were only found in two of the four studied cycles, with the UMH 1353 and UMH 1354 breeding lines showing similar or lower values with respect to the previously released breeding lines and the traditional cultivar. The small differences between UMH 1353 and UMH 1354 breeding lines can be seen in Table 1.

Table 3. Genotype for each resistance gene (RR: resistant homozygous, ss: susceptible homozygous) for the two new breeding lines. The UMH 1415, UMH 1422, and UMH 1203 breeding lines and De la pera cultivar P21 are included as reference.

Breeding Line / Cultivar	Genotype		
	<i>Tm-2a</i>	<i>Ty-1</i>	<i>Sw-5</i>
UMH 1353	RR	ss	RR
UMH 1354	RR	ss	RR
UMH 1422	RR	ss	ss
UMH 1415	RR	ss	RR
UMH 1203	RR	RR	RR
P21	ss	ss	ss



Fig. 1. Plants with fruits in different ripening stages of the breeding lines UMH 1353 and UMH 1354.

Use

UMH 1353 and UMH 1354 have genetic resistance to ToMV and TSWV, viruses that often infect tomato landrace crops in southeastern Spain, especially in open field conditions (Cebolla-Cornejo et al., 2007). This study found that 67% and 18% of the farms or smallholdings analyzed near the city of Valencia were infected with ToMV and TSWV, respectively. The two new breeding lines UMH 1353 and UMH 1354 are available for cropping in the spring-summer production cycle, which is the most important cycle in the traditional area of cultivation for the 'De la pera' tomato. This is when the level of TYLCV incidence is less intense due to the low population levels of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Genn.). Cultivation of these breeding lines is also feasible in the summer-autumn cycle (when the level of TYLCV incidence is higher), either in greenhouses or mesh-covered net houses with an enclosure in good condition, making it possible to effectively control the vector. As described above, these two new breeding lines have shown higher marketable yields than the previously developed breeding lines. As with previous releases produced by this breeding program, UMH 1353 and UMH 1354 are under study to be marketed by private companies. These breeding lines may be used to develop F₁ hybrids by crossing them with other 'De la pera' landraces to increase yield by using genetic resistance to ToMV and TSWV in a heterozygous state. Furthermore, these new lines can also be used in breeding programs to facilitate the introgression of these resistance genes into other landraces.

Availability

Small trial seed samples of all the breeding lines are available for research purposes (please contact authors).

Literature cited

- Cebolla-Cornejo, J., S. Soler, and F. Nuez. 2007. Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: Tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *Intl. J. Plant Prod.* 1(2):113–128.
- García-Martínez, S., A. Grau, A. Alonso, F. Rubio, M. Valero, and J.J. Ruiz. 2012. UMH 1203, a multiple virus-resistant fresh-market tomato breeding line for open-field conditions. *HortScience* 47:124–125.
- García-Martínez, S., A. Grau, A. Alonso, F. Rubio, M. Valero, and J.J. Ruiz. 2014. UMH 1422 and UMH1415: Two fresh-market tomato breeding lines resistant to Tomato mosaic virus and Tomato spotted wilt virus. *HortScience* 49:1465–1466.

- Lewis, R.S., L.R. Linger, M.F. Wolff, and E.A. Wernsman. 2007. The negative influence of N- mediated TMV resistance on yield in tobacco: Linkage drag versus pleiotropy. *Theor. Appl. Genet.* 115:169–178.
- Pérez de Castro, A., J.M. Blanca, M.J. Díez, and F. Nuez. 2007. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 117:347–356.
- Picó, B., J. Herraiz, J.J. Ruiz, and F. Nuez. 2002. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Sci. Hort.* 94(1–2):73–89.
- Rubio, F., S. García-Martínez, A. Alonso, A. Grau, M. Valero, and J.J. Ruiz. 2012. Introgressing resistance genes into traditional tomato varieties: Effects on yield and quality. *Acta Hort.* 935:29–33.
- Tanksley, S.D., D. Bernachi, T. Beck-Bunn, D. Emmatty, Y. Eshed, S. Inai, J. Lopez, V. Petiard, H. Sayama, J. Uhlig, and D. Zamir. 1998. Yield and quality evaluations on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the *Tm2a* gene for resistance to the Tobacco mosaic virus. *Euphytica* 99:77–83. 458



**UMH1400 and UMH1401:
new Cherry tomato breeding lines resistant to virus**

2020

Santiago García-Martínez, Adrián Grau, Aránzazu Alonso, Pedro Carbonell, Juan F. Salinas, José A. Cabrera y Juan J. Ruiz

HortScience, 55(3), 395-396

DOI

10.21273/HORTSCI14710-19

ISSN

0018-5345

Categoría JCR

Horticulture

Factor de Impacto (2018)

0,906

Factor de impacto (5 años)

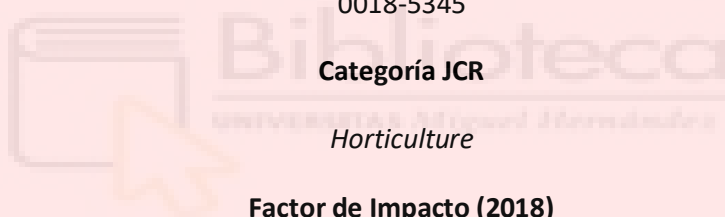
1,130

Cuartil

Q2

Rango

17/36



UMH1400 and UMH1401: new Cherry tomato breeding lines resistant to virus

Santiago García-Martínez, Adrián Grau, Aránzazu Alonso, Pedro Carbonell, Juan F. Salinas, José A. Cabrera and Juan J. Ruiz

Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel, km 3.2, 03312, Orihuela, Spain.

J.J.R. is the corresponding author. E-mail: juanj.ruiz@umh.es.

Received for publication 18 Nov. 2019. Accepted for publication 3 Jan. 2020. Published online 17 February 2020.

Cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) is a commercial type including cultivars with several growth habits (determinate, semi determinate, and indeterminate), with long clusters and fruits weighting between 10 and 30 g. In the last years, cherry tomato has shown an increasing market share. Like all tomato landraces, cherry cultivars are susceptible to several viruses, such as Tomato mosaic virus (ToMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Tomato yellow curl virus (TYLCV) (Cebolla-Cornejo et al., 2007), PepMV (Gómez et al., 2012), ToTV (Verbeek et al., 2007), or ToLCNDV (Juárez et al., 2019). A breeding program for introgressing of resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV into several tomato landraces has been carried out over the last 20 years at Miguel Hernández University (Spain) (Carbonell et al., 2018). The breeding line UMH1400 (homozygous for *Tm-2a*, *Ty-1*, and *Sw-5* genes) and UMH1401 (homozygous for *Tm-2a* and *Sw-5* genes) are the first releases obtained within the cherry tomato type in the EPSO-UMH tomato breeding program. These breeding lines enable farmers to obtain acceptable harvests despite intense virus incidence conditions. Nevertheless, important decreases in yield have been reported for the breeding line UMH1400 (with TYLCV resistance), ranging between 35% and 48%. Previous work indicates that the introgression of TYLCV resistance has been responsible for most of the decrease in yield obtained in fresh tomatoes (Rubio et al., 2012). For this reason, breeding line UMH1401 (without TYLCV resistance) was developed. This line has shown better marketable yield than traditional cherry cultivar and similar titratable acidity (TA) and soluble solid content (SSC).

Additional index words. *Solanum lycopersicum*, ToMV, TSWV, TYLCV, *Tm-2a* gene, *Sw-5* gene, *Ty-1* gene.

Origin

The breeding lines UMH1400 and UMH1401 were obtained by crossing a cherry cultivar [accession cherry pera, previously selected for fruit morphological characteristics, uniformity, and high quality (Ruiz and García-Martínez, 2009)] with the commercial cultivar Anastasia F1 (Semini Vegetable Seeds, Saint Louis, MO). ‘Anastasia F1’ was used as the donor parent of the *Tm-2a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes (Pérez de Castro et al., 2007), conferring resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV, respectively. Twelve generations of backcrossing were performed to the cultivar cherry pera using Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) markers for assisted selection for the virus resistance genes (García-Martínez et al., 2016). Several trials were carried out under different infection conditions (mechanical inoculation for ToMV and natural infection for TSWV) to check for the presence of resistance alleles in the first backcross (BC) generations and to assess the effectiveness of the molecular markers. Progenies for each backcross generation were screened with molecular markers for *Tm-2a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes, described in García-Martínez et al. (2016). In each BC progenie, only plants containing the three resistance genes (usually between 5 and 10 plants) were transplanted and then crossed with the recurrent parent cherry pera. Only the best plants per progenie (usually between two and four) were selected for further backcrossing. This selection was based on desirable cherry characteristics (fruit shape and size, low sensitivity to blossom-end rot), good agronomic behaviour (proper fruit set, sufficient uniformity among fruits and yields), and high quality (soluble solid content and titratable acidity). After the selfing of one BC12 triple heterozygous plant, followed by two generations of selfing and selection, the pure-breeding line UMH1400 (homozygous for *Tm-2a*, *Sw-5*, and *Ty-1*) and UMH1401 (homozygous for *Tm-2a* and *Sw-5*) (Table 1) were selected using molecular markers. These lines were then multiplied by self-pollination in a greenhouse under controlled conditions.

Table 1. Genotype for each resistance gene [resistant homozygous (RR) and susceptible homozygous(ss)] for the two new breeding lines. Cultivar cherry pera is included as reference.

Breeding Line / Cultivar	Genotype		
	<i>Tm-2a</i>	<i>Ty-1</i>	<i>Sw-5</i>
UMH1400	RR	RR	RR
UMH1401	RR	ss	RR
Cherry pera	ss	ss	ss

Description and Performance

UMH1400 and UMH1401 breeding lines have an indeterminate growth habit with intermediate foliage density and small-sized fruits (8–16 g) in a bell shape. UMH1400 is homozygous for the *Tm-2a*, *Sw-5*, and *Ty-1* resistance genes, while UMH1401 is homozygous for the *Tm-2a* and *Sw-5* resistance genes only (Table 1). Between 2013 and 2015 we cultivated UMH1400 and UMH1401 breeding lines together with the cultivar cherry pera in a mesh-covered net house in the spring–summer crop cycle, the most widely used cycle in the traditional area of cultivation for tomato in south-eastern Spain. UMH1400 shows significant decreases with respect to cultivar cherry pera in marketable yield (ranging between 35% and 48%), average fruit weight (except year 2013) (about 15%), and fruit number per plant (ranging between 18% and 40%), as well as in titratable acidity (TA) (ranging between 17% and 35%) and soluble solid content (SSC) (about 15%) (Table 2). These decreases are due to the introgressed genes themselves and/or to the linkage drag associated with the *Ty-1* gene, which confers resistance to TYLCV (Rubio et al., 2016). The negative effect of resistance gene introduction from wild relatives has been previously described in tomatoes for industrial use (Tanksley et al., 1998) and for fresh consumption (Brouwer and St. Clair, 2004) and in tobacco (Lewis et al., 2007). UMH1401 shows a significant increment with respect to the cultivar cherry pera in marketable yield (ranging between 15% and 35%) and average fruit weight (ranging between 18% and 39%). No significant differences have been found for the average fruit weight, TA and SSC. In previous works, breeding lines without TYLCV resistance had higher TA and SSC (ranging between 5% and 15%) than recurrent parentals in some crop cycles, both ‘Muchamiel’ (García-Martínez et al., 2015) and ‘De la pera’ types (García-Martínez et al., 2016). Comparing the breeding lines, UMH1400 shows significant decreases with respect to UMH1401 in marketable yield (ranging between 48% and 65%), average fruit weight (ranging between 15% and 33%), fruit number per plant (ranging between 35% and 63%), TA (ranging between 19% and 26%) and SSC (ranging between 10% and 17%) (Table 2). As previously mentioned, these decreases are due to the TYLCV resistance introgression.

Use

UMH1400 and UMH1401 breeding lines have genetic resistance to ToMV and TSWV, which often infect tomato landrace crops in south-eastern Spain, especially in open field conditions (Cebolla-Cornejo et al., 2007). The two new breeding lines are available for cropping in the spring–summer production cycle, which is the most important cycle in the traditional area of cultivation for the tomato in south-eastern Spain, when the level of TYLCV incidence is less intense due to the low population levels of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Genn.). Cultivation of these breeding

lines is also feasible in the summer–autumn cycle (when the level of TYLCV incidence is higher), either in greenhouses or mesh-covered net houses with an enclosure in good condition, making it possible to effectively control the vector. The UMH1400 breeding line, with TYLCV resistance, is available also for open-air cropping, where the viruses' incidence is especially intense, allowing farmers to obtain an acceptable yield. These breeding lines may be used to develop F1 hybrids by crossing them with other cherry landraces to increase yield by using genetic resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV in a heterozygous state.

Table 2. Yield traits, titratable acidity (TA), and soluble solids content (SSC) of the two new breeding lines. Cultivar cherry pera is included as reference. All the accessions were grown in the spring–summer crop cycle during 3 years, under the typical growing conditions of the region.^w

	Marketable yield (kg/plant) ^z	Avg fruit wt (g) ^z	Fruit number per plant ^z	TA (g/100 g) ^y	SSC (°Brix) ^y
2013					
UMH1400	2.22 ^x a	58.2	38.4 a	0.32 a	4.7 a
UMH1401	3.14 b	67.2	50.0 b	0.40 b	5.2 b
Cherry pera	-	-	-	-	-
2014					
UMH1400	2.67 a	53.4 a	49.8 a	0.44 a	5.5 b
UMH1401	4.47 c	61.4 b	73.1 b	0.60 b	5.6 b
Cherry pera	3.51 b	64.9 b	53.7 a	0.63 b	5.3 a
2015					
UMH1400	2.75 a	58.7 a	50.1 a	0.39	5.2 b
UMH1401	4.83 b	72.7 b	66.4 b	0.36	5.5 c
Cherry pera	4.13 a	76.9 b	56.2 a	0.36	4.3 a

^zMean of six to eight plants per plot for two replicates. The experiments were completely randomized designs.

^yMean of 10 fruits in the same stage of ripening (with >50% of the surface showing red color) per plot for two replicates.

^xMean values in a column followed by a different letter are significantly different according to the Newman–Keuls's multiple range test ($P < 0.05$).

^wPlants were grown vertically with a single stem, with black plastic mulch to reduce the incidence of weeds, with 2.5 plants/m² in a mesh-covered net house.

Availability

Small trial seed samples of the breeding lines are available for research purposes (please contact authors).

Literature Cited

- Carbonell, P., A. Alonso, A. Grau, J.F. Salinas, S. García-Martínez, and J.J. Ruiz. 2018. Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: Transfer resistance from wild types to local landraces— From the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS). *Diversity* 10:12.
- Brouwer, D.J. and D.A. St.Clair. 2004. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor. Appl. Genet.* 108:628–638.
- Cebolla-Cornejo, J., S. Soler, and F. Nuez. 2007. Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: Tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *Int. J. Plant Prod.* 1(2):113–128.
- García-Martínez, S., A. Grau, A. Alonso, F. Rubio, P. Carbonell, and J.J. Ruiz. 2015. UMH 916, UMH 972, UMH 1093, UMH 1127, and UMH 1139: Four fresh-market breeding lines resistant to viruses within the Muchamiel tomato type. *HortScience* 50:927–929.
- García-Martínez, S., A. Grau, A. Alonso, F. Rubio, P. Carbonell, and J.J. Ruiz. 2016. New breeding lines resistant to Tomato mosaic virus and Tomato spotted wilt virus within the ‘De la Pera’ tomato type: UMH 1353 and UMH 1354. *HortScience* 51:456–458.
- Gómez, P., R.N. Sempere, M.A. Aranda, and S.F. Elena. 2012. Phylodynamics of Pepino mosaic virus in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 134:445– 449.
- Juárez, M., M.P. Rabadán, L.D. Martínez, M. Tayahi, A. Grande-Pérez, and P. Gómez. 2019. Natural hosts and genetic diversity of the emerging Tomato leaf curl New Delhi virus in Spain. *Front. Microbiol.* 10:140.
- Lewis, R.S., L.R. Linger, M.F. Wolff, and E.A. Wernsman. 2007. The negative influence of N- mediated TMV resistance on yield in tobacco: Linkage drag versus pleiotropy. *Theor. Appl. Genet.* 115:169–178.
- Pérez de Castro, A., J.M. Blanca, M.J. Díez, and F. Nuez. 2007. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 117:347–356.
- Rubio, F., S. García-Martínez, A. Alonso, A. Grau, M. Valero, and J.J. Ruiz. 2012. Introgressing resistance genes into traditional tomato varieties: Effects on yield and quality. *Acta Hort.* 935:29–33.

- Rubio, F., A. Alonso, S. García-Martínez, and J.J. Ruiz. 2016. Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Scientia Hort.* 198:183–190.
- Ruiz, J.J. and S. García-Martínez. 2009. Tomato varieties ‘Muchamiel’ and ‘De la Pera’ from the southeast of Spain: Genetic improvement to promote on-farm conservation. In: M. Vetelainen, V. Negri, and N. Maxted (eds.). *European landrace: On-farm conservation, management and use*. Biodiversity Technical Bulletin No 15; Bioversity International, Rome, Italy.
- Tanksley, S.D., D. Bernachi, T. BeckBunn, D. Emmatty, Y. Eshed, S. Inai, J. Lopez, V. Petiard, H. Sayama, J. Uhlig, and D. Zamir. 1998. Yield and quality evaluations on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the *Tm2a* gene for resistance to the Tobacco mosaic virus. *Euphytica* 99:77–83.
- Verbeek, M., A.M. Dullemans, J.F.J. Van den Heuvel, P.C. Maris, and R.A.A. Van der Vlugt. 2007. Identification and characterization of Tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. *Arch. Virol.* 152:881– 890.



**Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer
resistance from wild types to local landraces—From the first
molecular markers to genotyping by sequencing (GBS)**

2018

Pedro Carbonell, Aránzazu Alonso, Adrián Grau, Juan Francisco Salinas, Santiago
García-Martínez y Juan José Ruiz

Diversity, 10 (1), 12

DOI

10.3390/d10010012

ISSN

1424-2818

Categoría SJC (Scimago)

Agricultural and Biological Sciences (miscellaneous)

Indicador SJR (2018)

0,604

Cuartil

Q1

Rango

62/274

Twenty years of tomato breeding at EPSO-UMH: transfer resistance from wild types to local landraces—From the first molecular markers to genotyping by sequencing (GBS)

Pedro Carbonell, Aránzazu Alonso, Adrián Grau, Juan Francisco Salinas, Santiago García-Martínez and Juan José Ruiz*

Department of Applied Biology, Miguel Hernández University, Carretera Beniel km 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain.

pcarbonell@umh.es (P.C.); aalonso@umh.es (A.A.); agrau@umh.es (A.G.); salinas.kiter.92@gmail.com (J.F.S.); sgarcia@umh.es (S.G.-M.)

*Correspondence: juanj.ruiz@umh.es; Tel.: +34-096-674-9615.

Received: 8 November 2017; Accepted: 25 February 2018; Published: 27 February 2018.

Abstract: In 1998, the plant breeding team at the School of Engineering of Orihuela (EPSO), part of the Miguel Hernández University (UMH) in Elche, commenced a tomato breeding program. Marker-assisted selection and backcrossing were used to simultaneously introduce three genes (*Tm-2a*, *Ty-1* and *Sw-5*) that confer resistance to relevant viruses, such as tomato mosaic virus (ToMV), tomato yellow curl virus (TYLCV), and tomato spotted wilt virus (TSWV), to traditional varieties of local tomatoes, specifically the “Muchamiel” and the “De la pera” types. After each backcross, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) molecular markers were used to select the plants with the resistance genes of interest. A previously described marker was used for TSWV, and new markers were designed for ToMV, and TYLCV using available sequences in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. In parallel to the breeding program, several molecular markers—Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), Simple Sequence Repeats (SSRs), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), and (GATA)₄ probes—were used to study genetic variability, and to identify a collection of Spanish and Italian traditional tomato varieties. The results showed a limited genetic variability among cultivated tomato varieties. The breeding lines Muchamiel UMH 1200, and De la pera 1203 (both with homozygous resistance to the three viruses) were the first new varieties that were obtained. They were included in the Register of Protected Plant Varieties in 2013. Lines without a resistance to TYLCV were also developed and protected in 2017. We have begun to use SNP massive genotyping for studies of genetic association, and for selecting plants with the *Ty-1* gene with less linkage drag. Molecular markers have been extremely useful in identifying the different steps of the tomato breeding program at EPSO-UMH.

Keywords: Muchamiel; De la pera; ToMV; TYLCV; TSWV

1. Introduction

Over the years, traditional agriculture has produced an enormous range of local plant varieties that have been adapted to specific environmental conditions and for local uses and preferences. With no knowledge of genetics or statistics, farmers have created new varieties by saving the seeds from the best plants for the following year. These plants have been selected for their organoleptic qualities (including flavor, aroma and texture), their adaptation to the local environment (resistance to frost and drought, proper fruit set, etc.), and their suitability for different local uses (such as fresh consumption, canning, and drying). In southeastern Spain, there are a number of local tomato varieties, including the “Muchamiel” from Alicante, the “Tres cascós” from Elche, the “De la pera” from the Vega Baja del Segura region of Alicante, the “Valenciano” from Valencia, the “Flor de Baladre” from Murcia, and the “Morunos” from different regions. The Muchamiel and the De la pera, which have traditionally been cultivated in the province of Alicante, are particularly esteemed for their exceptional organoleptic quality. In local markets, they can be sold at a price that is six times higher than that of hybrid varieties [1].

Intensive farming, however, requires varieties that are consistently and highly productive in different systems and cycles, that are exceptionally uniform in size, shape and color, and that show a certain level of resistance to the different infestations, diseases and disorders that can affect the crop. Traditional varieties tend to fall short in at least one of these categories.

In fact, many traditional tomato varieties in southeastern Spain are endangered because of their high susceptibility to the three main viruses affecting tomatoes in the area: tomato mosaic virus (ToMV), tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), and tomato spotted wilt virus (TSWV) [2]. Because of these viruses, in addition to other factors, traditional tomatoes are less attractive to farmers than modern hybrids, which are resistant to these viruses and are also far more productive. Yet, giving up on the traditional varieties could result in an irreversible loss of vital genetic variability [3]. For economic reasons, improving upon varieties with a limited market share is not a priority for seed companies and therefore should be undertaken by public institutions [4].

2. Genetic variability studies in tomato

Morphological traits (such as the shape, size, and color of the different parts of the plant), and agronomical traits (such as yield, the ability to set in adverse conditions, and resistance to different biotic and abiotic stresses) are often very useful to distinguish traditional and commercial tomato varieties, even by visual inspection. However, there are other traits that can only be detected by using analytical methods. This is the case for the levels of different key components (such as sugars, acidity, or microelements), and the volatile compounds responsible for aroma. To

study these traits, which are subtler than the more obvious differences, it is often necessary to use a specific methodology. Despite the fact that these subtle differences (such as fruit composition) are more difficult to see, they are, nevertheless, equally as important as the more obvious differences. We already know that cultivated tomatoes have a narrow genetic base [5].

This narrow genetic base is probably due to the bottleneck effect that occurred during tomato domestication [5]. Based on estimates made with DNA markers, the relative species of wild tomatoes are much more variable than their cultivated counterpart at the whole genome level. It is estimated that the genomes of tomato cultivars contain <5% of the genetic variation of their wild counterparts [5]. In other words, cultivated tomatoes vary tremendously in their fruit size, shape, color, firmness, soluble solids, volatile aroma content, and acidity, but have little genetic variation elsewhere in their genome [6,7]. In one study, notable differences in parameters, such as flavor, texture and micronutrient content, between the traditional Muchamiel and De la pera varieties, and a modern F₁ hybrid, were found [8]. Four years later, different aromatic profiles in Muchamiel accessions, De la pera accessions, and a F₁ hybrid, were also found [9].

3. Molecular markers in variability studies

Despite these previous findings and observations, it had not been possible to distinguish the phenotypic variation among the characterized accessions at the genetic level. For this reason, in parallel to the breeding program, our group began to study variability using different molecular markers, which would make it possible to distinguish between the different traditional varieties and to coherently organize them according to genotype. Our group believed this would be an informative and exceptionally powerful approach in the breeding program. Tomato was one of the first crops in which molecular markers were used to study genetic variability. In the genetic variability studies of tomato, a number of DNA markers, such as SSR [10,11] and AFLP [12], were successfully used. SSR [13,14] and (GATA)4 probes [15,16] were also successfully used for variety identification.

Our group has performed a range of variability studies, mostly using accessions from closely related traditional European tomato varieties. In these studies, we have been able to confirm the efficacy of certain molecular markers in differentiating between varieties, and in grouping similar varieties together. The results of the different marker analysis studies that we have carried out are detailed below, and are summarized in Table 1.

Table 1. Markers used in the genetic variability studies.

Marker	Number	Number of Bands	% of Polymorphic Bands	Usability
SRAP	26	384	60	Distinguish between cultivar types, wild relatives and 14 of 16 traditional cultivars studied
SSR	10 + 9	77	98	Distinguish between cultivar types, wild relatives and 23 of 34 traditional cultivars studied
AFLP	7	470	40	Distinguish between cultivar types, wild relatives and 24 of 31 traditional cultivars studied
(GATA)4	N.A.	30	100	Distinguish between cultivar types, Spanish traditional cultivars and 4 of 10 Italian traditional cultivars studied
SNP	41	N.A.	76	Distinguish traditional cultivars from modern cultivars, hybrids and wild relatives

N.A.: Not applicable.

3.1. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP)

The SRAP technique is based on an amplified polymerase chain reaction (PCR), and it is designed to detect polymorphisms in the DNA sequence [17].

In 2005, we carried out a variability study using SRAP and single sequence repeat (SSR) markers in traditional Spanish varieties, including the Muchamiel, the De la pera, the Moruno, commercial hybrids, and wild tomato species [18]. A total of 26 not specific for tomato primers were used. These primers made it possible to identify polymorphisms between the main varieties, and to distinguish between cultivar types and the wild relatives under study (De la pera, Muchamiel, Moruno, hybrids, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense* and *S. peruvianum*). It was even possible to differentiate between the different accessions within each group. Although the SRAP markers are dominant and not very polymorphic, they have significant coverage throughout the genome and produce a more in-depth variability study than the SSRs used in the same analysis. SRAP, for example, made it possible to distinguish between the Mexican variety of Zapotec tomato and the Spanish varieties, which SSRs were unable to do.

3.2. Simple Sequence Repeat (SSR)

SSR markers, or microsatellites, are short tandem repeats in DNA sequences, mostly between two and four base pairs (bp) [19]. These markers are highly polymorphic because the repeated sequences vary significantly between the different genotypes.

In the study mentioned above [18], our group used 10 previously selected microsatellites for tomato. With only three SSRs, we were able to differentiate between the three main types of cultivated tomatoes under study (Muchamiel, De la pera and Moruno). Nevertheless, despite using 10 SSRs, we were unable to differentiate between the different cultivars within each varietal type, which could be done using SRAP. SSR markers are highly polymorphic, but they are concentrated in very specific loci within the genome, and they have very little genomic coverage. As a result, we were unable to find polymorphisms between highly similar accessions.

In a second study, we used up to 19 microsatellites selected for tomato, but we were unable to distinguish between all of the cultivars evaluated, even though there were clear phenotypical differences. Nevertheless, only four SSRs were necessary to differentiate between the three main varietal groups (Muchamiel, De la pera, and Moruno) [20].

The results of both studies demonstrate the minimal genetic variability among cultivated tomato varieties.

3.3. Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs)

AFLPs are molecular markers used to detect polymorphisms in the DNA sequence. After the restriction enzyme digestion of DNA, certain fragments are selected for amplification [21].

In a variability study conducted by our group [20], the obtained results were compared using 19 microsatellites and seven combinations of AFLP markers. The AFLPs made it possible to distinguish between the main varietal groups, although out of the 43 accessions studied, there were seven that could not be identified with certainty, and they were all traditional Spanish varieties. Using the SSR analysis, 11 accessions could not be differentiated, and, once again, they were all Spanish varieties. Curiously, the seven accessions that could not be identified using AFLPs were different from the 11 in the SSR analysis. This means that all of the cultivars used in the study could be identified using a combination of both markers.

Once again, the results showed the limited genetic variability among cultivated tomato varieties.

3.4. (GATA)4 probes

Labelled (GATA)4 probes are molecular markers based on the hybridization of a short sequence (16 nucleotides, with the GATA motif repeated four times), which hybridizes when it finds a complementary sequence [22]. The (GATA)4 technique was developed in 1995, and it has been used to successfully distinguish between varietal types, and also between different accessions [15,16,23].

In 2013, researchers at UMH and the Università degli Studi di Napoli Federico II (Naples, Italy) performed a variability study of traditional Spanish and Italian varieties, including accessions from the Muchamiel, and the De la pera type tomatoes, and the Italian varieties San Marzano, and Sorrento [24]. The (GATA)4 probes could clearly detect differences between all of the Spanish accessions studied, but not the Italian accessions. Furthermore, the researchers found polymorphisms between different plants within a single accession in 14 of the 26 accessions studied (in a previous study, SSRs were only able to detect polymorphisms in two out of the 16 accessions studied). This level of polymorphism is not unusual, given that small-scale farmers have not traditionally considered crop uniformity as an essential factor in their selection process.

The results of this study confirmed that (GATA)4 probes are a powerful tool for studying variability between closely related tomato accessions. The markers are able to distinguish between plants at a much deeper level than SSRs, SRAPs, and AFLPs.

3.5. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

A SNP is a variation in a single nucleotide in the DNA sequence [25]. SNPs are the most abundant polymorphisms in the genome, making them highly useful in both genetic variability and phylogenetic studies.

Our group studied 41 SNPs, obtained from expressed sequence tags (ESTs), in several different tomato varieties, including traditional varieties (mostly Spanish), commercial hybrids, and wild tomato varieties [26]. These markers were selected because they were readily detected on standard agarose or polyacrylamide gels, which was the equipment available in our laboratory at that time. This study found that it was not possible to differentiate between all of the traditional cultivars, although the researchers were able to distinguish between wild accessions and hybrid varieties.

The level of polymorphism found in this SNP study was therefore lower than the levels found in previous studies on the Muchamiel, De la pera, and Moruno varieties using SSRs, AFLPs, and SRAPs. This was perhaps due to the fact that the SNPs were obtained from ESTs, which are coding regions of DNA that show fewer mutations than non-coding regions and where it is typical to find

more variability. Perhaps it would have been more interesting to study SNPs that are outside functional genes, which are highly polymorphic regions [27].

4. Traditional tomato variety breeding program

In 1998, the plant breeding team at the School of Engineering of Orihuela (EPSO), part of the Miguel Hernández University (UMH) in Elche, commenced a breeding program using marker-assisted backcrossing in order to simultaneously introduce genes that confer resistance to the three most relevant viruses found in traditional local tomato varieties, specifically in the Muchamiel and the De la pera types. We have used the genes *Tm-2a*, and *Sw-5*, which come from the wild tomato *Solanum peruvianum* L. [28,29] to confer resistance to ToMV, and TSWV, respectively, and the gene *Ty-1*, which confers resistance to TYLCV and originated in another wild tomato series, the *Solanum chilense* (Dunal) Reiche accession LA1969 [30].

We have performed the following steps in our program: agronomic characterization of the traditional varieties and of the sources of resistance; performance of crossings; performance of backcrossings; fixation of the resistance genes; selection of the best lines; and application for registration in the Spanish Register of Protected Plant Varieties.

As mentioned above, the first step in the breeding program was to characterize and select the most suitable plant material. Since the program aims to help preserve the genetic variability of certain traditional tomato varieties in southeastern Spain, it was essential to fully understand the plant material before proceeding.

5. Molecular markers in resistance gene introgression

The first step in our breeding program was to characterize different accessions of interest in order to select those that met the minimum quality standards. Based on these characterizations, we selected M18 Muchamiel accession, and P21 De la pera accession to be used as traditional parentals in the program. The next step was to manually cross these accessions with the F₁ hybrid Anastasia (Semini Vegetable Seeds), which is a source of resistance that contains the genes *Tm-2a*, *Sw-5*, and *Ty-1*.

The descendants obtained from the traditional varieties were repeatedly backcrossed with the initial parents in order to recover as much of the genome as possible. After each backcross, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) molecular markers were used to select the plants with the resistance genes of interest. To do this, it was necessary to use specific markers that would efficiently recognize the presence or absence of these genes.

CAPS markers are short DNA fragments amplified by PCR and later digested by restriction enzymes, which produces a pattern of bands that makes it possible to distinguish between homozygous and heterozygous individuals. The CAPS markers used thus far in the breeding program are detailed below.

High selection pressure for desirable traditional cultivar characteristics (such as shape, and organoleptic quality) and good agronomic behaviour (proper fruit set, sufficient uniformity among fruits, and yields) was applied during the backcrossing process. Only the best plants (between one and three per progeny) were selected for further backcrossing.

5.1. CAPS linked to the *Sw-5* gene

The CAPS markers we used to select individuals resistant to TSWV have been successful thus far in the breeding program [31].

5.2. CAPS linked to the *Ty-1* gene

The ApsF-2 marker was developed specifically for this breeding program from the isoenzyme marker Aps [32]. In earlier studies and in this breeding program, ApsF-2 has proven to be a suitable marker for confirming TYLCV tolerance.

5.3. CAPS linked to the *Tm-2a* gene

Initially, we tried to use two previously described CAPS markers [33,34]. After determining that these markers did not work correctly with our material, we designed new CAPS markers, using the allele sequences *Tm-2a* (AF536201) and *tm-2* (AF536199), which were entered into the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database [35].

5.4. Other examples of tomato breeding programs with MAS (Marker-Assisted Selection)

Tomato was among the first crop species for which genetic markers were suggested as indirect selection criteria for breeding purposes and for which molecular markers and maps were developed [36,37]. Private companies do not disclose the markers that they use. However, there seems to be a considerable use of markers for various purposes, including testing hybrid purity, screening breeding populations for disease resistance, and marker assisted backcross breeding [38]. The use of MAS in tomato breeding in public research institutions is well documented. The breeding programs that use MAS and send their results to the Register, are summarized in Table 2.

Table 2. Public research institutions with tomato breeding programs, coordinators and objectives.

Breeding Program	Coordinators	Traits
University of Florida	J.W. Scott and S.F. Hutton	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Stemphyllium solani</i> , TSWV, TYLCV
University of North Carolina	R.G. Gardner	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Alternaria solani</i> , TSWV
United States Department of Agriculture	J.R. Stommel	Beta carotene content
Ohio State University	M. Francis	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>

6. Lines obtained in the EPSO-UMH breeding program

When we consider that the characteristics of the traditional variety have been recovered (after five to eight backcross generations, depending on the line) and the pure-breeding lines have been obtained, selecting the plants that show homozygous resistance due to introgressed genes is necessary. These plants were selected using the three CAPS markers and the progenies were obtained by self-pollination during the last backcross generation.

In 2013, the EPSO-UMH breeding program obtained its first plant variety certificates for the lines UMH 1200 (a Muchamiel-type tomato), and UMH 1203 (De la pera), which both show homozygous resistance to the three viruses of interest (Table 3). The morphological characteristics and quality of these lines are similar to those found in the traditional varieties from which they are derived. Nevertheless, homozygous resistance to TYLCV considerably reduces production (up to 40%), particularly in TYLCV-free conditions, which are possible in greenhouse cultivation [39,40]. This decrease in production is due to the introgressed genes themselves and/or to the linkage drag associated with the resistance genes, particularly the *Ty-1* gene. This problem has been previously described in tomatoes for industrial use [41], in tobacco [42], and in tomatoes for fresh consumption [43].

In an attempt to avoid these problems, we have developed lines that are not resistant to TYLCV. Within the Muchamiel type, we have developed the lines UMH 1093, UMH 1127, and UMH 1139, which all have homozygous resistance to ToMV, and TSWV. UMH 1139 obtained a plant variety certificate in 2017. Within the De la pera type, we have developed the line UMH 1422 (with homozygous resistance to ToMV), and the lines UMH 1415, UMH 1353, and UMH 1354 (which all have homozygous resistance to ToMV and TSWV). All of these De la pera lines obtained plant variety certificates in 2017. The morphological characteristics and quality of these lines are similar to those found in the traditional varieties they are derived from, and there is no drop in production like that

which occurs in UMH 1200, and in UMH 1203. These lines are therefore of great interest for cultivation purposes in TYLCV-free conditions, which can be achieved in a greenhouse with sufficient control measures, particularly in the spring season, when TYLCV occurs less frequently [44–46].

Table 3. Breeding lines registered in the Register of Protected Plant Varieties, with their genotypes for the three virus resistance genes. RR: resistant homozygote, Rs: resistant heterozygote, ss: sensitive homozygote.

Varietal Type	Line	Resistance	
		ToMV-TYLCV-TSWV	Sent to Registry
Muchamiel	UMH 1200	RR-RR-RR	2011
Muchamiel	UMH 1139	RR-ss-RR	2013
Muchamiel	UMH 1101xIF	Rs-Rs-Rs	2014
De la pera	UMH 1203	RR-RR-RR	2011
De la pera	UMH 1422	RR-ss-ss	2013
De la pera	UMH 1415	RR-ss-RR	2013
De la pera	UMH 1353	RR-ss-RR	2013
De la pera	UMH 1354	RR-ss-RR	2013

All of these improved lines possess homozygous resistance genes, and therefore, they can be cultivated by farmers year after year using a rigorous selection process.

In order to grow tomatoes outdoors in an environment with a high incidence rate of TYLCV, it was decided to develop hybrids with a heterozygous resistance to the three main viruses. Previous studies have shown that introducing resistance to TYLCV heterozygously has a reduced negative effect on yield and other traits [47]. The hybrid UMH 1101xIF, a Muchamiel-type tomato, was the first hybrid obtained in our breeding program, and more hybrids (from both Muchamiel and De la pera types) are currently being developed and will be ready to be presented in two years.

7. Massive genotyping

In the last few years, the genetics team at UMH has performed numerous massive sequencing analyses using the Illumina platform. These analyses have made it possible to sequence a large number of traditional tomato varieties and accessions. In the most notable of these analyses, we use the 8K SolCap Illumina Infinium SNP chip, described as a part of the Solanaceae Coordinated Agricultural Project ([SolCAP: http://solcap.msu.edu/](http://solcap.msu.edu/)) [48]. This chip is made up of 8784 SNPs distributed across 12 chromosomes, and it has been used for different purposes, both

in the study of genetic variability (genetic association) and in the breeding program (reduction of linkage drag).

7.1. Genetic association

As part of a collaboration with the University of Naples Federico II (Prof Rosa Rao), massive sequencing was performed on 42 traditional Spanish and Italian tomato varieties, and on three accessions of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, and *Solanum pimpinellifolium*. The analyzed group of traditional varieties includes Muchamiel, De la pera, Valenciano, Morunos, Raf, Flor de Baladre, San Marzano, Sorrento, Costoluto, and Vesuvio. The genotypes obtained with the 8K SolCap chip will be used for future genetic association studies, taking advantage of the phenotyping performed in the group in order to study the variability among the traditional cultivars in greater depth.

7.2. Obtaining plants with the *Ty-1* gene with less linkage drag

Despite the breeding program's success, homozygous alleles for resistance, especially for the *Ty-1* gene, have been found to negatively affect both production levels and other parameters of agronomic quality [43]. This work does not clarify whether the negative effects on production and quality are directly due to the *Ty-1* gene, or whether they are caused by genes associated with the resistance gene. We do know that in the introgression of genes from wild species, large segments of chromosomes surrounding the resistant gene remain in the resulting line, even after many backcrosses [49]. In fact, it has been reported that two chromosomal inversions in *S. chilense* LA1969 (the *Ty-1* gene donor) give rise to a recombination suppression in the region of chromosome six, where the *Ty-1* gene is found in cultivated tomatoes [50].

Studying plants with a distinct number of backcrosses confirms these results. Despite backcrossing up to 10 times, a large fragment of chromosome six, in which the gene *Ty-1* is found, does not recombine. By selecting plants with TYLCV resistance, this fragment barely changes as it passes from generation to generation. Furthermore, unpublished results recently obtained by the UMH team, in collaboration with groups from the Institute of Plant Molecular and Cellular Biology (IBMCP) in Valencia, also show the negative effect of introgression on volatile compounds and other metabolites. All together, these results seem to indicate that it is the presence of DNA fragments associated with the *Ty-1* gene that is responsible for changes to the aromatic characteristics of the UMH tomato varieties. It is not clear whether this effect can be attributed to the *Ty-1* gene itself, or to other genes around it. Plants where the resistance gene is present but linkage drag was reduced by recombination may help in understanding this aspect.

8. Future work

In the future, the main goal of the UMH breeding program is to introduce a resistance without altering the quality and productivity of the new lines of traditional tomato varieties. The *ty-5* gene, for example, from the commercial hybrid Tyking, has shown good behavior against various mono- and bipartite begomoviruses, including TYLCV [51,52]. Using massive genotyping, next-generation sequencing (NGS) technologies, and bioinformatics, our group is currently collaborating with other groups from the Institute of Plant Molecular and Cellular Biology (IBMCP) in the search for descendants of UMH breeding program plants that self-fertilize and have been able to recombine in the zones adjacent to the *Ty-1* gene. This approach will allow us to obtain plants with different configurations in chromosome six and later study the phenotypic characteristics of these plants in the field. This process will be extremely useful in identifying the genes responsible for the most important productivity and quality parameters in tomato.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Spanish MICINN through projects AGL2002-03329, AGL2005-03946, AGL2008-03822, AGL2011-26957 and the European Union (ACIF/2016/212). We thank Ansley Evans for the language review. We want to thank the anonymous reviewers for their suggestions.

References

1. Ruíz, J.J.; García-Martínez, S. Tomato varieties 'Muchamiel' and 'De la Pera' from the southeast of Spain: Genetic improvement to promote on-farm conservation. In European Landrace: On-Farm Conservation, Management and Use. Biodiversity Technical Bulletin No 15; Vetelainen, M., Negri, V., Maxted, N., Eds.; Bioersivity International: Rome, Italy, 2009; pp. 171–176.
2. Picó, B.; Herraiz, J.; Ruiz, J.J.; Nuez, F. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Sci. Hortic.* 2002, 94, 73–89. [CrossRef]
3. Nuez, F.; Roselló, S.; Picó, B. La conservación y recuperación de nuestro patrimonio hortícola. *Mejorar para conservar. Agrícola Vergel* 1998, 194, 74–80.
4. Nuez, F.; Ruiz, J.J. *La Biodiversidad Agrícola Valenciana: Estrategias Para su Conservación y Utilización*; Universitat Politècnica de València: Valencia, Spain, 1999.
5. Miller, J.C.; Tanksley, S.D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 1990, 80, 437–448. [CrossRef] [PubMed]

6. Tanksley, S.D. The Genetic, Developmental, and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. *Plant Cell* 2004, 16, S181–S189. [CrossRef] [PubMed]
7. Ruiz, J.J.; Martínez, N.; Valero, M.; García-Martínez, S.; Moral, R.; Serrano, M. Micronutrient composition and quality characteristics of traditional tomato cultivars in the south-east of Spain. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 2005, 36, 649–660. [CrossRef]
8. Ruiz, J.J.; Alonso, A.; García-Martínez, S.; Valero, M.; Blasco, P.; Ruiz-Bevia, F. Quantitative analysis of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85, 54–60. [CrossRef]
9. Alonso, A.; García-Aliaga, R.; García-Martínez, S.; Ruiz, J.J.; Carbonell-Barrachina, A.A. Characterization of Spanish tomatoes using aroma composition and discriminant analysis. *Food Sci. Technol. Int.* 2009, 15, 47–55. [CrossRef]
10. Smulders, M.J.M.; Bredemeijer, G.; Rus-Kortekaas, W.; Arens, P.; Vosman, B. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 97, 264–272. [CrossRef]
11. Alvarez, A.E.; Van de Wiwl, C.C.M.; Smulders, M.J.M.; Vosman, B. Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 2001, 103, 1283–1292. [CrossRef]
12. Park, Y.H.; West, M.A.L.; St. Clair, D.A. Evaluation of AFLPs for germplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Genome* 2004, 47, 510–518. [CrossRef] [PubMed]
13. Bredemeijer, G.M.M.; Cooke, R.J.; Ganai, M.W.; Peeters, R.; Isaac, P.; Noordijk, Y.; Rendell, S.; Jackson, J.; Röder, M.S.; Wndehake, K.; et al. Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 2002, 105, 1019–1026. [PubMed]
14. He, C.; Poysa, V.; Yu, K. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 2003, 106, 363–373. [CrossRef] [PubMed]
15. Andreakis, N.; Giordano, I.; Pentangelo, A.; Fogliano, V.; Graziani, G.; Monti, L.M.; Rao, R. DNA fingerprinting and quality traits of Corbarino Cherry-like tomato landraces. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 3366–3371. [CrossRef] [PubMed]

16. Rao, R.; Corrado, G.; Bianchi, M.; Di Mauro, A. (GATA)4 DNA fingerprinting identifies morphologically characterized San Marzano tomato plants. *Plant Breed.* 2006, 125, 173–176. [CrossRef]
17. Li, G.; Quiros, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 2001, 103, 455–461. [CrossRef]
18. Ruiz, J.J.; García-Martínez, S.; Picó, B.; Gao, M.; Quiros, C.F. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2005, 130, 88–94.
19. Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6463–6471. [CrossRef] [PubMed]
20. García-Martínez, S.; Andreani, L.; García-Gusano, M.; Geuna, F.; Ruiz, J.J. Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: Utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome* 2006, 49, 648–656. [CrossRef] [PubMed]
21. Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 1995, 23, 4407–4414. [CrossRef] [PubMed]
22. Kaemmer, D.; Weising, K.; Bayermann, B.; Borner, T.; Epplen, J.T.; Kahl, G. Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA. *Plant Breed.* 1995, 114, 12–17. [CrossRef]
23. Caramante, M.; Rao, R.; Monti, L.M.; Corrado, G. Discrimination of San Marzano accessions: A comparison of minisatellite, CAPS and SSR markers in relation to morphological traits. *Sci. Hortic.* 2009, 120, 560–564. [CrossRef]
24. García-Martínez, S.; Corrado, G.; Ruiz, J.J.; Rao, R. Diversity and structure of a sample of traditional Italian and Spanish tomato accessions. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2013, 60, 789–798. [CrossRef]
25. Wang, D.G.; Fan, J.B.; Siao, C.J.; Berno, A.; Young, P.; Sapolsky, R.; Ghandour, G.; Perkins, N.; Winchester, E.; Spencer, J.; et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998, 280, 1077–1082. [CrossRef] [PubMed]

-
26. García-Gusano, M. Empleo de Marcadores Moleculares Para el Estudio de la Variabilidad Intraespecífica en Tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Ph.D. Thesis, Miguel Hernandez University, Elche, Spain, 2007.
 27. Le Corre, V.; Kremer, A. Genetic variability at neutral markers, quantitative trait loci and trait in a subdivided population under selection. *Genetics* 2003, 164, 1205–1219. [PubMed]
 28. Alexander, L.J. Transfer of a dominant type of resistance to the four known Ohio pathogenic strains of tobacco mosaicvirus (TMV), from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum*. *Phytopathology* 1963, 53, 869.
 29. Stevens, M.R.; Scott, S.J.; Gergerich, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 1992, 59, 9–17.
 30. Zamir, D.; Ekstein-Michelson, I.; Zakay, Y.; Navot, N.; Zeidan, M.; Safatti, M.; Eshed, Y.; Harel, E.; Pleban, T.; van-Oss, H.; et al. Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *TY-1*. *Theor. Appl. Genet.* 1994, 88, 141–146. [CrossRef] [PubMed]
 31. Folkertsma, R.T.; Spassova, M.I.; Prins, M.; Stevens, M.R.; Hille, J.; Goldbach, R.W. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the *Sw-5* locus. *Mol. Breed.* 1999, 5, 197–207. [CrossRef]
 32. Rick, C.M.; Fobes, J.A. Association of an allozyme with nematodes resistance. *Tomato Genet. Coop. Rep.* 1974, 24, 25.
 33. Dax, E.; Livneh, O.; Aliskevicius, E.; Edelbaum, O.; Kedar, N.; Gavish, N.; Milo, J.; Geffen, F.; Blumenthal, A.; Rabinowich, H.D.; et al. A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, *Tm-22*, in tomato. *Euphytica* 1998, 101, 73–77. [CrossRef]
 34. Omori, T.; Murata, M.; Motoyoshi, F. Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the *Tm-2* locus of the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 2000, 101, 64–69.
 35. Lanfermeijer, F.C.; Dijkhuis, J.; Sturre, M.J.G.; de Haan, P.; Hille, J. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm-22* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol. Biol.* 2003, 52, 1037–1049. [CrossRef] [PubMed]
 36. Tanksley, S.D. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983, 1, 3–8. [CrossRef]
 37. Foolad, M. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int. J. Plant Genom.* 2007, 52, 64358. [CrossRef] [PubMed]
 37. Foolad, M.R.; Panthee, D.R. Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2012, 31, 93–123. [CrossRef]
-

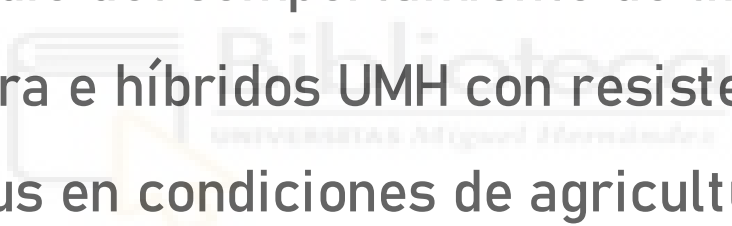
-
38. García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Valero, M.; Ruiz, J.J. UMH 1200, a breeding line within the Muchamiel tomato type resistant to three viruses. *HortScience* 2011, 46, 1054–1055.
 39. García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Valero, M.; Ruiz, J.J. UMH 1203, a multiple virus-resistant fresh-market tomato breeding line for open-field conditions. *HortScience* 2012, 47, 124–125.
 40. Tanksley, S.D.; Bernachi, D.; BeckBunn, T.; Emmatty, D.; Eshed, Y.; Inai, S. Yield and quality evaluations on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the *Tm2a* gene for resistance to the Tobacco mosaic virus. *Euphytica* 1998, 99, 77–83. [CrossRef]
 41. Lewis, R.S.; Linger, L.R.; Wolff, M.F.; Wernsman, E.A. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: Linkage drag versus pleiotropy. *Theor. Appl. Genet.* 2007, 115, 169–178. [CrossRef] [PubMed]
 42. Rubio, F.; Alonso, A.; García-Martínez, S.; Ruiz, J.J. Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Sci. Hortic.* 2016, 198, 183–190. [CrossRef]
 43. García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Valero, M.; Ruiz, J.J. UMH 1422 and UMH 1415: Two fresh-market tomato breeding lines resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus. *HortScience* 2014, 49, 1465–1466.
 44. García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Carbonell, P.; Ruiz, J.J. UMH 916, UMH 972, UMH 1093, UMH 1127 and UMH 1139: Four fresh-market breeding lines resistant to viruses within the Muchamiel tomato type. *HortScience* 2015, 50, 927–929.
 45. García-Martínez, S.; Grau, A.; Alonso, A.; Rubio, F.; Carbonell, P.; Ruiz, J.J. New breeding lines resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the ‘De la Pera’ tomato type: UMH 1353 and UMH 1354. *HortScience* 2016, 51, 456–458.
 46. Alonso, A.; García-Martínez, S.; Arroyo, A.; García-Gusano, M.; Grau, A.; Giménez-Ros, M.; Romano, M.E.; Valero, M.; Ruiz, J.J. Efecto de la introducción de resistencia genética a TYLCV (gen *Ty-1*) en caracteres productivos y de calidad en tomate. *Actas Hortic.* 2008, 51, 175–176.
 47. Sim, S.C.; Durstewitz, G.; Plieske, J.; Wieseke, R.; Ganai, M.W.; Van Deynze, A.; Hamilton, J.P.; Buell, C.R.; Causse, M.; Wijeratne, S.; et al. Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. *PLoS ONE* 2012, 7, e40563. [CrossRef] [PubMed]

48. Young, N.D.; Tanksley, S.D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the TM-2 locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 1989, *77*, 353–359. [CrossRef] [PubMed]
49. Verlaan, M.G.; Szinay, D.; Hutton, S.F.; de Jong, H.; Kormelink, R.; Visser, G.F. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *Plant J.* 2011, *68*, 1093–1103. [CrossRef] [PubMed]
50. Hutton, S.F.; Scott, J.W.; Schuster, D.J. Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking is located in the Same Region as *Ty-5* on Chromosome 4. *HortScience* 2012, *47*, 324–327.
51. Pereira-Carvalho, R.C.; Díaz-Pendón, J.A.; Fonseca, M.E.N.; Boiteux, L.S.; Fernández-Muñoz, R.; Moriones, E.; Resende, R.O. Recessive Resistance Derived from Tomato cv. Tyking-Limits Drastically the Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Viruses* 2015, *7*, 2518–2533. [CrossRef] [PubMed]



II

Estudio del comportamiento de líneas de mejora e híbridos UMH con resistencias a virus en condiciones de agricultura de resiliencia



Effect of low inputs and salinity on yield and quality – A 3-year study in virus-resistant tomato (*Solanum lycopersicum* L.) breeding lines and hybrids

2020

Pedro Carbonell, Juan F. Salinas, Aránzazu Alonso, Adrián Grau, Jose A. Cabrera, Santiago García-Martínez y Juan J. Ruiz

Scientia Horticulturae, 260, 108889

DOI

0.1016/j.scienta.2019.108889

ISSN

0304-4238

Categoría JCR

Horticulture

Factor de Impacto (2019)

2,769

Factor de impacto (5 años)

2,844

Cuartil

Q1

Rango

5/36



Effect of low inputs and salinity on yield and quality – A 3-year study in virus-resistant tomato (*Solanum lycopersicum* L.) breeding lines and hybrids

Pedro Carbonell, Juan F. Salinas, Aránzazu Alonso, Adrián Grau, Jose A. Cabrera, Santiago García-Martínez, Juan J. Ruiz*

Department of Applied Biology, Miguel Hernández University, Carretera Beniel km 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain.

*Corresponding author at: Departamento Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, km 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain. E-mail address: juanj.ruiz@umh.es (J.J. Ruiz).

Received 22 May 2019; Received in revised form 4 August 2019; Accepted 25 September 2019.

Abstract: Six Muchamiel and De la pera breeding lines with different combinations of genes that confer resistance to ToMV, TYLCV and TSWV, and two heterozygous hybrids, were evaluated under low input and saline conditions during 2016, 2017 and 2018. The results revealed that low inputs reduced the yield and fruit quality in both tomato cultivars and increased the incidence of blossom-end rot in De la pera. However, De la pera tomatoes grown under this condition tended to maintain a higher yield and fruit quality than Muchamiel, which suggests a better adaptation to these minimum requirements. Both De la pera and Muchamiel hybrids produced very low yields in low input conditions, although they showed the best performance in conventional and saline conditions. Generally, the moderate electrical conductivity used in the saline system (irrigation water of around 6 dS/m) improved the quality of all the tomato plants, especially the total soluble solids content, but caused yield reductions of around 10-15% in almost all the lines and hybrids. Finally, the results pointed to the better behaviour of the breeding lines without the *Ty-1* gene, while both hybrids showed higher yields than triple homozygous lines under conventional and saline systems.

Keywords: Traditional tomato cultivars, Muchamiel, De la pera, *Tm-2a*, *Ty-1*, *Sw-5*.

1. Introduction

De la pera and Muchamiel are traditional tomato types that are highly esteemed in southeastern (SE) Spain. The main use of both varieties is the fresh market, due to their excellent organoleptic quality. Fruits of the Muchamiel cultivars have a melting texture and mild flavor, are large in size (180 g to 300 g), flattened, and strongly ribbed. Fruits of De la pera varying from elongated-oval to bell shape with dark green shoulders and without ribs, weigh between 75 and 125 g, have a juicy and firm texture and are strongly flavored (Ruiz et al., 2005). Muchamiel is very popular in all the SE Spain (Valencia, Alicante, Murcia and Almeria), while De la pera cultivation is restricted to a small area in the Segura River region in Alicante. They are very popular in local markets, where their price may reach three to six times that of the commercial hybrid varieties (Ruiz and García-Martínez, 2009). However, these landraces are severely endangered because of their susceptibility to several viruses such as those caused by ToMV, TYLCV and TSWV (Picó et al., 2002), whose incidence strongly decreases the benefits obtained by farmers. With the aim of improving this situation and avoiding the loss of genetic diversity, the plant breeding group from EPSO-UMH started a breeding program in 1998 for the simultaneous introduction of three dominant genes (*Tm-2a*, *Ty-1* and *Sw-5*) that confer dominant resistance to three viruses (ToMV, TYLCV and TSWV, respectively) into the traditional De la pera and Muchamiel cultivars. This process was carried out using marker-assisted backcrossing, giving several breeding lines with different combinations of resistant genes.

Recently, Rubio et al. (2016) studied the behaviour of a set of Near Isogenic Lines (NILs) (De la pera and Muchamiel types) developed during the UMH breeding program with different resistance homozygous genotypes for the three viruses mentioned above. Their results clearly showed that *Ty-1* gene in homozygosis, or the linked genes from the donor parental, the wild relative *Solanum chilense* Dunal, negatively affected most of the parameters studied, especially yield, which fell by 40% to 50%. The occurrence of negative effects produced by introgression of resistance genes is not an unknown event. Previously, Tanksley et al. (1998) observed slight reductions in yield and fruit quality in processing tomatoes with ToMV resistance, while Lewis et al. (2007) reported reduced yield and quality in tobacco plants containing the N gene (coming from the wild *Nicotiana glutinosa* L.), which confers resistance to TMV, suggesting the role of linkage drag. In another study, segments containing deleterious alleles from *Solanum hirsutum* in intervals adjacent to alleles containing late blight resistance in tomato were found at horticulturally important QTLs (Brouwer and St. Clair, 2004). As regards the *Ty-1* gene, Verlaan et al. (2011) reported the suppression of recombination in the *S. chilense* region containing this gene due to the occurrence of two chromosomal inversions between *S. chilense* LA1969 and *S. lycopersicum* L..

Therefore, in the introgression of *Ty-1* gene in De la pera and Muchamiel tomatoes the linked genes could not be removed during backcrossing (linkage drag). A strategy to avoid the negative effects of those genes in tomato is to use the virus-resistance genes introgressed in heterozygous state (Tanksley et al., 1998). In that way, several hybrids have been developed from the breeding UMH lines, which are heterozygous to the three resistance genes.

The breeding lines and hybrids obtained in the UMH breeding program have been evaluated in several assays in recent years, including on-farm trials in collaboration with local growers and tests in different crop systems (open field, greenhouse, hydroponic...). All of them were carried out under conventional environments characterized by high fertilization levels and regular irrigation. However, it is well known that building and defining sustainable and resilient agricultural systems will be essential in the future to be able to absorb the environmental impacts generated by the need to guarantee food production and supply for an ever increasing population. For example, obtaining high yields under systems using reduced irrigation and fertilization rates and managing salinity to produce quality fruits in salinized regions could have a positive impact on the environment and economy without compromising food production.

Modern agriculture is fundamentally based on varieties bred for high performance in systems characterized by the use of large amounts of fertilizer, irrigation water and pesticides. However, lines and hybrids that are highly dependent on such environments are not usually capable of performing well in low input situations (Ceccarelli, 1996; Murphy et al., 2005). The great increase expected in the world's population and the reduction in the availability of resources are the main issues that agriculture must deal with to ensure efficient food production. In that context, reducing the use of fertilizers and water and while ensuring the yields and the quality of the food produced by agriculture is only possible through the selection of local varieties highly adapted to low input conditions and breeding programs focused on obtaining new lines with advantageous genotypes for these environments. The ability of plants to interact with the soil microorganisms to increase the efficiency of nitrogen absorption or the activity of certain enzymes which improve nutrient utilization are some examples of traits that could be valuable in breeding programs for low input agriculture (Vance, 2001; Gallais and Coque, 2005). In tomato, genes that control the ability to build mycorrhizal root symbiosis have already been identified (Larkan et al., 2007). Therefore, improving our knowledge of agricultural diversity is essential in order to find plant materials with interesting genetic traits. Traditional varieties are usually excellent starting materials for breeding programs, since farmers have selected several of these landraces or heirlooms because their great behaviour under low input systems and stress conditions. In addition, modern genetic techniques such as marker assisted selection (MAS) or genomic selection (GS) are highly useful for identifying target

genes and QTLs, saving time and money in breeding programs (Heffner et al., 2009; Tester and Langridge, 2010).

Salinity is an environmental element that limits crop yields and reduces quality. Arid and semiarid regions with intensive and irrigated agriculture are highly exposed to this phenomenon due to the high evapotranspiration rates and the low rainfall. In these zones, the salt accumulates in the upper layers of the soil, where the roots of the plants develop (Munns, 2005). The Mediterranean area in general and SE Spain in particular are zones where it is common to find crops in salinized soils and/or irrigated with saline waters from overexploited aquifers (Paranychianakis and Chartzoulakis, 2005; Pulido-Bosch et al., 2018). In these zones, managing the salinity both in the soil and water is extremely important, since moderate levels are enough to reduce the yield in several crops. However, in salt-tolerant species, like tomato, moderate salinization can be transformed into an useful tool to enhance quality (Rouphael et al., 2018). For example, in the province of Almería (SE Spain), Iglesias et al. (2015) observed that increasing electrical conductivity is an efficient alternative for improving the taste index of Raf tomatoes (a traditional marmande 'flavour' variety original from Almería, Spain) grown under non-optimal greenhouse conditions, and Magán et al. (2008) concluded that irrigation with saline water in soil-less culture enhances the total soluble solids (TSS) and titratable acidity (TA) content in two commercial F1 hybrids. However, despite the beneficial effects of using salinity in tomato, most authors have also observed losses in yield at certain levels of salinity due to reductions in fruit number and fruit weight, and because of the incidence of blossom-end rot (BER).

The main objective of the current study is to evaluate the behaviour in yield and quality of some breeding lines and hybrids with virus-resistance from the UMH breeding program grown in low input conditions and moderate salinity system. The second purpose is to compare the different resistance genotypes in order to check how the introgression of resistances affects the yield and fruit quality of these tomato.

2. Materials and methods

2.1. Field experiments

The essays were carried out at the EPSO-UMH experimental farm located in Alicante, SE Spain (38°4'N, 0°58'W and 25 m a.s.l.). The climate is arid to semiarid Mediterranean (average annual rainfall of 250 mm). The seeds were germinated in greenhouse and transplanted to the field at the appropriate time (Table 1). The plants were grown in a mesh greenhouse during the spring crop cycle (from April to August) of three consecutive years: 2016, 2017 and 2018. In every crop

condition, blocks of two replicates and 6-7 plants per plot were set for each line (12-14 plants per line and condition), and their place in the field remained the same all three years. The plants grew vertically with one stem and a density of 2.5 plants/m². The saline treatments were applied around 30-40 days after transplanting until the end of harvesting, which was in July (Table 1).

Table 1. Dates of transplanting, salinization and harvest.

Year	Transplanting	Saline start treatment	Harvest
2016	April 15	May 16	July 5 - 29
2017	March 28	May 8	June 26 – July 26
2018	March 27	May 7	July 2 - 30

2.2. Plant materials

A total of six different breeding lines and two hybrids obtained by the EPSO-UMH Plant Breeding group were evaluated in three similar replications. Out of this material, three breeding lines (UMH 1200, UMH 1139 and UMH 972) were obtained from the traditional Muchamiel cultivar and one hybrid (UMH 1101 x IF) was the cross between a Muchamiel breeding line (UMH 1101) and Indische Fleisch (IF), an American heirloom with flattened and brown fruits, green shoulders, good flavours and plentiful yield. The other three lines are breeding lines obtained from the traditional De la pera cultivar (UMH 1203, UMH 1354 and UMH 1422) and the second hybrid (UMH 1203 x 21) is a cross between UMH 1203 and a De la pera landrace (P21). Each breeding line in every tomato type carried a different combination of resistance genes introgressed during the breeding program (Table 2). These dominant genes are *Tm-2a*, *Ty-1* and *Sw-5*, which confer resistance to ToMV, TYLCV and TSWV respectively. The best Muchamiel and De la pera hybrids available at the beginning of the work (2016) were used. They obtained the highest scores in yield and quality in the trials previously carried out. Both hybrids have heterozygous resistance to the three viruses.

Six backcrosses were performed in the development of lines UMH 1200, UMH 1101 and UMH 1203, and 10 in the others. Progenies for each backcross generation were screened with molecular markers linked to the virus resistance genes. High selection pressure for agronomic traits was applied during the backcrossing process. Previous unpublished work indicates that the linkage drag is similar for all the breeding lines used: 35 MB of *S. chilense* associated with the *Ty-1* gene on chromosome 6 and 50 MB of *S. peruvianum* associated with the *Tm-2a* gene on chromosome 9 and a little fragment from *S. peruvianum* associated with the *Sw-5* gene on chromosome 9.

Muchamiel and De la pera traditional cultivars have not been included in the essay due to the incidence of ToMV. In our conditions, the presence of ToMV is usual, with infection levels

varying depending on the year. Traditional varieties could be affected, and this fact may alter the results.

Table 2. Resistance genotypes to ToMV (*Tm-2a*), TSWV (*Sw-5*) and TYLCV (*Ty-1*) of the breeding lines and hybrids: RR (resistant homozygous resistant), rr (susceptible homozygous) and Rr (heterozygous).

De la pera	Muchamiel	<i>Tm-2a</i>	<i>Sw-5</i>	<i>Ty-1</i>
UMH 1203	UMH 1200	RR	RR	RR
UMH 1354	UMH 1139	RR	RR	rr
UMH 1422	UMH 972	RR	rr	rr
UMH 1203 x 21	UMH 1101 x IF	Rr	Rr	Rr

2.3. Crop conditions and culture

Lines and hybrids were grown under three different crop conditions: conventional, saline and low input. These conditions were performed in the same soil sectors every year. The irrigation water for conventional and saline conditions was taken from the Segura River (EC around 0.6 dS/m). For low input conditions tap water was used to ensure the absence of fertilization. Crop water requirements were calculated using the Pan evaporation method (Doorenbos and Pruitt, 1977). Irrigation periods and scheduling were similar for all three conditions. Fertilization in the conventional condition was that commonly used in this area for tomato crops: an application of commercial sheep manure was incorporated before transplanting, at a rate of 2.5 kg/m², and inorganic fertilizers were provided in the irrigation water during the culture (Table 3). The manure used was pelletized (to improve its distribution) and had a total organic matter richness (over dry weight) of 65%. Fertilization in the saline condition was similar to the conventional, but NaCl was diluted in a water tank and added to the irrigation water to generate the salinity conditions. Salinization was progressive, reaching the highest value (around 6 dS/m in the irrigation solution) during the last 6-7 weeks of culture, just before of the harvest period (Fig. 1). Neither manure nor inorganic fertilizers were applied to plants in low input system. In this sector, only tap water was supplied to the plants, since the EC of the water commonly taken from the Segura river can vary, which would make difficult the subsequent analysis. Finally, no techniques to improve the pollination have been used in the trials.

Table 3. Fertilization data in conventional and saline systems.

Phase	Duration	Fertilizer units	Overall fertilization formula
1	Transplant - Appearance of third truss	1 N – 2 P ₂ O ₅ – 1 K ₂ O – 1 CaO	375 N – 225 P ₂ O ₅ – 550 K ₂ O – 190 CaO
2	Ending phase 1 - Colour turn of first fruits	1 N – 1 P ₂ O ₅ – 1 K ₂ O – 1 CaO	
3	Ending phase 2 - End of culture	1 N – 0.3 P ₂ O ₅ – 2 K ₂ O – 1 CaO	

No presence of ToMV and TSWV was detected in any year by ELISA test performed in a sample of plants. However, TYLCV was detected in a small number of plants (about 5%) that did not contain the *Ty-1* gene. These plants were removed from the trial immediately.

2.4. EC measures

The electrical conductivity (EC) was measured in the irrigation water (provided by drippers), and 15 cm and 30 cm below the irrigated surface of the soil. In each condition, irrigation water was measured in two different points, and two probes were used for each depth to measure EC in the soil moisture. Irrigation water EC was measured daily from May to the end of July, a total of 11 weeks every year, while the EC in the soil was measured 2-3 times per week. The collected data were plotted for each year using the averaged values per week for each measure type and condition (Fig. 1).

2.5. Data collection

Yield was measured as the weight of all the fruits harvested per plant (kg/plant), and the number of fruits as the total fruits harvested per plant. The fruit weight was calculated as the average of the weight of all the harvested fruits per plant, expressed in grams. The incidence of BER was measured (only in De la pera lines) as the number of fruits per plant affected, and the %BER as the ratio of fruits with BER and the total number of fruits per plant. Fruits were harvested once a week during the last 4-5 weeks of culture (end of June and whole of July. For the quality analysis, three replications per plot and line were selected with 3-4 fruits each, with approximately 50-60% of the surface red in colour, which is considered the regular commercial ripening state of these kinds of tomatoes. After the fruits had been juiced, the TSS was estimated with an Atago PR-100 digital refractometer, in duplicate, and the results were expressed in °Brix. TA was also measured in duplicate in the same samples, using a CRISON pHmatic 23 with 0.01 mol/L NaOH and expressed as % citric acid.

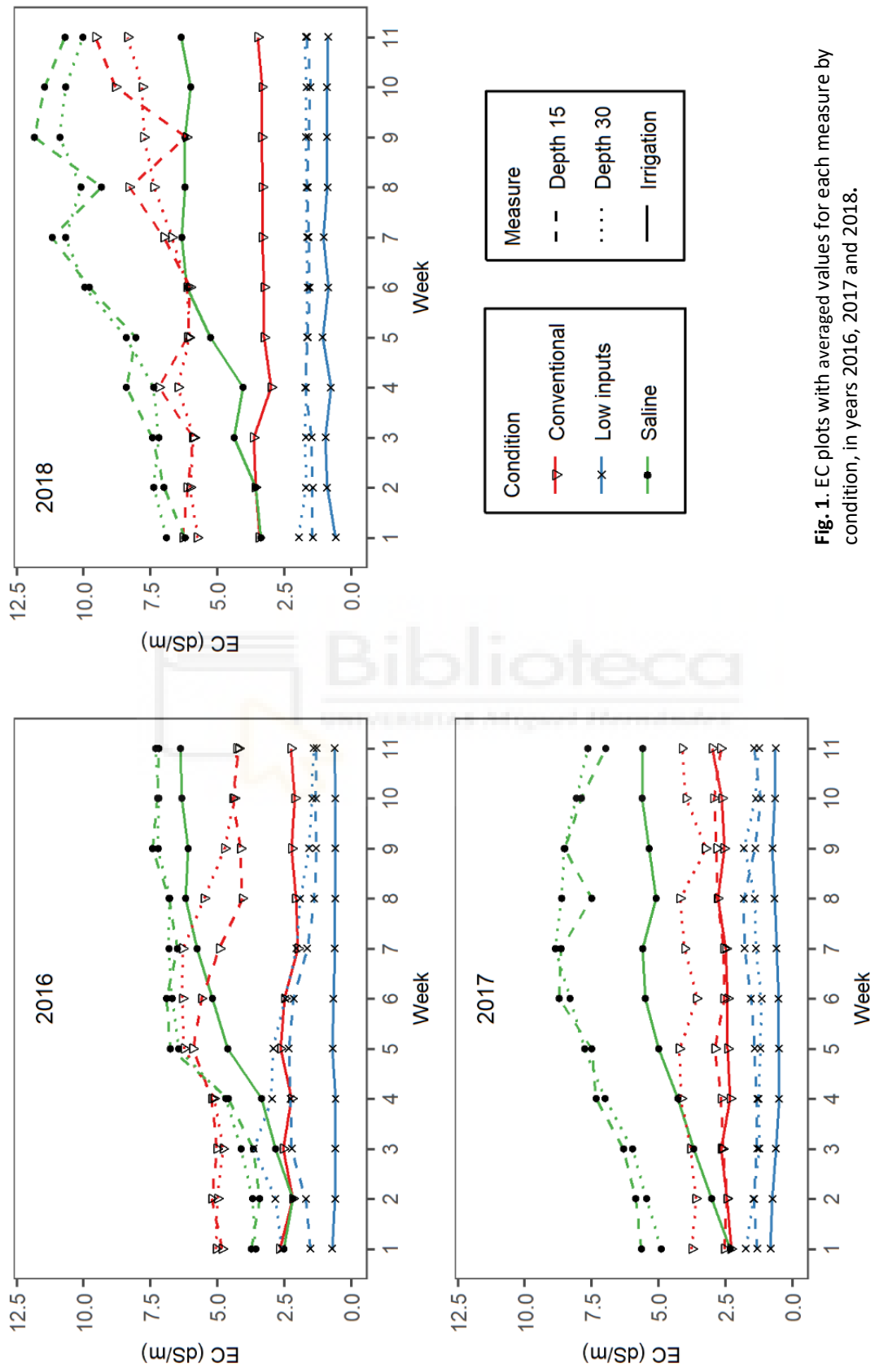


Fig. 1. EC plots with averaged values for each measure by condition, in years 2016, 2017 and 2018.

2.6. Statistical analysis

Plants affected by TYLCV or physical disorders with noticeable low vigour and/or yield were excluded from the analysis. The variable number of fruits was square-root transformed before the analysis, performing the Anderson-Darling test to check the hypothesis of normality. Muchamiel and De la pera types tomatoes were analysed separately for yield parameters (yield, fruit number and fruit weight) and quality parameters (TA and TSS) by ANOVA, using a split-plot design with years as blocks (random factor), the crop conditions as whole-plot factor (fixed) and the lines as subplot factor (fixed). Interaction plots and 95% LSD intervals between lines and conditions were built for each parameter evaluated (results for number of fruits were back-transformed). ANOVAs and LSD intervals were performed using the General Linear Models (GLM) procedures of Statgraphics Centurion XVII v. 17.2.00 introducing the mentioned split-plot model, and the interaction plots were built with the aid of 'ggplot2' package (Wickham, 2016) v. 3.0.0 in R.

Two heatmaps with the Pearson correlations and the p-values between all the parameters were built with the package 'stats' (Team R Core, 2017) v. 3.4.2 in R for De la pera and Muchamiel types. Correlations among parameters were assessed with the averages of each line for each parameter, year and condition. Correlations between parameters and ECs were performed with the averages of each condition, for each year.

3. RESULTS

3.1. Global parameters

3.1.1. ANOVAs for yield and quality parameters

Table 4 shows the results of the split-plot ANOVA with the year as block random factor. The analysis revealed no significant differences among years except for yield in Muchamiel. In contrast, significant differences were found for the crop conditions in all the parameters except in fruit weight, and among the lines in every trait except in yield in Muchamiel.

In the current study, the 'Genotype x Environment' ('G x E') interaction is represented by the 'Line x Condition' ('L x C') interaction from the analysis of variance. In yield parameters, the interaction 'L x C' was significant in yield and fruit number, pointing to a dissimilar behaviour of the lines or/and hybrids between the conditions, especially in the case of Muchamiel tomatoes. In contrast, the behaviour of the lines and hybrids were similar for fruit weight between the crop systems. In quality, there was a great stability in lines behaviour, since significant differences in the 'L x C' interaction only were found for TSS in De la pera.

Table 4. The p-values from split-plot ANOVAs for yield parameters and fruit quality regarding De la pera (P) and Muchamiel (M) tomato types. The model was performed with Year (Y) as block random factor, Condition (C) as whole-plot factor and Line (L) as subplot factor. Significance levels: *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) and ***($p < 0.001$).

	Yield parameters						Fruit quality			
	Yield		Fruit number		Fruit weight		TA		TSS	
	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
Year (Y)	0.822	0.018	0.272	0.162	0.786	0.327	0.184	0.418	0.251	0.213
		*								
Condition (C)	0.043	0.001	0.017	0.001	0.941	0.813	0.007	0.006	0.041	0.014
	*	**	*	**			**	**	*	*
Line (L)	0	0.112	0	0	0	0	0	0	0.029	0
	***		***	***	***	***	***	***	*	***
L x C	0.018	0.009	0.011	0.003	0.668	0.43	0.396	0.187	0.046	0.105
	*	**	*	**					*	

3.1.2. Correlations between parameters and ECs

Results show that TA and TSS were significantly correlated in both De la pera (Fig. 2A) and Muchamiel (Fig. 2B) tomatoes ($r = 0.42$ and $r = 0.80$, respectively), while yield was strongly correlated with fruit number in both types ($r = 0.93$ and $r = 0.86$) and with fruit weight only in De la pera ($r = 0.63$). In Muchamiel, fruit weight was negatively correlated with fruit number ($r = -0.54$). In De la pera, negative correlations of -0.38 and -0.61 were found between BER and TSS and BER and TA, respectively.

On the other hand, the results showed a total correlation between the three EC measures (Fig. 2). High positive correlations were reported between the ECs and TA and TSS, in both De la pera and Muchamiel types, but there was no correlation between EC and yield parameters, except in fruit number in Muchamiel. Finally, significant negative correlations ($r = -0.71$ to $r = -0.79$) were found between ECs and BER in De la pera.

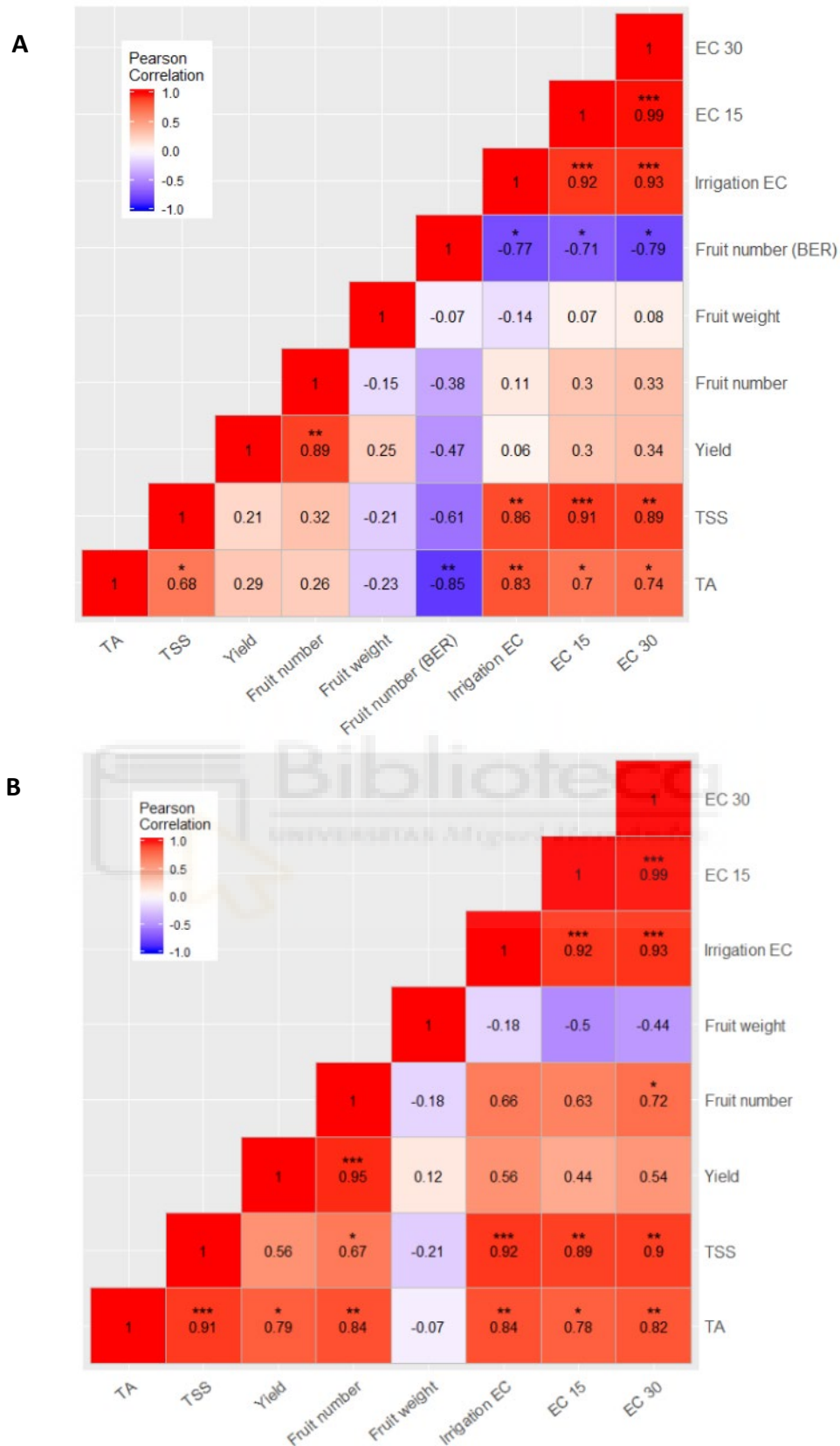


Fig. 2. Correlations were performed with the averages of each line for each parameter, by year and condition, and with the averages of each electrical conductivity measure by each condition and year. Correlations were built for both De la pera (A) and Muchamiel (B) types separately.

3.2. *Effects of conditions*

The interaction plots extracted from 'L x C' ANOVA interactions, with 95% LSD intervals, were used to compare the effects of low inputs and salinity on the lines and hybrids compared with conventional condition.

3.2.1. *Yield parameters*

3.2.1.1. *Low inputs*

Compared to conventional system, there were yield reductions of around 20% in De la pera breeding lines UMH 1354 and UMH 1422 grown under low input conditions; however, they were not significant except for UMH 1203 x 21, which showed a reduction of close to 50% (Fig. 3A). Reduced yields of over 30% on average were observed in Muchamiel breeding lines and in 65% in hybrid UMH 1200 x IF.

There were no differences in fruit weight between the three conditions (Fig. 3C), while fruit numbers were much more reduced in Muchamiel than in De la pera, as observed for yield (Fig. 3B). In fruit number, the De la pera UMH 1203 showed similar values in both low input and conventional conditions, while UMH 1354 and UMH 1422 presented non-significant reductions of 15-20%. In Muchamiel, the reductions were larger in UMH 1200 and UMH 1139, which showed a significant 35% drop in fruit numbers compared with conventionally grown plants. However, UMH 972 did not show noticeable differences between low input and conventional conditions. As regards the hybrids, there were substantial reductions of 50% and 65% in UMH 1203 x 21 and UMH 1101 x IF, respectively.

3.2.1.2. *Salinity*

Under saline conditions, reductions in total yield were reported in both tomato types averaged over the three years, although none of the reductions was statistically significant (Fig. 3A). For De la pera type, reductions of over 15% were found in breeding lines UMH 1203 and UMH 1354, and of more than 30% in UMH 1422. The hybrid UMH 1203 x 21 showed a reduction of 8%. In Muchamiel, yields fell by 7% to 15%, except in UMH 972, which showed an anomalous increase in yield in low input compared with conventional conditions.

Averaged over the three years, reductions in fruit number of around 20% were recorded in De la pera tomatoes grown under salinity (non-significant), as occurred with yield. In Muchamiel, differences were not substantial except in UMH 1101 x IF, which showed a reduction of close to 20% in the number of fruits in saline conditions compared with conventional cultivation (Fig. 3B).

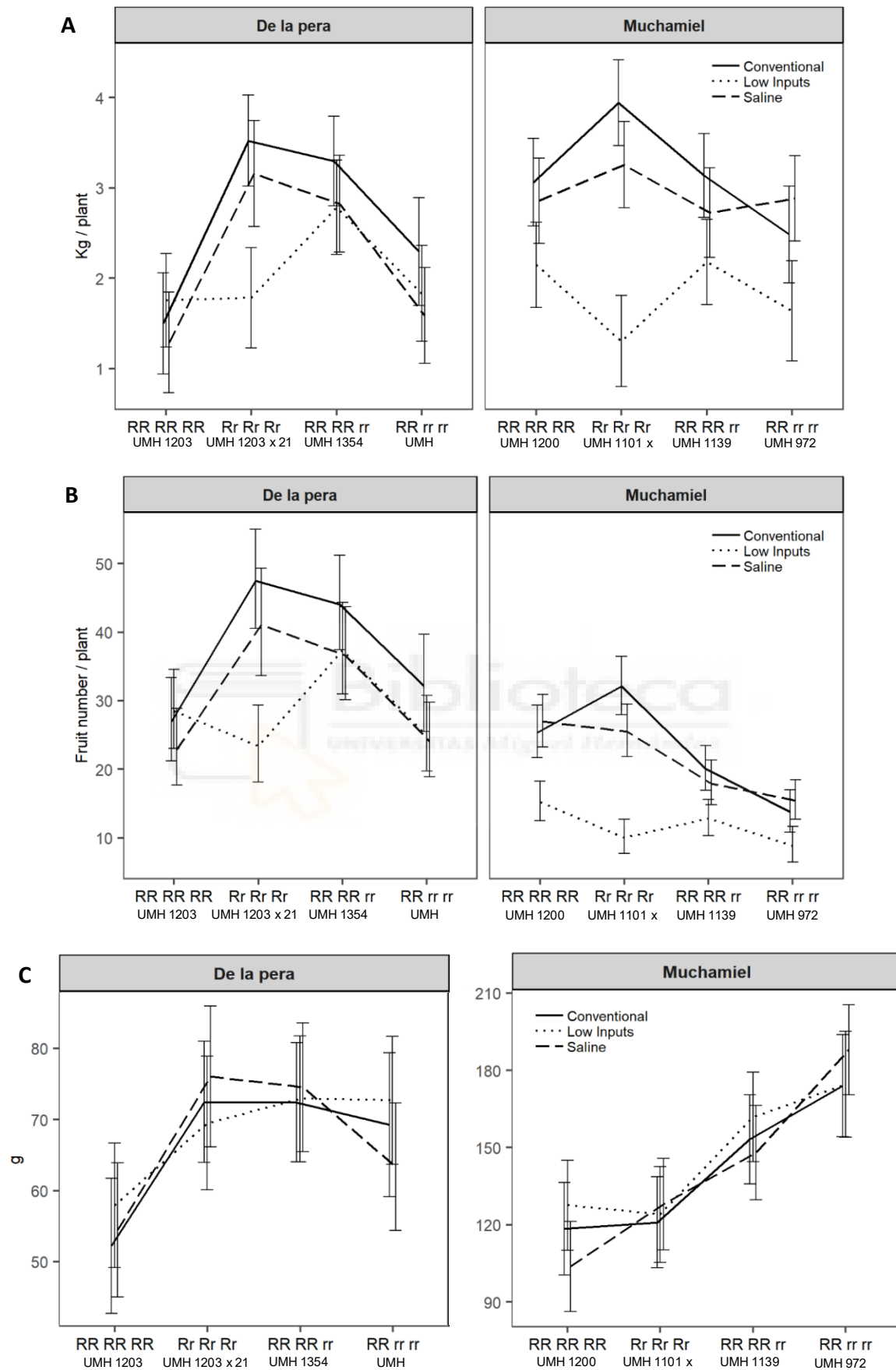


Fig. 3. Interactions 'Line x Condition' and 95% LSD intervals for yield (A), fruit number (B), fruit weight (C)

3.2.2. BER

Blossom-end rot was reported only in De la pera type grown under low input condition (Fig. 4). There was no BER incidence in conventional or saline conditions for this type and none at all in Muchamiel type.

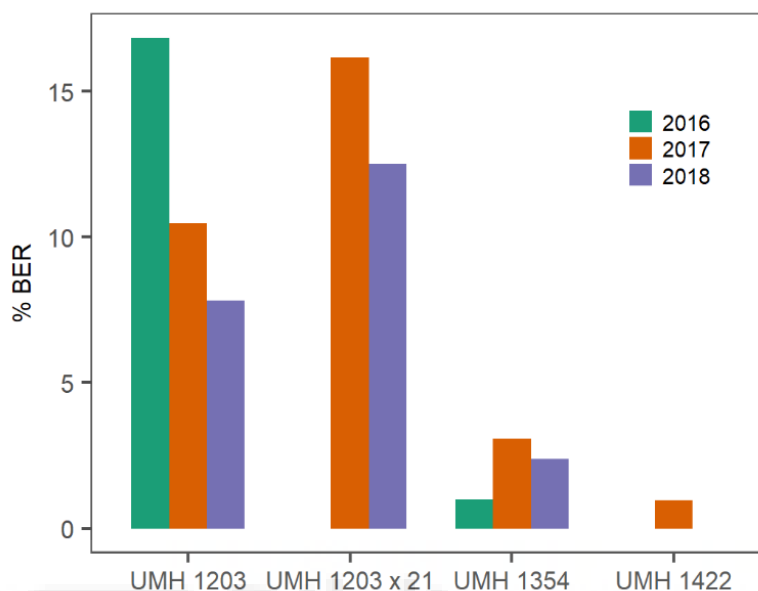


Fig 4. BER incidence by year in De la pera tomato type grown under low inputs condition. BER (%) was calculated as the BER-fruit number in respect of the total number fruit per plant.

3.2.3. Fruit quality

3.2.3.1. Low inputs

The growth of the lines and hybrids in low input conditions dramatically reduced the TA in the fruit in all of them, while the effect on TSS was milder, although still noticeable, especially in Muchamiel type. The reduction in TA was higher than 20% on average in De la pera, and over 33% in Muchamiel. UMH 1101 x IF was the most affected line, which showed a decrease of 40% on average for the three years (Fig. 5A). The effects on sugars were the most noticeable in Muchamiel with reductions over 18% on average, except for UMH 972. The decreases in De la pera were significant only in UMH 1203 and UMH 1203 x 21, which is around 10% lower than the same lines under conventional conditions (Fig. 5B).

3.2.3.2. Salinity

The effects of salinity on TA were not very strong, except for De la pera lines UMH 1203 and UMH 1422, which showed increased values of 22% and 13%, respectively, compared with the same

lines grown in conventional conditions (Fig. 5A). The effects on sugars were higher than on acids, with increases close to 8% and 11% on average in De la pera and Muchamiel, respectively. These increases were significant only in some of the breeding lines: UMH 1203 and UMH 1422 in De la pera and UMH 1139 and UMH 972 in Muchamiel (Fig. 5B).

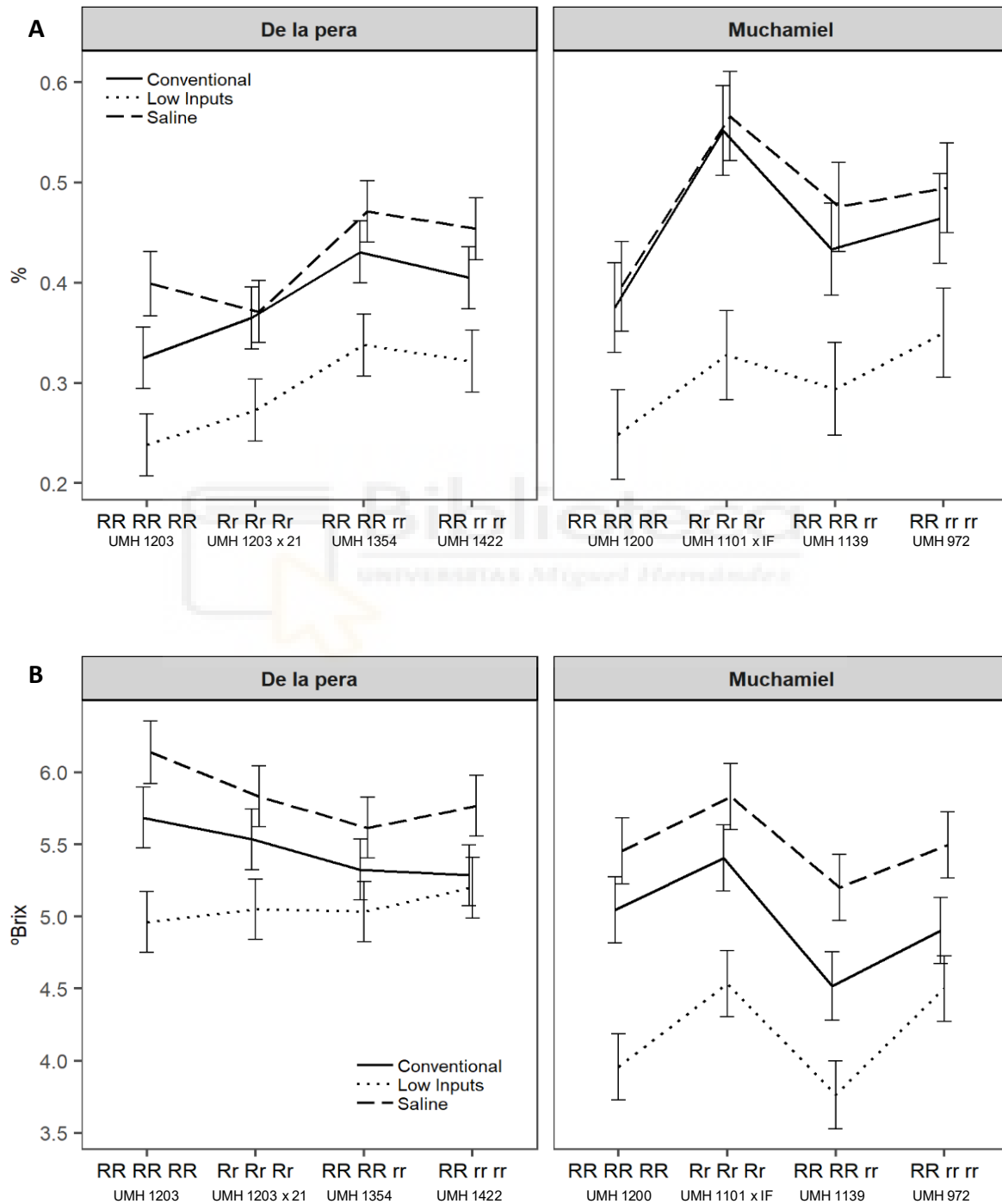


Fig. 5. Interactions 'Lines x Condition' and 95% LSD intervals for TA (A) and TSS (B).

Effects of genotypes

3.2.4. Yield parameters

Differences between homozygous lines were noticeable only within De la pera type, while both De la pera and Muchamiel hybrids showed the highest yields (Fig. 3A). There was a reduction of close to 50% on average in UMH 1203 (RR RR RR) compared with UMH 1354 (RR RR rr), although the reduction was around 20% with respect to UMH 1422 (RR rr rr) (non-significant). The hybrid UMH 1203 x 21 showed yields similar to UMH 1354 (except in low inputs), and the hybrid UMH 1200 x IF presented the highest yield in the conventional system, and the lowest in the low input system.

Compared with UMH 1354 (RR RR rr), UMH 1203 showed reductions of over 30% and 20% in fruit number and fruit weight, respectively, and close to 20% in fruit weight compared with UMH 1422 (RR rr rr), with no differences in fruit number in this case (Fig. 3B). No reductions in yield were found in Muchamiel UMH 1200 (RR RR RR) compared with with the breeding lines without *Ty-1* gene, but fruit numbers were significantly higher and, conversely, fruit weight was lower (Fig. 3C).

3.2.5. BER

Fig. 4 shows the BER incidence in De la pera tomatoes grown under low input conditions as a percentage of BER-fruit with respect to the total fruit number. Breeding line UMH 1203 was affected by BER all three years (17%, 10% and 8%, respectively), while the hybrid UMH 1203 x 21 showed BER in 2017 (16%) and 2018 (13%). BER incidence in UMH 1354 was very low (around 2% the three years) and practically absent in UMH 1422.

3.2.6. Fruit quality

Analysis of variance identified no significance in the interactions 'L x C' for TA in both tomato types and TSS in Muchamiel, which means that the behaviour of the lines and hybrids was relatively similar among conditions. For TA in De la pera, UMH 1203 (RR RR RR) and UMH 1203 x 21 (Rr Rr Rr) showed reductions of around 20% on average compared with lines without the *Ty-1* gene. In Muchamiel, differences between triple resistant homozygous (UMH 1200) and lines without *Ty-1* (UMH 1139 and UMH 972) were similar to those observed in De la pera (although non-significant), but the hybrid UMH 1101 x IF showed the highest values in conventional and saline conditions (Fig. 5A). However, a different pattern existed for TSS. There was little difference among genotypes in De la pera, whereas the largest differences in Muchamiel were between hybrid UMH 1101 x IF and line UMH 1139, the former showing the highest values (Fig. 5B).

4. DISCUSION

4.1. Correlations

As found in this current research, positive correlations between TSS and TA were previously obtained in studies of tomato landraces and breeding lines (Ruiz et al., 2006; García-Martínez et al., 2012). In De la pera, both fruit number and fruit weight were positively correlated with total yield, suggesting that the lines with greater yields showed higher number of fruits and fruit weight. By contrast, the high yields in Muchamiel were due exclusively to fruit number, while lines with a higher number of fruits per plant showed low fruit weights, since tomato weight will be smaller because fruits will compete for space as well as for nutrients. Those results agree with Kumar et al. (2013) and Meena and Bahadur (2015).

Positive correlations between ECs and the traits evaluated indicate high values in plants grown in conventional and saline systems, while negative correlations point to the greater effects of low inputs. The results clearly point to better fruit quality (TA and TSS) with increasing EC, although not necessarily higher yields, especially in De la pera. This suggests great stability of yield in this variety in the culture systems used. On the other hand, BER incidence in low inputs explains the negative correlation between EC and this disorder. Finally, given the high correlations among the different ECs, it would justify the use of only one of these ways to measure the EC in future research.

4.2. Effects of conditions

4.2.1. Yield parameters

The effects of low inputs on the yield parameters revealed that: (1) De la pera breeding lines showed better behaviour than those of Muchamiel, (2) both De la pera and Muchamiel hybrids suffered large yield reductions with low inputs compared to conventional and saline conditions, and (3) decreases in yield were related with fruit number.

- (1) Non-significant differences in yield between low input and conventionally grown De la pera breeding lines suggest the presence of an efficient mechanism of nutrient assimilation in this variety, probably the result of an on-farm development in low input agriculture over the years. Several authors have indicated that such types of traditional cultivar are known to have high capacity to tolerate local biotic and abiotic stresses while maintaining good yield stability, being able to achieve moderate yields under local stressed conditions compared to modern cultivars, which usually show lower yields in

these environments (Ceccarelli, 1996; Zeven, 1998). This is the reason why modern varieties that have been successfully adopted to low input environment have generally been developed using local germplasm (Yapi et al., 2000). Contrary to De la pera, the Muchamiel breeding lines showed low yields in low-input systems compared to the yields obtained in conventional systems. Muchamiel is a landrace more popular in SE Spain than De la pera, which has traditionally been destined to marginal or subsistence agricultural situations. This suggests that the evolution of Muchamiel cultivars may be linked to high input systems and modern agricultural techniques and were selected by farmers in these environments. In this sense, it has been reported that genotypes selected for high performance in high input conditions are unable to maintain the same yields under low input or stress conditions due to the lack of natural genetic variation, since the genetic traits advantageous in low input systems are often overlooked (Ceccarelli, 1994; Foulkes et al., 1998; Murphy et al., 2005).

- (2) The hybrids seemed to show the effects of heterosis in conventional and saline systems, where they provided the highest yields. However, their behaviour was worse than that of the breeding lines when fertilizers were not supplied. This differential response suggests that the mechanisms that defines the vigour of these two hybrids are linked to a moderate-high level of fertilizer demand. Nevertheless, further studies will be necessary to clarify it.
- (3) Although there are few studies about the effects of low inputs on yield parameters using breeding tomato lines, our conclusions agree with Warner et al. (2004) and Segura et al. (2009). The first authors described substantial reductions in fruit numbers and no reduction in fruit weight in systems with half of the recommend rate of fertilization in soils in Almería, and the second authors, in a 4-year study of fertilization in soil with N rates ranging from 0 to 250 kg/ha, reported significant greater yields, number of fruits and number of trusses with increasing N levels, but no alterations in fruit weight.

As regards the saline system, several researchers have described reductions in tomato yield at similar levels of irrigation water EC as used in this study. Cuartero and Fernández-Muñoz (1998) concluded that yield reductions of up to 10% may occur when irrigating with 5-6 dS/m water, while Maggio et al. (2004) found decreases of 10% using 8.5 dS/m irrigation water in 10-year salinized soils. Recently, Zhai et al. (2015) described reductions of around 20% in a 3-year study with 5.5 dS/m saline water. Similar results were reported in pepino (*Solanum muricatum* Ait.), a salt-tolerant species related with tomato, which also showed losses in yield of 15-20% at 8.5 dS/m (Ruiz and

Nuez, 1997), as well as in some melon cultivars grown under salinity (4-6 dS/m water) in SE Spain (García-Martínez et al., 2018). Our results agree with these authors, since losses of around 10-15% in average in yield were found in almost all the lines and hybrids grown at our salinity levels. Although such differences in yield between saline and conventional systems were not statistically significant, they should be studied in future research, since a commercial tomato crop becomes unprofitable when yield reductions are higher than 10-15% (Cuartero and Fernández-Muñoz, 1998) and any increased economic value of the fruit due to improved quality is not sufficient to balance this.

According to the literature, decreases in yield under saline irrigation are due to reduced fruit weight rather than fruit number (Eltez et al., 2002; Maggio et al., 2004), especially at low levels of EC levels of the water used. At high EC values (>12 dS/m) the decline in yield is due to both reductions in fruit weight and in fruit number (Van Ieperen, 1996; Dorai et al., 2001). In this sense, Cuartero and Fernández-Muñoz (1998) concluded that the characteristics which explained the reductions in fruit number (number of trusses/plant, number of flowers/truss and fruit set index) only seemed to be related with high levels of salinity (13-15 dS/m), although the effects vary according to the cultivar. However, we reported noticeable reductions in fruit number (especially in De la pera), in agreement with Magán et al. (2008), who observed decreases in number of marketable fruits at 6-8 dS/m in the drainage solution. In our study, the reductions were not statistically significant compared to conventionally obtained data, so that further essays will be required to clarify how moderate and high salinity affects fruit number in our lines, and the reasons why the fruit weight remains invariable under moderate salinity.

4.2.2. BER

In tomato fruit, blossom-end rot is a physiological disorder positively correlated with fruit Na⁺ concentration and Na⁺/Ca²⁺ ratio, as well as with Ca²⁺ deficiency, which leads to plasma membrane damage, cell plasmolysis, and water-soaked tissue at the distal region of the fruit (Ho and White, 2005; Tonetto de Freitas et al., 2011; Chen et al., 2017). We found moderate BER incidence only in some De la pera breeding lines grown under low input conditions, probably due to the inefficient nutrition of the plants, while Muchamiel tomatoes seems to be little sensitive to this disorder. Our results are consistent with those of Cuartero and Fernández-Muñoz (1998) and Rached et al. (2018), who affirmed that the incidence of BER in tomato is closely linked to the variety and cultivar.

It has been demonstrated that salinity increases BER incidence in fruit (Cuartero and Fernández-Muñoz, 1998; Zhai et al., 2015). The presence of unusual amounts of Na⁺ in soil due to

the NaCl supply can alter the ion activity ratios, reducing the availability of Ca^{2+} in the fruit and promoting the occurrence of BER (Dorai et al., 2001). However, this disorder can be avoided with the use of saline-tolerant cultivars (Dorai et al., 2001; Rached et al., 2018). The absence of BER in our salinized plants suggests the existence of a relative tolerance to salinity in the De la pera and Muchamiel breeding lines and hybrids used.

4.2.3. Fruit quality

In tomato, TA and TSS seem to be mainly correlated with K fertilization according to Çolpan et al. (2013), while N seems to have any effect on these traits (Warner et al., 2004; Li et al., 2017). Neither Segura et al. (2009) nor Wang and Xing (2017) found differences in TSS and TA between the recommended rate and half the recommended rate of NPK fertilization (cv. Pitenza and cv. Jinpeng 10, respectively). However, our results agree with Abdelhady et al. (2017), who observed a significant reduction in TA and TSS at low rates of NPK fertilization. We found that low input conditions clearly reduced the quality of tomato fruit, particularly in Muchamiel. As observed for the yield parameters, it seems that De la pera is not as sensitive to low inputs as Muchamiel. These results lend weight to the idea that De la pera is better adapted to low amounts of fertilizer, while Muchamiel seems prefer moderate-high inputs.

Salinity increased the TA in De la pera, and the TSS in both types, especially in Muchamiel. However, the irrigation EC level used in this study may not have been sufficient to strongly enhance the fruit quality of these two tomato types, since, generally, the increases observed in TA and TSS were not as great as those reported in studies with similar EC water (Maggio et al., 2004; Magán et al., 2008; Zhai et al., 2015). It is known that the effects of salinity on quality depend on several factors, including the cultivar type and the culture system (Cuartero and Fernández-Muñoz, 1998; Reina-Sánchez et al., 2005). In that sense, Iglesias et al. (2015) concluded that increasing the EC of water to 4.5 dS/m did not lead to any significant improvement in TSS in some Marmande type varieties grown in the soil of Almería (Raf, Delizia, Conquista), apparently due to the relatively high salt tolerance of these varieties. Similar results were found in other species. In pepino, a salt-tolerant specie related to tomato, moderate-high levels of salinity (8 dS/m in water) were necessary to noticeably increase the TSS content (Ruiz and Nuez, 1997), while 4-6 dS/m increased the TSS by around 10% in non-grafted melon cultivars that are frequently cultivated in saline soils (García-Martínez et al., 2018). Our results suggest that De la pera and Muchamiel types may have developed a certain degree of tolerance to salinity through years of agriculture in saline soils and irrigated with waters from the salinized aquifers of SE Spain. It seems that higher EC levels will be required to increase substantially the quality of the fruits of these lines and hybrids. Increasing salinity to

improve fruit quality can be considered a useful strategy for increasing the value of tomatoes on the market with no additional costs and to promote agriculture in marginal and salinized regions, as long as any losses in yield do not compromise production (Rouphael et al., 2018).

4.3. Effects by genotypes

In agreement with Alonso et al. (2008) and Rubio et al. (2016), the presence of *Ty-1* gene in homozygosis seemed to affect the yield parameters and TA in UMH 1203 (RR RR RR) compared with De la pera breeding lines without *Ty-1*. In addition, the incidence of BER could be related with the presence of *Ty-1* gene in De la pera tomatoes, since only UMH 1203 and UMH 1203 x 21 (Rr Rr Rr) showed any noticeable sign of this disorder. As in the above studies, there were no effects on TSS among the resistant genotypes. In Muchamiel, differences between UMH 1200 (RR RR RR) and breeding lines without the *Ty-1* gene were very clear in terms of TA, but not in yield. Reductions in fruit weight were noticeable in UMH 1203, which, conversely, presented higher fruit numbers. These breeding lines were not obtained from exactly the same Muchamiel cultivars, so they could include slight genetic differences that could be masking the negative effects of *Ty-1* gene on yield.

Despite the close relationship between their parental genomes, Hybrid UMH 1203 x 21 showed higher values than UMH 1203 for yield in both conventional and saline systems. In the case of UMH 1101 x IF, the presence of the genome of Indische Fleisch (IF), an exotic heirloom, did not permit us to isolate and evaluate the effects of *Ty-1* in heterozygosis with respect to UMH 1200. However, the high TA and TSS values of this hybrid may be due precisely to the presence of the IF genome, since this landrace was selected as parental because of the good taste and the overall organoleptic quality of the fruit.

In general, the results indicated that the introduction in homozygosis of the *Ty-1* gene adversely affected some agronomic and quality traits, probably because of the negative effect of linked genes introduced along with the resistant gene that were not removed during backcrossing due to linkage drag (Verlaan et al., 2011). Our results agree with those of other authors, who observed negative effects related with resistance genes and/or linkage drag in homozygosis in tomato (Tanksley et al., 1998; Brouwer and St. Clair, 2004) and tobacco (Lewis et al., 2007). In addition, the results for hybrid UMH 1203 x 21 would confirm the validity of the use of virus-resistance genes introgressed in heterozygous state (F1 hybrids) to avoid their negative effects observed in homozygous lines (Tanksley et al., 1998).

Acknowledgements

The authors thank J. Vives for assisting in the analysis, and J. Martínez-Tomé, J.A. Cabrera, J. Amorós, E. Calderón, V. Durá, M.T. Rodríguez and C. Quiñonero for collaborating in these studies. This work was partially supported by the Spanish MICINN through the project AGL2011-26957 and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 634561 (TRADITOM). Pedro Carbonell has an ACIF/2016/212 contract of the program VALi+D of the "Conselleria de Educación, Investigación, Cultura y Deporte", included in the "Programa Operativo del Fondo Social Europeo (FSE) 2014-2020 de la Comunitat Valenciana". Thanks to Philip Thomas for the language review.

References

- Abdelhady, S., El-Azm, N., El-Kafafi, E., 2017. Effect of deficit irrigation levels and NPK fertilization rates on tomato growth, yield and fruits quality. *Middle East J. Agric. Res.* 6 (3), 587-604.
- Alonso, A., García-Martínez, S., Arroyo, A., García-Gusano M., Grau, A., Giménez-Ros, M., Ruiz, J., 2008. Efecto de la introducción de resistencia a TYLCV (gen Ty-1) en caracteres productivos y de calidad en tomate. *Actas de Horticultura* 51, 173-174.
- Brouwer, D., St Clair, D., 2004. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor. Appl. Genet.* 108, 628-638, 10.1007/s00122-003-1469-8
- Ceccarelli, S., 1994. Specific adaptation and breeding for marginal condition. *Euphytica* 77, 205-219, 10.1007/BF02262633
- Ceccarelli, S., 1996. Adaptation to low/high input cultivation. *Euphytica* 92 (1-2), 203-214, 10.1007/BF00022846
- Chen, S., Wang, Z., Zhang, Z., Guo, X., Wu, M., Rasool, G., Wang, X., 2017. Effects of uneven vertical distribution of soil salinity on blossom-end rot of tomato fruit. *HortScience* 52(7), 958-964, 10.21273/HORTSCI11815-17
- Çolpan, E., Zengin, M., Özbahçe, A., 2013. The effects of potassium on the yield and fruit quality components of stick tomato. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 54 (1), 20-28, 10.1007/s13580-013-0080-4
- Cuartero, J., Fernández-Muñoz, R., 1998. Tomato and salinity. *Sci. Hortic.* 78, 83-125, 10.1016/S0304-4238(98)00191-5

- Doorenbos, J., Pruitt, W.O., 1977. FAO 24 - Crop water requirements. L. Water Dev. Div. FAO Rome.
- Dorai, M., Papadopoulos, A., Gosselin, A., 2001. Influence of electric conductivity management on greenhouse tomato yield and fruit quality. *Agronomie* 21 (4), 367-383, 10.1051/agro:2001130
- Eltez, R., Tüzel, Y., Gül, A., Tüzel, I., Duyar, H., 2002. Effects of different EC levels of nutrient solution on greenhouse tomato growing. *Acta Hort.* 573, 443-448, 10.17660/ActaHortic.2002.573.53
- Foulkes, M., Sylvester-Bradley, R., Scott, R., 1998. Evidence for differences between winter wheat cultivars in acquisition of soil mineral nitrogen and uptake and utilization of applied fertilizer nitrogen. *J Agric Sci* 130, 29-44, 10.1017/S0021859697005029
- Gallais, A., Coque, M., 2005. Genetic variation and selection for nitrogen use efficiency in maize: A synthesis. *Maydica* 50, 531-547.
- García-Martínez, S., Alejandro, F., Sifres, A., Valcárcel, J., Pérez, A., Cebolla, J., Ruiz, J., 2018. Ion cultivars for biosaline agriculture. Davis, California USA: Cucurbitaceae abstracts.
- García-Martínez, S., Gálvez-Sola, L., Alonso, A., Agulló, E., Rubio, F., Ruiz, J., Moral, R., 2012. Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: quick estimation by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* 92, 1178-1185, 10.1002/jsfa.4661
- Heffner, E., Sorrells, M., Jannink, J., 2009. Genomic selection for crop improvement. *Crop. Sci.* 49, 1-12, 10.2135/cropsci2008.08.0512
- Ho, L., White, P., 2005. A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato fruit. A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato fruit. *Ann. Bot.* 95, 571-581, 10.1093/aob/mci065
- Iglesias, M., García-López, J., Collados-Luján, J., López-Ortiz, F., Díaz, M., Toresano, F., Camacho, F., 2015. Differential response to environmental and nutritional factors of high-quality tomato varieties. *Food Chem.* 176, 278-287, 10.1016/j.foodchem.2014.12.043
- Kumar, V., Nandan, R., Srivastava, K., Sharma, S., Kumar, R., Kumar, A., 2013. Genetic parameters and correlation study for yield and quality traits in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Asian J. Hort.* 7 (2), 454-459.
- Larkan, N., Smith, S., Barker, S., 2007. Position of the reduced mycorrhizal colonisation (Rmc) locus on the tomato genome map. *Mycorrhiza* 17, 311-318, 10.1007/s00572-007-0106-9

- Lewis, R., Linger, L., Wolff, M., Wersman, E., 2007. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theor. Appl. Genet.* 115, 169-178, 10.1007/s00122-007-0552-y
- Li, Y., Sun, Y., Liao, S., Zou, G., Zhao, T., Chen, Y., Zhang, L., 2017. Effects of two slow-release nitrogen fertilizers and irrigation on yield, quality, and water-fertilizer productivity of greenhouse tomato. *Agric. Water Manage.* 186, 139-146, 10.1016/j.agwat.2017.02.006
- Magán, J., Gallardo, M., Thompson, R., Lorenzo, P., 2008. Effects of salinity on fruit yield and quality of tomato grown in soil-less culture in greenhouses in Mediterranean climatic conditions. *Agric. Water Manage.* 95, 1041-1055, 10.1016/j.agwat.2008.03.011
- Maggio, A., De Pascale, S., Angelino, G., Ruggiero, C., Barbieri, G., 2004. Physiological response of tomato to saline irrigation in long-term salinized soils. *Eur. J. Agron.* 21, 149-159, 10.1016/S1161-0301(03)00092-3
- Meena, O., Bahadur, V., 2015. Genetic associations analysis for fruit yield and its contributing traits on indeterminate tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm under open field condition. *J. Agric. Sci.* 7(3), 148-163, 10.5539/jas.v7n3p148
- Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167, 645-663, 10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x
- Murphy, K., Lammer, D., Lyon, S., Carter, B., Jones, S., 2005. Breeding for organic and low-input farming systems: An evolutionary-participatory breeding method for inbred cereal grains. *Renew. Agr. Food Syst.* 20, 48-55, 10.1079/RAF200486
- Paranychianakis, N., Chartzoulakis, K., 2005. Irrigation of Mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106(2-3), 171-187, 10.1016/j.agee.2004.10.006
- Pašalić, B., Todorović, V., Koleška, I., Bosančić, B., Đekić, N., 2016. Effects of salinity on color changes, sugar and acid concentration in tomato fruit. *Agric. conspec. sci.* 81, 137-142.
- Picó, B., Herraiz, J., Ruiz, J., Nuez, F., 2002. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Sci. Hortic.* 94 (1-2), 73-89, 10.1016/S0304-4238(01)00376-4
- Pulido-Bosch, A., Rigol-Sanchez, J., Vallejos, A., Andreu, J., Ceron, J., Molina-Sanchez, L., Sola, F., 2018. Impacts of agricultural irrigation on groundwater salinity. *Environ. Earth. Sci.* 77, 197, 10.1007/s12665-018-7386-6

- Rached, M., Pierre, B., Yves, G., Matsukura, C., Ariizumi, T., Ezura, H., Fukuda, N., 2018. Differences in blossom-end rot resistance in tomato cultivars is associated with total ascorbate rather than calcium concentration in the distal end part of fruits per se. Hort. J. 87(3), 372-381, 10.2503/hortj.OKD-150
- Reina-Sánchez, A., Romero-Aranda, R., Cuartero, J., 2005. Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. Agric. Water Manage. 78, 54-66, 10.1016/j.agwat.2005.04.021
- Rouphael, Y., Petropoulos, S., Cardarelli, M., Colla, G., 2018. Salinity as eustressor for enhancing quality of vegetables. Sci. Hortic. 234, 361-369, 10.1016/j.scienta.2018.02.048
- Rubio, F., Alonso, A., García-Martínez, S., Ruiz, J., 2016. Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): effects on yield and quality. Sci. Hortic. 198, 183-190, 10.1016/j.scienta.2015.11.025
- Ruiz, J., Nuez, F., 1997. The pepino (*Solanum muricatum* Ait.): an alternative crop for areas affected by moderate salinity. HortScience 43(4), 649-652.
- Ruiz, J., Valero, M., García-Martínez, S., Serrano, M., Moral, R., 2006. Effect of recent genetic improvement on some analytical parameters of tomato fruit quality. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 37, 2647-2658, 10.1080/00103620600823109
- Ruiz, J., García-Martínez, S., 2009. Tomato varieties 'Muchamiel' and 'De la pera' from the southeast of Spain: genetic improvement to promote on-farm conservation, in M. Veteläinen, V. Negri and N. Maxted (Eds.), European landrace: on-farm conservation, management and use. Biodiversity Technical Bulletin no 15, Rome: Bioversity International, pp. 171-176.
- Segura, M., Contreras, J., Salinas, R., Lao, M., 2009. Influence of salinity and fertilization level on greenhouse tomato yield and quality. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 40:1-6, 485-497, 10.1080/00103620802697764
- Tanksley, S., Bernachi, D., BeckBunn, T., Emmatty, D., Eshed, Y., Inai, S., Zamir, D., 1998. Yield and quality evaluations on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the *Tm2a* gene for resistance to the tobacco mosaic virus. Euphytica 99, 77-83, 10.1023/A:1018320232663
- Team R Core, 2017. R: a language and environment for statistical computing, Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Tester, M., Langridge, P., 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. Science 327, 818-822, 10.1126/science.1183700

- Tonetto de Freitas, S., Padda, M., Wu, Q., Park, S., Mitcham, E., 2011. Dynamic alterations in cellular and molecular components during blossom-end rot development in tomatoes expressing sCAX1, a constitutively active Ca²⁺/H⁺ antiporter from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 156, 844–855, 10.1104/pp.111.175208
- Vance, C., 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources.* *Plant Physiol.* 127, 390-397, 10.1104/pp.127.2.390
- van Ieperen, W., 1996. Effect of different day and night salinity levels on vegetative growth, yield and quality of tomato. *J. Agric. Sci.* 71, 99-111.
- Verlaan, M., Szinay, D., Hutton, S., de Jong, H., Kormelink, R., Visser, G., Bai, Y., 2011. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *Plant J.* 68(6), 1093-1103, 10.1111/j.1365-3113.2011.04762.x
- Wang, X., Xing, Y., 2017. Evaluation of the effects of irrigation and fertilization on tomato fruit yield and quality: a principal component analysis. *Sci. Rep.* 7 (1), 350, 10.1038/s41598-017-00373-8
- Warner, J., Zhang, T., Hao, X., 2004. Effects of nitrogen fertilization on fruit yield and quality of processing tomatoes. *Can. J. Plant Sci.* 84 (3), 865-871, 10.4141/P03-099
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*, New York: Springer-Verlag.
- Yapi, A., Kergna, A., Debrah, S., Sidibe, A., Sanogo, O., 2000. Analysis of the economic impact of sorghum and millet research in Mali, in *Summaries, Fr. Impact Series no. 8.* Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 60 pp. ISBN 92-9066-419-3. Order code ISE 008
- Zeven, A., 1998. Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica* 104 (2), 127-139, 10.1023/A:1018683119237
- Zhai, Y., Yang, Q., Hou, M., 2015. The effects of saline water drip irrigation on tomato yield, quality, and blossom-end rot incidence - a 3a case study in the south of China. *PLoS ONE* 10(11): e0142204. 10.1371/journal.pone.0142204

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN



*Contribución al programa de mejora genética de tomate EPSO-UMH***a. Obtención de nuevas líneas de mejora UMH***Líneas UMH 1353 y UMH 1354*

Proceden del cruce entre la accesión De la pera P21 y el híbrido Anastasia F₁. Tras seis retrocruzamientos asistidos por marcadores moleculares, seguido de la autofecundación de dos individuos BC₆ y dos ciclos más de autofecundación, se seleccionaron finalmente estas dos líneas homocigóticas para los genes *Tm-2a* y *Sw-5*, los cuales confieren resistencia a ToMV y TSWV, respectivamente.

En las evaluaciones agronómicas y de calidad, ambas líneas mostraron escasas diferencias entre ellas. Sin embargo, sus características productivas fueron muy superiores a la línea triple homocigota UMH 1203, así como a otras líneas UMH De la pera obtenidas anteriormente. El contenido de acidez del fruto fue similar o incluso superior a otras líneas De la pera, y el nivel en sólidos solubles totales fue variable según el año del ensayo.

Tanto UMH 1354 como UMH 1354 se encuentran ya registradas y disponibles, siendo especialmente recomendables para un cultivo en zonas de gran exposición a ToMV y TSWV durante el ciclo de primavera-verano. Para el ciclo de otoño-invierno se aconseja su uso en cultivo protegido, ya que es la época de mayor incidencia de TYLCV.

Líneas UMH 1400 y UMH 1401

Proceden del cruce entre un cultivar cherry pera tradicional y el híbrido Anastasia F₁. Fueron necesarios 12 ciclos de retrocruzamiento asistido por marcadores y evaluación del fenotipo, así como el autocruzamiento del BC₁₂, para obtener las líneas cherry pera UMH 1400, homocigótica para los genes *Tm-2a*, *Ty-1* y *Sw-5*, y UMH 1401, homocigótica para *Tm-2a* y *Sw-5* (Figura 25).

En las evaluaciones agronómicas y de calidad que se realizaron de 2013 a 2015, la línea UMH 1400 mostró reducciones significativas en algunos caracteres productivos con respecto al parental cherry pera, así como también en el contenido de acidez del fruto. Es muy posible que se deba a la presencia de la introgresión *Ty-1* en homocigosis, tal y como también ha sido descrito en otras líneas Muchamiel y De la pera conteniendo este gen de tolerancia a TYLCV. Por el contrario, la línea UMH 1401, que no tiene *Ty-1*, mostró notables incrementos del rendimiento y el peso del fruto, sin diferencias en la calidad del fruto con respecto al parental.

Ambas líneas se encuentran ya registradas y disponibles. La línea UMH 1401 se recomienda para el ciclo de primavera-verano en zonas con alta presencia de ToMV y TSWV, como lo es el sureste español. La línea UMH 1400 podría proporcionar un rendimiento aceptable para el agricultor en cultivo al aire libre en zonas de alta incidencia de TYLCV.



Figura 25. Líneas Cherry pera UMH 1400 (izquierda) y UMH 1401 (derecha).

Títulos de obtención varietal

El registro de las líneas UMH 1353 y UMH 1354 en la Oficina Española de Variedades Vegetales se materializó en septiembre del año 2017 en calidad de variedades protegidas, con números de registro 20145183 y 20145184, y números de título 2787 y 2788, respectivamente (Figura 26).

El registro de las líneas de tipo cherry pera UMH 1400 y UMH 1401 tuvo lugar en febrero de 2019 también en calidad de variedades protegidas, con número de registro 20155245 y 20155246, y números de título 2887 y 2888, respectivamente (Figura 26). En este caso, soy co-obtentor de ambas líneas.

**MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE**


**DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS Y
OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES**

TÍTULO DE OBTENCIÓN VEGETAL

La Sra. Ministra de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, de conformidad con lo dispuesto en la Ley 3/2000 de 7 de enero, de Régimen Jurídico de la Protección de las Obtenciones Vegetales, a propuesta de la Comisión de Protección de Obtenciones Vegetales, y una vez comprobados que se cumplen todos los requisitos legalmente establecidos se informa que, ha decidido conceder, desde el día 9 de septiembre de 2017 hasta el día 31 de diciembre de 2042, el siguiente Título de Obtención Vegetal:

A : UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ
N° de Título : 2788
Especie : TOMATE
Variedad : UMH 1354
N° : 20145184

Madrid 11 de septiembre de 2017
LA SUB. GRAL. MEDIOS PROD. AGRÍCOLAS Y
OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES


Esther Esteban Rodrigo.

**MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE**


**DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS Y
OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES**

TÍTULO DE OBTENCIÓN VEGETAL

La Sra. Ministra de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, de conformidad con lo dispuesto en la Ley 3/2000 de 7 de enero, de Régimen Jurídico de la Protección de las Obtenciones Vegetales, a propuesta de la Comisión de Protección de Obtenciones Vegetales, y una vez comprobados que se cumplen todos los requisitos legalmente establecidos se informa que, ha decidido conceder, desde el día 9 de septiembre de 2017 hasta el día 31 de diciembre de 2042, el siguiente Título de Obtención Vegetal:

A : UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ
N° de Título : 2787
Especie : TOMATE
Variedad : UMH 1353
N° : 20145183

Madrid 11 de septiembre de 2017
LA SUB. GRAL. MEDIOS PROD. AGRÍCOLAS Y
OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES


Esther Esteban Rodrigo.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

**DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLAS Y
OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ
AV. DE LA UNIVERSIDAD, S/N
03202 ELCHE (ALICANTE)**

MANUEL MIGUEL JORDÁN VIDAL

03 ABR 2018
N.º 964

26 ABR 2018
N.º 001/1463

Concluida la instrucción de los expedientes relacionados a continuación, se les comunica que, en el plazo de 10 días hábiles contados a partir del día siguiente a la recepción del presente escrito, podrán examinar dichos expedientes, así como alegar y presentar los documentos y justificantes que consideren convenientes.

Transcurrido dicho plazo sin presentarse alegaciones, estas variedades serán propuestas para la concesión del título de obtención vegetal en la próxima reunión de la Comisión de Protección de Obtenciones Vegetales

NRVP	ESPECIE	VARIEDAD
20155245	TOMATE	UMH 1400
20155246	TOMATE	UMH 1401
20155249	TOMATE	UMH 1402

Madrid, 26 de abril de 2018

Jefe de Área del Registro de Variedades

Fdo.: José Antonio Sobrino Maté

Figura 26. A la izquierda, títulos de obtención varietal de las líneas UMH 1353 y UMH 1354; a la derecha, título de obtención de las líneas cherry UMH 1400 y UMH 1401.

b. Diseño y puesta a punto de nuevos marcadores moleculares para HRM

Diseño y puesta a punto de un marcador asociado al gen *Ty-1*

El gen *Ty-1* se encuentra entre las posiciones 34.358.732 y 34.390.591 pb en el cromosoma 6 del genoma SL2.50 ITAG2.4 (<http://solgenomics.net/>). De los SNPs disponibles entre líneas con *Ty-1* y líneas sin resistencia, se escogieron el solcap_sl_snp_100298, ubicado en la zona anterior al gen, y los SNPs solcap_sl_snp_44625 y solcap_sl_snp_44650 (Sim et al., 2012), que se encuentran en la zona posterior (Figura 27). Aunque los polimorfismos no se encuentren dentro del gen, su gran cercanía a él nos permite suponer una buena asociación. Los SNPs solcap_sl_snp_100298 y solcap_sl_snp_44625 representan una inversión T por G, mientras que solcap_sl_snp_44650 es una inversión A por G.

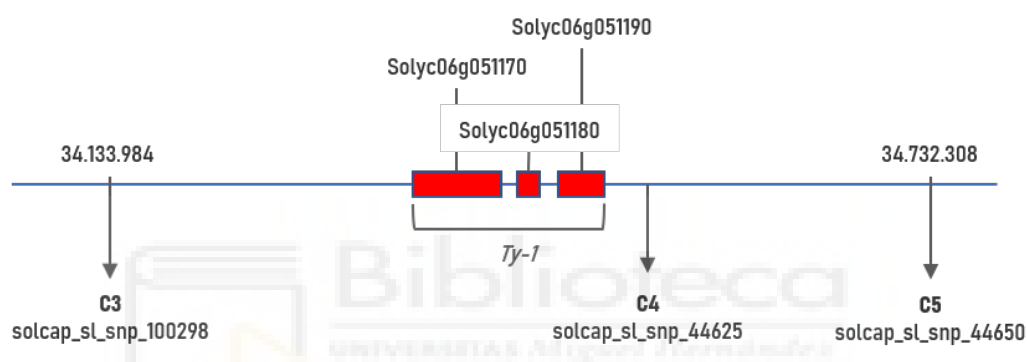


Figura 27. Posición física del gen *Ty-1* y de los SNPs escogidos para el diseño de marcadores moleculares en el cromosoma 6 del genoma SL2.50 ITAG2.4 (<http://solgenomics.net/>).

Se diseñaron cebadores a partir de la secuencia de flanco de cada SNP mediante el *software* Primer3. Los criterios fueron: tamaño de cebador de 20-25 pb, amplicón de PCR entre 100 y 200 pb, temperatura de *melting* alrededor de 60 °C y bajo grado tanto de complementariedad entre los dos cebadores como de autocomplementariedad. De esta forma, se escogió una pareja de cebadores para cada polimorfismo, nombrándolos C3, C4 y C5 (Figura 27) (Tabla 9).

Tabla 9. Cebadores escogidos para cada marcador de *Ty-1*.

Tc: Tamaño del cebador; Tm: temperatura de *melting*; C: complementariedad entre los cebadores; AC: autocomplementariedad del cebador; Ta: Tamaño del amplicón en la PCR

Marcador	Cebadores (5'->3')	Tc (pb)	Tm (°C)	C	AC	Ta (pb)
C3	GAATTGGAGATTCTGGACCTG	21	58,6	5	3	175
	TTGTCTGATAAGCTGCATTAGTGT	24	58,2	5	2	
C4	GCTATCATAACGATCAGAGCATCA	23	59,4	6	1	101
	GCATCAGAACTTCATTTGATTG	23	58,8	4	2	
C5	ACTTTTATGACAAGGCCAGCTT	22	59,3	4	2	100
	TCAAGGGTAGGTACAAGTGATGGA	24	59,1	6	0	

A continuación, se evaluó el comportamiento de cada marcador en varios análisis HRM. La puesta a punto se basó en aplicar los volúmenes de reactivos y las condiciones de PCR y *melting* descritos previamente para los cebadores T4 (gen *Tm-2a*) y B3 (gen *Sw-5*), ya que los cebadores diseñados para *Ty-1* amplifican un fragmento menor de 200 pb, y su temperatura de *melting* es cercana a 60 °C, siendo condiciones similares a las de T4 y B3.

En una primera prueba, los marcadores C3 y C4 fueron capaces de distinguir perfectamente los genotipos homocigotos resistentes y sensibles para *Ty-1*, mientras que el marcador C5 no fue tan preciso (Figura 28). En una segunda prueba, en la que se añadieron individuos heterocigotos a la población control, el marcador C4 demostró ser el más eficaz y preciso. De esta forma, el marcador C4 fue el elegido para ser implementado en el programa de mejora UMH. Además, la gran ventaja de C4 es su excelente comportamiento bajo las condiciones de PCR (con un C_t menor de 30) y *melting* de los marcadores T4 y B3, lo que permite agrupar los tres en un mismo análisis HRM y ahorrar mucho tiempo cuando hay que seleccionar los tres genes de resistencia en una misma población.

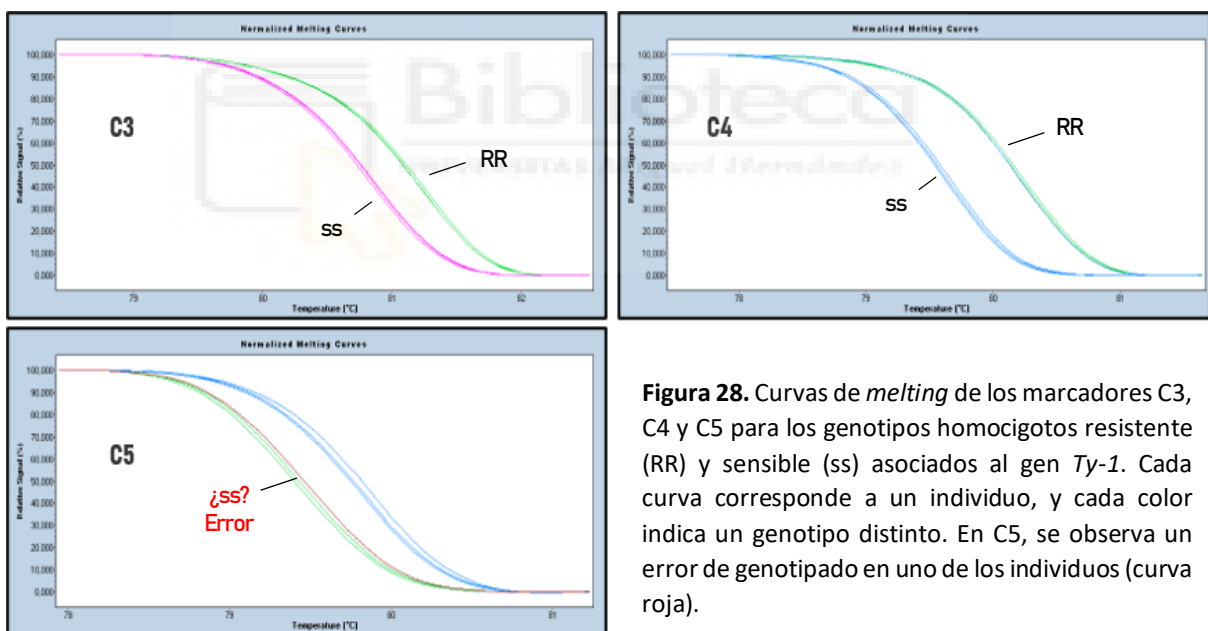


Figura 28. Curvas de *melting* de los marcadores C3, C4 y C5 para los genotipos homocigotos resistente (RR) y sensible (ss) asociados al gen *Ty-1*. Cada curva corresponde a un individuo, y cada color indica un genotipo distinto. En C5, se observa un error de genotipado en uno de los individuos (curva roja).

Puesta a punto del marcador asociado al gen ty-5

Este proceso conllevó una serie de dificultades técnicas, ya que la diferencia entre las temperaturas de fusión de las curvas de los genotipos homocigoto resistente y sensible es muy pequeña (en torno a 0,35 °C) y, en ocasiones, era muy difícil distinguirlas. Se realizaron numerosas

pruebas, que permitieron ajustar los factores de mayor relevancia para el correcto genotipado de las plantas, tal y como veremos a continuación.

La concentración de $MgCl_2$ en la mezcla es clave para obtener una buena amplificación, ya que afecta directamente a la especificidad de los cebadores en la cadena de ADN. Por ello, se realizaron diversos experimentos comparando tres concentraciones distintas: 3, 3,5 y 4 nM. En todas las pruebas, la concentración de 3,5 nM proporcionó los mejores resultados.

Seguidamente, se estudiaron diferentes concentraciones de los cebadores, otro factor de gran importancia que incide en la eficiencia de la amplificación del ADN. Se realizaron análisis con tres concentraciones distintas (0,1, 0,15 y 0,2 μM). En la Figura 29 se observa claramente que la concentración de 0,2 μM es la que separa los tres genotipos con mayor precisión.

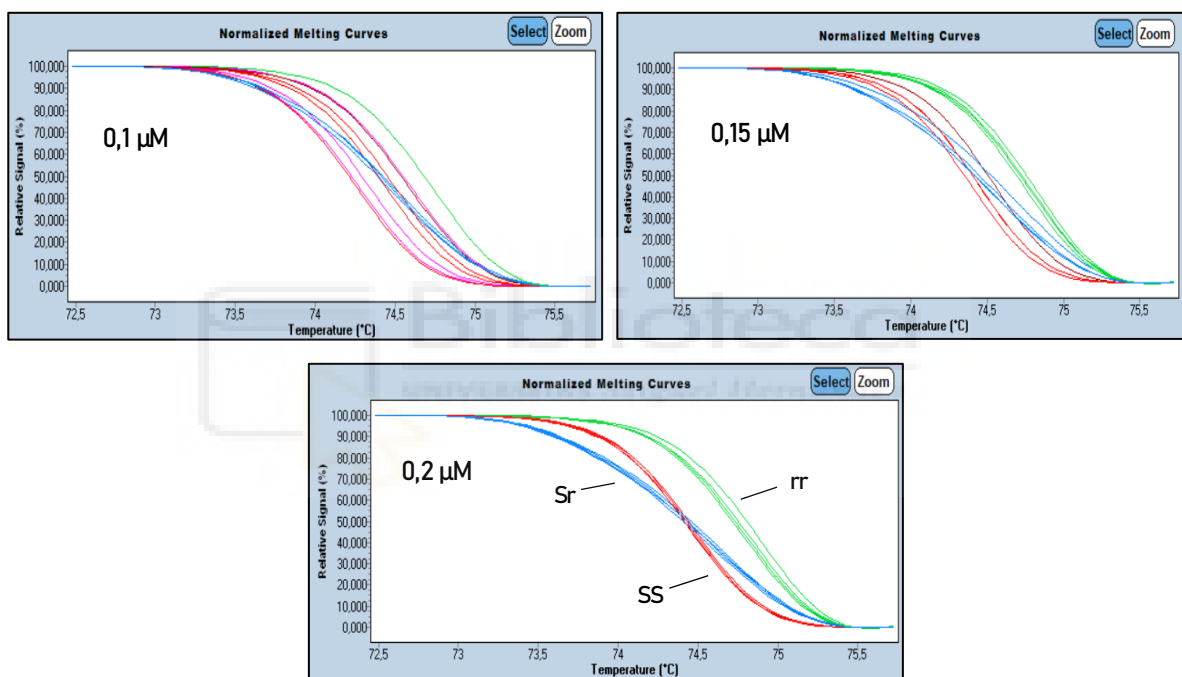


Figura 29. Prueba con diferentes concentraciones de los cebadores (0,1, 0,15 y 0,2 μM) para el marcador asociado al gen *ty-5*. Se utilizaron las mismas muestras homocigotas resistentes (**rr**) y sensibles (**SS**) y heterocigotas sensibles (**Sr**) para los tres análisis.

También se experimentó con la duración de las etapas de anillamiento de los cebadores y extensión del ADN. Mientras que para los marcadores T4, C4 y B3 fue suficiente una duración de 15 segundos en ambas etapas, se comprobó que aumentar el tiempo de anillamiento a 20 s y la extensión del ADN a 25 s mejoraba la calidad de la amplificación en el caso del marcador *ty-5*.

Otro factor clave para la optimización del proceso fue el número de ciclos de PCR. Para los marcadores T4, C4 y B3 fueron suficientes 45 ciclos, pero para *ty-5* se necesitó aumentar el número de ciclos a 55 para conseguir una mejor separación de los genotipos homocigotos (Figura 30).

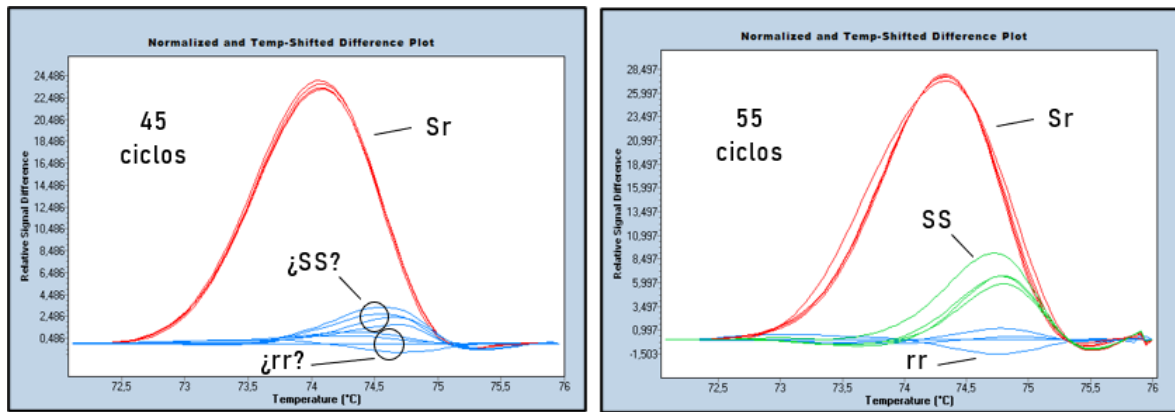


Figura 30. Resultados de dos análisis de genotipado del gen *ty-5*, utilizando las mismas plantas homocigotas resistentes y sensibles y heterocigotas. A la izquierda, prueba realizada con 45 ciclos de PCR; a la derecha, misma prueba con 55 ciclos. **rr**: homocigoto resistente; **SS**: homocigoto sensible; **Sr**: heterocigoto sensible.

Tras las pruebas, se ajustaron las concentraciones del resto de reactivos en la mezcla de reacción. Por tanto, esta mezcla se compone de 5 μl de Master mix, 1,4 μl de MgCl_2 25 nM (concentración final de 3,5 mM), 0,2 μl por cebador (concentración final de 0,2 mM), 2, μl de agua y 0,5 μl de ADN, por lo que el volumen final es de 10 μl .

En cuanto al protocolo de HRM, se ajustaron los tiempos de las etapas de PCR y el número de ciclos se estableció en 55, como ya hemos visto. Se probaron diferentes temperaturas de anillamiento, pero finalmente se optó por la teórica (53 $^{\circ}\text{C}$), ya que ofrecía los mejores resultados. Este protocolo se utiliza para controlar la presencia del gen *ty-5* durante el programa de mejora, mostrando una altísima fiabilidad en el genotipado de retrocruces (Figura 31).

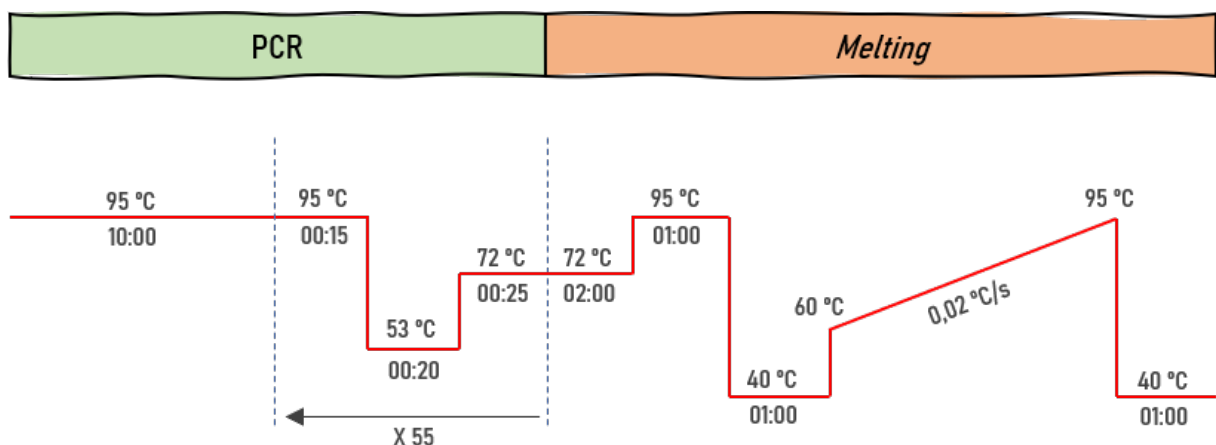


Figura 31. Protocolo de HRM para el marcador asociado al gen *ty-5*, diseñado específicamente para el instrumento LigthCycler 480[®] de Roche y los reactivos de esta marca comercial.

c. Implementación de la técnica HRM en el programa de mejora

Uno de los inconvenientes que presenta la técnica HRM frente al uso de CAPS es su mayor coste debido al alto precio del Lightcycler® 480 y de los reactivos asociados. Por ello, uno de los objetivos en los análisis preliminares fue el de reducir el volumen final de reacción, que estaba estandarizado para 20 µl. Se realizaron pruebas a 10, 15 y 20 µl de volumen de reacción, concluyendo que no existen grandes diferencias entre los tres. Por tanto, se optó por realizar todos los análisis a 10 µl de mezcla final, lo que supone una reducción del 50% del volumen de reactivos.

La implementación de la técnica HRM fue posible tras la puesta a punto de todos los marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia. La primera vez que se utilizó a gran escala fue para el genotipado de las plantas pertenecientes al primer retrocruzamiento (BC₁) del programa de introducción del gen *ty-5*. En la Figura 32 quedan plasmadas las curvas de fusión o *melting* de los genotipos homocigotos resistentes y sensibles y heterocigotos para cada uno de los marcadores moleculares utilizados para el control de los genes *Tm-2a*, *Ty-1*, *Sw-5* y *ty-5*.

Esta técnica posee varias ventajas con respecto al tradicional uso de CAPS en el programa de mejora. La más evidente de todas es la rapidez en el genotipado de las plantas, lo cual es sumamente importante cuando se analiza un gran número de individuos, ya que sólo se dispone de unas dos semanas desde la toma de muestras en semillero hasta que la plántula está preparada para trasplantar a invernadero. En ese corto espacio de tiempo, se debe realizar la extracción del ADN y el genotipado de cada individuo para poder realizar la selección. En este sentido, la duración del genotipado mediante HRM es casi 3 veces menor que con CAPS (Tabla 10), lo cual permite analizar un gran número de plantas y llevar a cabo una mejor gestión del limitado tiempo disponible. Esto se traduce en un genotipado de gran calidad, evitando errores y maximizando la eficiencia del proceso.

Tabla 10. Duración máxima aproximada de cada una de las fases del genotipado mediante CAPS y HRM en el laboratorio del grupo de mejora EPSO-UMH, considerando el análisis de 98 muestras (una placa).

CAPS		HRM	
Fases	Duración (min)	Fases	Duración (min)
Preparación de la PCR	60	Preparación	60
PCR	90	PCR	90
Electroforesis PCR	60	<i>Melting</i>	30
Preparación de la digestión	60		
Digestión	150		
Electroforesis digestión	60		
TOTAL	480		180

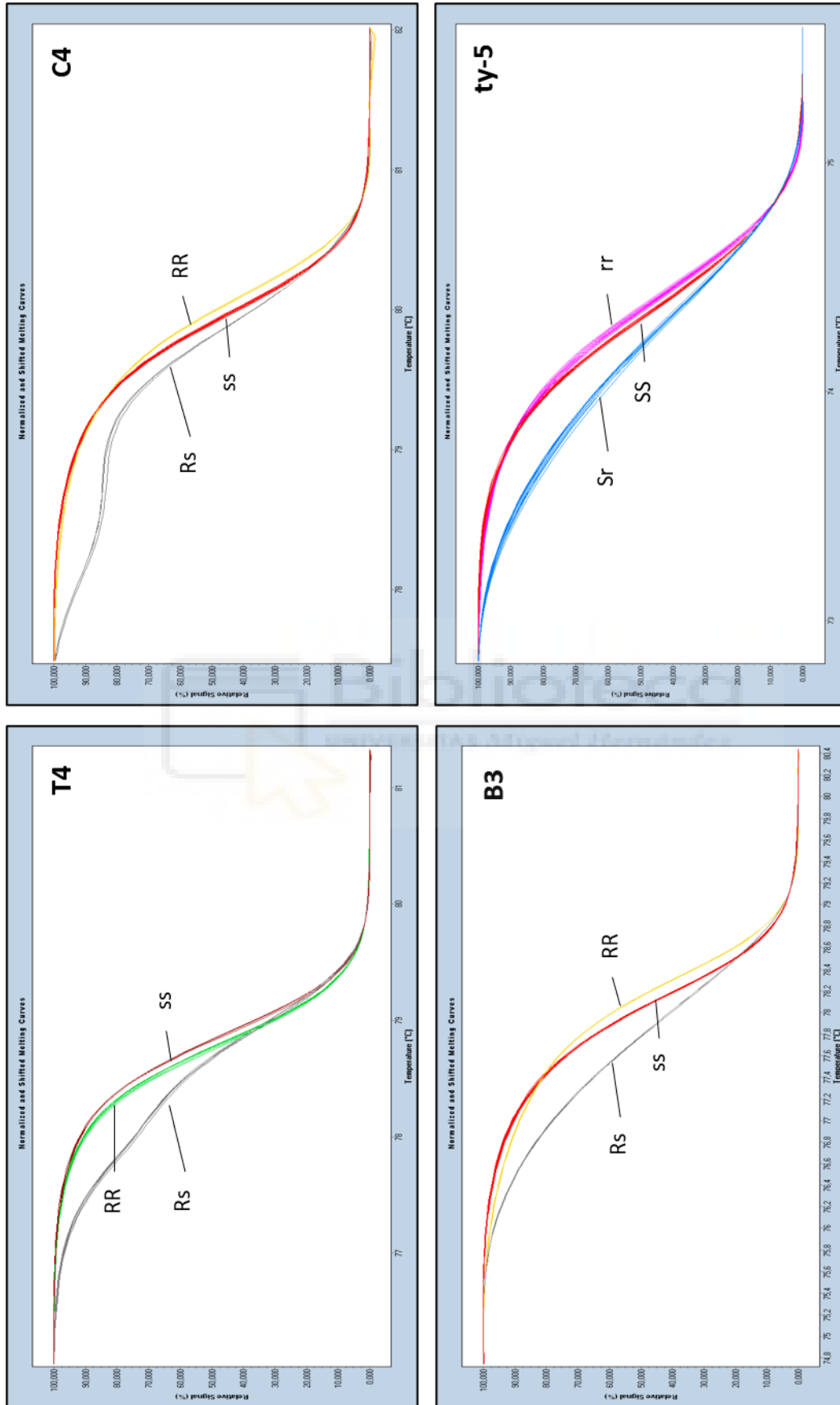


Figura 32. Curvas de fusión para los marcadores T4 (Tm-2a), C4 (Ty-1), B3 (Sw-5) y ty-5 (ty-5) para los genotipos homocigoto resistente (RR; rr), heterocigoto resistente (Rr), heterocigoto sensible (Sr) y homocigoto sensible (ss; SS) en cada caso. Estos análisis están realizados en el sistema LightCycler® 480 de Roche perteneciente al grupo de Biodiversidad y Mejora Genética de la EPSO-UMH.

d. Complementación de la resistencia a TYLCV mediante la introgresión del gen *ty-5* en líneas de mejora UMH.

Durante el periodo 2017-2019, se ha llevado a cabo el cruzamiento de los parentales seguido de cuatro ciclos de retrocruzamientos, y en primavera del año 2020 se han plantado los individuos BC₄ genotipados. En el segundo ciclo de retrocruzamiento, las plantas del BC₁ de la línea UMH 1203 mostraron un fenotipo incorrecto, seguramente debido a un fallo en la polinización o en la recolección del fruto polinizado. Por tanto, se decidió apartar esta línea del programa.

El número de plantas genotipadas en cada ciclo de retrocruce estuvo en función del número de plantas seleccionadas fenotípicamente durante el ciclo anterior (Tabla 11). En general, se procuraba obtener unas 10 plantas de cada retrocruce seleccionado. Por ejemplo, en el caso de la línea UMH 1200 se seleccionaron cuatro plantas del BC₁ para ser retrocruzadas por segunda vez. La progenie de cada planta retrocruzada segregaba para el gen *ty-5* en individuos heterocigotos (50% Sr) y homocigotos sensibles (50% SS), mientras los demás genes de resistencia quedaban fijados en homocigosis. De esta forma, fue necesario genotipar 20 plantas de cada retrocruce para discriminar unas 10 heterocigotas para el gen *ty-5*. Como había cuatro retrocruces seleccionados, se genotiparon 80 plantas en total, es decir, 20 por cada uno de ellos. Considerando el programa en su conjunto, en cada ciclo se han genotipado de 400 a 600 plantas. Excepcionalmente, el genotipado fue mucho más intenso tras el retrocruce de la generación F₁, ya que la segregación de los genes de resistencia fue mayor en este caso.

La presión de selección fenotípica sobre los retrocruces también fue muy intensa en cada ciclo, tal y como puede apreciarse en la Tabla 11. En general, se seleccionaron fenotípicamente entre 2-7 plantas de cada retrocruce durante los tres primeros ciclos.

Tabla 11. Para cada ciclo BC_n, nº de plántulas genotipadas en semillero (Gen), nº de plantas seleccionadas genotípicamente y trasplantadas (Tras) y nº de plantas adultas seleccionadas según el fenotipo (Sel), para cada una de las líneas del programa de mejora.

	BC ₁			BC ₂			BC ₃			BC ₄	
	Gen	Tras	Sel	Gen	Tras	Sel	Gen	Tras	Sel	Gen	Tras
UMH 1200	60	9	4	60	18	2	35	16	6	60	20
UMH 1139	40	4	3	45	15	3	60	31	5	75	25
UMH 1203	60	5	3	50	0	0	-	-	-	-	-
UMH 1406	60	5	3	55	13	4	80	33	6	90	30
UMH 1354	40	5	3	60	24	5	95	27	7	105	35
UMH 1422	50	12	4	75	19	3	60	27	7	105	35

II

Estudio del comportamiento de líneas de mejora e híbridos UMH con resistencias a virus en condiciones de agricultura de resiliencia

a. Evaluación de caracteres productivos y de calidad de líneas e híbridos UMH de tipo Muchamiel y De la pera en condiciones de cultivo de bajos insumos y riego salino.

ANOVAs

Los resultados de los tres años correspondientes a cada uno de los ensayos se analizaron conjuntamente mediante un modelo ANOVA en *split-plot*, permitiéndonos evaluar el efecto Genotipo x Ambiente de forma profunda. El ANOVA reveló que no hubo diferencias significativas entre los años, excepto para el rendimiento en Muchamiel. Opuestamente, se encontraron grandes diferencias entre las condiciones de cultivo y también entre las diferentes líneas e híbridos para casi todos los parámetros. El comportamiento de los cultivares fue variable en rendimiento y número de frutos entre condiciones, y más estable en el peso del fruto y parámetros de calidad.

Correlaciones

Se observó una altísima correlación entre la medición de la CE de la solución de riego y de la solución del suelo a 15 y 30 cm de profundidad, lo que sugiere que sería posible llevar a cabo una simplificación de la técnica de medición sin perder información valiosa. Por otro lado, la correlación fue positiva entre la conductividad y los parámetros de calidad, indicando que los frutos producidos en condiciones de salinidad tuvieron valores significativamente más altos de acidez y ^oBrix.

Efectos de las condiciones de cultivo

A continuación, se analizan los efectos debidos al sistema de cultivo empleado sobre los parámetros productivos, la incidencia de podredumbre apical y los caracteres relacionados con la calidad del fruto. Para facilitar el análisis, los resultados obtenidos en las condiciones de bajos insumos y salinidad se comparan con los resultados derivados del sistema de cultivo convencional.

Parámetros productivos

En la condición de bajos insumos, se observaron tres hechos destacables:

- i. El rendimiento se redujo en todos los cultivares respecto a la condición convencional. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas en las líneas De la pera, las cuales mostraron un comportamiento sorprendentemente bueno en ausencia total de fertilización. Esto sugiere la presencia de un mecanismo de asimilación de nutrientes muy eficiente en esta variedad. Es probable que sea el resultado de muchos años de cultivo y

selección en sistemas ligados al autoconsumo y la agricultura marginal, en los que es habitual el aporte escaso de insumos. Muchos autores han indicado que este tipo de variedades tradicionales presentan un comportamiento relativamente estable en condiciones no óptimas, siendo capaces de proporcionar rendimientos moderados en condiciones locales de estrés. En cambio, la variedad Muchamiel parece estar ligada a ambientes de medio o alto aporte de nutrientes, por ello su bajo rendimiento en bajos insumos. La variedad Muchamiel ha tenido tradicionalmente un cultivo y comercialización mucho más amplio de la De la pera, por lo que es posible que se desarrollara en ambientes de mayor fertilización, para favorecer la producción.

- ii. El bajo rendimiento de los híbridos en bajos insumos puede deberse a su propia naturaleza. Quizás, la expresión del vigor híbrido esté relacionado con un sistema de alta fertilización, aunque serán necesarios más estudios para averiguarlo.
- iii. La pérdida de rendimiento estuvo relacionada con la reducción en el número de frutos por planta en todos los casos, mientras el peso medio del fruto permaneció invariable entre las tres condiciones de cultivo. Estos resultados coinciden con otros estudios de fertilización realizados en tomate.

En condiciones salinas, se produjeron reducciones en el rendimiento (10-15% de media) en los dos tipos de tomate, lo cual coincide con los resultados obtenidos por otros autores, e incluso son menores comparados con algunos de ellos. A pesar de que estas reducciones no fueron estadísticamente significativas, es necesario valorar si el aumento de la calidad del fruto inducido por la salinidad compensaría una menor producción. Por otro lado, aunque la mayor parte de la literatura indica que la pérdida de producción en ambientes de salinidad moderada se debe más a la reducción del peso que al número de frutos, nosotros obtuvimos resultados opuestos.

Incidencia de podredumbre apical (peseta)

La incidencia de peseta se observó únicamente en las líneas De la pera cultivadas en condiciones de bajos insumos. Este desorden fisiológico ya había sido descrito anteriormente como dependiente de la variedad y el cultivar.

Al contrario de lo que cabría esperar, no se observaron signos de podredumbre apical en ningún cultivar en condiciones de salinidad. Esto sugiere la existencia de cierta tolerancia genética a la salinidad en nuestras líneas e híbridos, probablemente debido a su cultivo tradicionalmente en zonas con presencia de suelos y acuíferos salinizados.

Calidad del fruto

El cultivo en bajos insumos afectó negativamente a la calidad del fruto, especialmente en los tomates de tipo Muchamiel. El parámetro más afectado fue el contenido en acidez, con reducciones alrededor del 30-40% en los cultivares Muchamiel. En cambio, la disminución en el contenido en sólidos solubles no fue tan acentuada. De nuevo, los resultados sugieren una mejor adaptación de la variedad De la pera a la reducción de insumos.

La salinidad incrementó el contenido en acidez y sólidos solubles en ambos tipos de tomate, aunque no llegó a los niveles descritos en otros estudios en condiciones de salinidad parecidas. Como destacábamos anteriormente, es posible que ambas variedades hayan desarrollado tolerancia genética a la salinidad durante su cultivo en suelos y acuíferos salinizados, presentes habitualmente en el sureste español. Por tanto, parece razonable que un aumento notable de los parámetros de calidad en estas variedades requiera del uso de mayores valores de CE en el agua de riego.

b. Evaluación del efecto de la introgresión de genes de resistencia procedentes de especies silvestres de tomate en diversos parámetros agronómicos y de calidad.

En primer lugar, es necesario señalar que las líneas utilizadas no son NILs, por lo que las ligeras diferencias genéticas entre ellas podrían enmascarar el efecto de las introgresiones en los parámetros estudiados. A pesar de esto, parece claro que la presencia del gen *Ty-1* en homocigosis afectó negativamente a los parámetros productivos y el contenido de acidez del fruto, e incluso podría ser responsable de la aparición de podredumbre apical en las líneas De la pera en bajos insumos. Todo ello está en consonancia con los estudios previos del grupo de mejora EPSO-UMH, aunque las diferencias entre los genotipos en la presente publicación no son tan acentuadas. Tal y como apuntaban los autores de esos estudios, los efectos negativos probablemente estén relacionados con la presencia de genes silvestres ligados al gen de resistencia, los cuales no han podido ser eliminados mediante la técnica de retrocruzamiento durante el programa de mejora.

En general, también se observó un mejor comportamiento en los parámetros productivos de los híbridos respecto a las líneas homocigotas para *Ty-1*, en las condiciones convencional y salina. Algunos autores han propuesto el uso de este gen en heterocigosis para evitar los efectos negativos en homocigosis, lo cual podría explicar el mejor rendimiento de los híbridos en nuestro ensayo. Esto es especialmente claro en el caso del híbrido De la pera UMH 1203 x 21, el cual procede del cruce entre la línea UMH 1203 y la variedad tradicional De la pera P21, ambos muy parecidos a nivel genético excepto por los genes de resistencia presentes en la línea de mejora.

6

CONCLUSIONES



I. Contribución al programa de mejora genética de tomate EPSO-UMH

El registro de las nuevas líneas de mejora UMH De la pera y Cherry pera con resistencia a virus cumple con el propósito final del programa de mejora UMH, ofreciendo a los agricultores opciones de cultivo de variedades tradicionales para zonas de incidencia de virus.

El diseño y puesta a punto de los marcadores para la selección de los genes *Ty-1* (**C4**) y *ty-5* (**ty-5**), y su implementación en HRM junto a los marcadores de *Tm-2a* (**T4**) y *Sw-5* (**B3**), ha permitido mejorar sustancialmente el funcionamiento del programa de mejora UMH. Mediante unos protocolos sencillos y claros, podemos determinar con precisión el genotipo de resistencia a ToMV, TYLCV y TSWV en un gran número de plantas y en un corto espacio de tiempo. Además, se han creado mecanismos útiles para el desarrollo futuro de nuevos marcadores de HRM asociados a genes de resistencia o de otro tipo a partir de SNPs.

El programa de introducción del gen *ty-5* en líneas de mejora UMH se encuentra en su etapa final con la obtención de la generación BC₅. A falta de los últimos pasos, hemos conseguido la fijación de los genes de resistencia mediante los nuevos protocolos de HRM, y la recuperación de genoma recurrente es evidente en todas las líneas gracias al fenotipado realizado durante cada ciclo de retrocruzamiento.

II. Estudio del comportamiento de líneas de mejora e híbridos UMH con resistencias a virus en condiciones de agricultura de resiliencia


En condición de bajos insumos, todas las líneas e híbridos mostraron reducciones en el rendimiento, el número de frutos y la calidad. Sin embargo, el comportamiento de los tomates de tipo De la pera fue más estable que los cultivares de tipo Muchamiel. Es posible que el tipo varietal De la pera presente ventajas genéticas de adaptación a bajos niveles de fertilización, lo cual repercute directamente tanto en el agricultor como en el medioambiente.

En condición salina, se observó un aumento de la acidez y el contenido en sólidos solubles en prácticamente todos los cultivares, junto con ligeras reducciones en el rendimiento y el número de frutos. Sin embargo, parece necesaria la implementación de un mayor incremento de la conductividad en el agua de riego para conseguir una calidad superior, la cual sea capaz de aumentar significativamente el valor de estos tomates en el mercado.

La presencia del gen *Ty-1* en homocigosis se relacionó con reducciones en los niveles productivos y el contenido en acidez en todas las condiciones. Por otro lado, el mejor comportamiento agronómico del híbrido UMH 1203 x 21 con respecto al parental UMH 1203 valida el uso del gen *Ty-1* en heterocigosis para evitar sus efectos negativos en homocigosis.

7 PERSPECTIVAS DE FUTURO



	Proximal Fruit End Shape Fruit Shape Index	Distal Fruit End Shape Blockiness	Asymmetry Homogeneity
#	 Fruit Shape Index External I		
01	0.7760		
02	0.6288		
03	0.6285		
04	0.7291		

A continuación, se describen diferentes líneas de investigación y ensayos específicos que deben ser abordados para obtener información valiosa sobre el comportamiento a nivel genético, agronómico y de calidad del fruto de las líneas de mejora de tomate Muchamiel y De la pera:

- * Continuación del programa de introducción del *ty-5* mediante el retrocruzamiento del BC₅, o bien mediante la autofecundación del mismo si el parecido fenotípico con las líneas originales es el esperado. Posteriormente, se llevará a cabo la evaluación agronómica y de calidad de cada línea pura obtenida.
- * Tras la autofecundación de individuos BC₅ en el programa de introgresión del gen *ty-5* y la obtención de líneas homocigotas con distintas combinaciones para los genes *Ty-1* y *ty-5*, se llevará a cabo la evaluación de:
 - i. El efecto de la introducción del gen *ty-5* en caracteres agronómicos y de calidad.
 - ii. La resistencia de estas líneas a la incidencia de TYLCV.
- * Genotipado de las líneas élite del programa mediante el *array* SolCAP 8K para la selección de baterías de SNPs uniformemente distribuidos por el genoma, que permitan la selección rápida de retrocruces acelerando el proceso de mejora en el futuro.
- * Para seguir profundizando en el comportamiento de las líneas de mejora UMH en una agricultura de resiliencia, se plantea:
 - i. Evaluación agronómica y de calidad del fruto en condición de bajos insumos, con la aplicación de distintas tasas de fertilización.
 - ii. Evaluación del rendimiento y la calidad en condiciones de salinidad moderada-alta, con conductividad eléctrica del agua de riego superior a 6 dS/m.
 - iii. Búsqueda de los mecanismos genéticos que inciden sobre los caracteres productivos y de calidad en condiciones de bajos insumos y salinidad.
- * Es necesario seguir investigando los efectos de la introducción de genes de resistencia procedentes de especies silvestres de tomate en los caracteres productivos y de calidad de las líneas UMH. Para ello, se va a estudiar los datos de genotipado obtenidos a partir del chip 8K SolCAP y el resultado del análisis de los perfiles aromáticos del fruto en un ensayo realizado por el grupo de mejora con líneas de introgresión uchamiel y De la pera, las cuales presentan distintas combinaciones de genes de resistencia

8

REFERENCIAS



-A-

- Aguilera, J. G., Pessonni, L. A., Rodrigues, G. B., Elsayed, A. Y., Da Silva, D. J. H., & De Barros, E. G. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(2), 243-252. <https://doi.org/10.5039/agraria.v6i2a998>
- Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2010). Volatile compounds and changes in flavour-related enzymes during cold storage of high-intensity pulsed electric field and heat-processed tomato juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1597-1604. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3984>
- Alethea Tan. (2017, octubre 5). *5 Things to Know About Heirloom Tomatoes*. Guide Michelin online. <https://guide.michelin.com/sg/en/article/features/what-you-need-to-know-about-heirloom-tomatoes>
- Alonso, A. (1998). *Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "Muchamiel"*. Universidad Miguel Hernández, Orihuela.
- Alonso, A., García-Martínez, S., Arroyo, A., García-Gusano, M., Grau, A., Giménez-Ros, M., Romano, M. E., Valero, M., & Ruiz, J. (2008). Efecto de la introducción de resistencia a TYLCV (gen Ty-1) en caracteres productivos y de calidad en tomate. *Actas de Horticultura*, 51, 173-174.
- Alonso, A., García-Martínez, S., Grau, A., Carbonell, P., Rubio, F., & Ruiz, J. (2015). Genotipado mediante HRM: puesta a punto para su utilización en el programa de tomate de la EPSO-UMH. En M. Serrano & D. Valero (Eds.), *XIV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS HORTICOLAS* (pp. 521-524). SECH.
- Alonso, A., Vázquez-Araújo, L., García-Martínez, S., Ruiz, J. J., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2009). Volatile compounds of traditional and virus-resistant breeding lines of Muchamiel tomatoes. *European Food Research and Technology*, 230(2), 315-323. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1173-2>
- Alvarez, A. E., van de Wiel, C. C. M., Smulders, M. J. M., & Vosman, B. (2001). Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8), 1283-1292. <https://doi.org/10.1007/s001220100662>
- Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M., & Levin, I. (2009). Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(3), 519-530. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1060-z>
- Anbinselvam, A., Sidharthan, N., Vidyadharan, G., Kurian, J., & Biswas, L. (2020). Mutation profile of JAK2, EPOR and CALR genes in polycythemia patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*,

82, 102414. <https://doi.org/10.1016/j.bcnd.2020.102414>

- Andreakis, N., Giordano, I., Pentangelo, A., Fogliano, V., Graziani, G., Monti, L. M., & Rao, R. (2004). DNA fingerprinting and quality traits of Corbarino cherry-like tomato landraces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(11), 3366-3371. <https://doi.org/10.1021/jf049963y>
- Ayuntamiento de Mutxamel. (s. f.). *La Asociación de Productores y Comercializadores de tomate Muchamiel inicia su andadura*. Recuperado 21 de marzo de 2020, de <https://mutxamel.org/la-asociacion-de-productores-y-comercializadores-de-tomate-muchamiel-inicia-su-andadura/>
- Bai, J., Baldwin, E. A., Imahori, Y., Kostenyuk, I., Burns, J., & Brecht, J. K. (2011). Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *60*(2), 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.12.002>
- Baldassarre, V., Cabassi, G., Spadafora, N. D., Aprile, A., Müller, C. T., Rogers, H. J., & Ferrante, A. (2015). Wounding tomato fruit elicits ripening-stage specific changes in gene expression and production of volatile compounds. *Journal of Experimental Botany*, *66*(5), 1511-1526. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru516>

-B-

- Baldina, S., Picarella, M. E., Troise, A. D., Pucci, A., Ruggieri, V., Ferracane, R., Barone, A., Fogliano, V., & Mazzucato, A. (2016). Metabolite profiling of Italian tomato landraces with different fruit types. *Frontiers in Plant Science*, *7*(MAY2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00664>
- Baldwin, E. A., Goodner, K., & Plotto, A. (2008). Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00825.x>
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Shewmaker, C. K., & Schuch, W. (2000). Flavor trivia and tomato aroma: Biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, *35*(6), 1013-1022. <https://doi.org/10.21273/hortsci.35.6.1013>
- Baldwin, E., Plotto, A., Narciso, J., & Bai, J. (2011). Effect of 1-methylcyclopropene on tomato flavour components, shelf life and decay as influenced by harvest maturity and storage temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(6), 969-980. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4281>
- Baldwin, Elizabeth A., Scott, J. W., & Bai, J. (2015). Sensory and chemical flavor analyses of tomato genotypes grown in Florida during three different growing seasons in multiple years. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *140*(5), 490-503. <https://doi.org/10.21273/jashs.140.5.490>

- Barton, D. W., Butler, L., Jenkins, J. A., Rick, C. M., & Young, P. A. (1955). Rules for nomenclature in tomato genetics: Including a list of known genes. *Journal of Heredity*, *46*(1), 22-26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106504>
- Bauchet, G., Grenier, S., Samson, N., Segura, V., Kende, A., Beekwilder, J., Cankar, K., Gallois, J. L., Gricourt, J., Bonnet, J., Baxter, C., Grivet, L., & Causse, M. (2017). Identification of major loci and genomic regions controlling acid and volatile content in tomato fruit: implications for flavor improvement. *New Phytologist*, *215*(2), 624-641. <https://doi.org/10.1111/nph.14615>
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E., & Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>
- Bredemeijer, G., Cooke, R., Ganal, M., Peeters, R., Isaac, P., Noordijk, Y., Rendell, S., Jackson, J., Röder, M., Wendehake, K., Dijcks, M., Amelaine, M., Wickaert, V., Bertrand, L., & Vosman, B. (2002). Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, *105*(6), 1019-1026. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1038-6>
- Brouwer, D. J., & St. Clair, D. A. (2004). Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theoretical and Applied Genetics*, *108*(4), 628-638. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1469-8>
- Butler, L. (1936). Inherited characters in the tomato: li-jointless pedicel. *Journal of Heredity*, *27*(1), 25-26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a104134>

-C-

- Caballero, J. (s. f.). *Las 10 variedades de tomate más exquisitas*. Diario digital Expansión. Recuperado 20 de marzo de 2020, de <https://www.expansion.com/fueradeserie/gastro/album/2019/09/18/5d778bc7e5fdea453c8b45a9.html>
- Caballero, J. V. (2019, octubre 17). *Huerta de Carabaña, un apoteosis rústico con sabor a tomate*. Revista digital Sobremesa. <https://sobremesa.es/art/4312/huerta-de-carabana-un-apoteosis-rustico-con-sabor-a-tomate>
- Cañoles, M. A., Beaudry, R. M., Li, C., & Howe, G. (2006). Deficiency of linolenic acid in Lefad7 mutant tomato changes the volatile profile and sensory perception of disrupted leaf and fruit tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *131*(2), 284-289. <https://doi.org/10.21273/jashs.131.2.284>

- Capobianco-Uriarte, M., Aparicio, J., & De Pablo-Valenciano, J. (2017). Analysis of Spain's competitiveness in the European tomato market: An application of the Constant Market Share method. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(3). <https://doi.org/10.5424/sjar/2017153-10629>
- Carbonell-Barrachina, A. A., Agustí, A., & Ruiz, J. J. (2006). Analysis of flavor volatile compounds by dynamic headspace in traditional and hybrid cultivars of Spanish tomatoes. *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 536-542. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0131-x>
- Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J., García-Martínez, S., & Ruiz, J. (2018). Twenty Years of Tomato Breeding at EPSO-UMH: Transfer Resistance from Wild Types to Local Landraces— From the First Molecular Markers to Genotyping by Sequencing (GBS). *Diversity*, 10(1), 12. <https://doi.org/10.3390/d10010012>
- Carbonell, P., Salinas, J. F., Alonso, A., Grau, A., Cabrera, J. A., García-Martínez, S., & Ruiz-Martínez, J. J. (2020). Effect of low inputs and salinity on yield and quality – A 3 year study in virus-resistant tomato (*Solanum lycopersicum* L.) breeding lines and hybrids. *Scientia Horticulturae*, 260, 108889. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108889>
- Carelli, B. P., Gerald, L. T. S., Graziotin, F. G., & Echeverrigaray, S. (2006). Genetic Diversity Among Brazilian Cultivars and Landraces of Tomato *Lycopersicon Esculentum* Mill. Revealed by RAPD Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(2), 395-400. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-0578-9>
- Casals, J., Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Beltrán, J., Casañas, F., & Nuez, F. (2011). Long-term postharvest aroma evolution of tomatoes with the alcobaça (alc) mutation. *European Food Research and Technology*, 233(2), 331-342. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1517-6>
- Casals, J., Rull, A., Bernal, M., González, R., del Castillo, R. R., & Simó, J. (2018). Impact of grafting on sensory profile of tomato landraces in conventional and organic management systems. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 59(5), 597-606. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0086-z>
- Casañas, F., Simó, J., Casals, J., & Prohens, J. (2017). Toward an Evolved Concept of Landrace. *Frontiers in Plant Science*, 08(FEBRUARY), 145. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00145>
- Castagnola, J., Cano, H., Hulaniuk, M. L., Trinks, J., Corach, D., & Caputo, M. (2019). Inferring the genetic structure of Northwestern Argentina by uniparental SNP typing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 306-309. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.09.113>
- Causse, M., Giovannoni, J., Bouzayen, M., & Zouine, M. (2016). The tomato genome. En Mathilde Causse, J. Giovannoni, M. Bouzayen, & M. Zouine (Eds.), *The Tomato Genome*. Springer Berlin

- Heidelberg. <https://books.google.es/books?id=E9iSDQAAQBAJ>
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., & Nuez, F. (2013). Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces. *Scientia Horticulturae*, *162*, 150-164. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.044>
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., & Nuez, F. (2008). Influence of protected cultivation on accumulation of taste intensity components in traditional Spanish tomato varieties. *Acta Horticulturae*, *789*, 181-188. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.789.25>
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Valcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J., & Nuez, F. (2011). Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components of Spanish fresh tomato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2440-2450. <https://doi.org/10.1021/jf1045427>
- Cebolla-Cornejo, J., Soler, S., & Nuez, F. (2012). Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case Study. *International Journal of Plant Production*, *1*(2), 113-128. <https://doi.org/10.22069/ijpp.2012.531>
- Ceccarelli, S. (1996). Adaptation to low/high input cultivation. *Euphytica*, *92*(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1007/BF00022846>
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z., & Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant physiology*, *136*(1), 2641-2651. <https://doi.org/10.1104/pp.104.041608>
- Chen, Y., & Sidisky, L. M. (2011). Quantification of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-furanone in fruit samples using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1218*(38), 6817-6822. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.103>
- Cho, Y. Il, Ahn, Y. K., Tripathi, S., Kim, J. H., Lee, H. E., & Kim, D. S. (2015). Comparative analysis of disease-linked single nucleotide polymorphic markers from Brassica rapa for their applicability to Brassica oleracea. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120163>
- Consell Agrari Municipal de Valencia. (2018, noviembre 21). *Catàleg valencià de varietats autòctones agrícoles*. <https://valencia.consellagrari.com/es/primer-catalogo-valenciano-de-variedades-tradicionales-agrarias/>
- Corrado, G., Caramante, M., Piffanelli, P., & Rao, R. (2014). Genetic diversity in Italian tomato landraces: Implications for the development of a core collection. *Scientia Horticulturae*, *168*, 138-144. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.027>
- Cortés-Olmos, C., Leiva-Brondo, M., Adalid, A. M., Cebolla-Cornejo, J., & Nuez, F. (2011).

- Identification of organoleptic and functional quality profiles in Spanish traditional cultivars of tomato. *Acta Horticulturae*, 918, 501-508. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.918.62>
- Cortés-Olmos, C., Leiva-Brondo, M., Roselló, J., Raigón, M. D., & Cebolla-Cornejo, J. (2014). The role of traditional varieties of tomato as sources of functional compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(14), 2888-2904. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6629>
- Cortés-Olmos, C., Valcárcel, J. V., Roselló, J., Díez, M. J., & Cebolla-Cornejo, J. (2015). Traditional eastern Spanish varieties of tomato. *Scientia Agricola*, 72(5), 420-431. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0322>
- Cortés-Olmos, C., Vilanova, S., Pascual, L., Roselló, J., & Cebolla-Cornejo, J. (2015). SNP markers applied to the characterization of Spanish tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Scientia Horticulturae*, 194, 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.036>
- Cortina, P. R., Santiago, A. N., Sance, M. M., Peralta, I. E., Carrari, F., & Asis, R. (2018). Neuronal network analyses reveal novel associations between volatile organic compounds and sensory properties of tomato fruits. *Metabolomics*, 14(5), 57. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1355-7>
- CRF del INIA. (2019). *Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF)*. Banco de germoplasma del INIA. http://webx.inia.es/web_coleccionescrf/BancoCRF.asp

-D-

- D'Angelo, M., Zanol, M. I., Sance, M., Cortina, P. R., Boggio, S. B., Asprelli, P., Carrari, F., Santiago, A. N., Asís, R., Peralta, I. E., & Valle, E. M. (2018). Contrasting metabolic profiles of tasty Andean varieties of tomato fruit in comparison with commercial ones. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4128-4134. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8930>
- Dávila-Aviña, J. E. d. J., González-Aguilar, G. A., Ayala-Zavala, J. F., Sepúlveda, D. R., & Olivas, G. I. (2011). Compuestos volátiles responsables del sabor del tomate. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(2), 133-143.
- de la Serna, V. (2019, agosto 15). *El tomate vuelve a saber a tomate*. Diario El Mundo. <https://www.elmundo.es/papel/gastro/2019/08/15/5d54179efdddf79b38b45a7.html>
- de Oliveira, A. S., Boiteux, L. S., Kormelink, R., & Resende, R. O. (2018). The Sw-5 Gene Cluster: Tomato Breeding and Research Toward Orthospovirus Disease Control. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1055. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01055>
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Dinis, I., Simoes, O., & Moreira, J. (2011). Using sensory experiments to determine consumers'

willingness to pay for traditional apple varieties. *Spanish Journal of Agricultural Research*.
<https://doi.org/10.5424/sjar/20110902-133-10>

Domínguez, T., Hernández, M. L., Pennycooke, J. C., Jiménez, P., Martínez-Rivas, J. M., Sanz, C., Stockinger, E. J., Sánchez-Serrano, J. J., & Sanmartín, M. (2010). Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant Physiology*, *153*(2), 655-665. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154815>

Du, X., Song, M., Baldwin, E., & Rouseff, R. (2015). Identification of sulphur volatiles and GC-olfactometry aroma profiling in two fresh tomato cultivars. *Food Chemistry*, *171*, 306-314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.013>

-E-

El Comidista TV. (2017, agosto 16). *Aquí si hay tomate*. La Sexta TV. https://www.lasexta.com/programas/el-comidista-tv/reportajes/el-comidista-tv-se-adentra-en-el-desconocido-mundo-de-los-tomates_201708165994b13c0cf2e2ea35509b29.html

El Español. (2019, diciembre). Por qué los tomates de ahora volverán a saber como los de antes. *Periodico digital El Español*. https://www.elespanol.com/ciencia/nutricion/20191201/tomates-ahora-volveran-saber/448206101_0.html

Elbaz, M., Hanson, P., Fgaier, S., & Laarif, A. (2016). Evaluation of tomato entries with different combinations of resistance genes to tomato yellow leaf curl disease in Tunisia. *Plant Breeding*, *135*(4), 525-530. <https://doi.org/10.1111/pbr.12375>

-F-

FAO. (s. f.). *Global Partnership Initiative for Plant Breeding Capacity Building*. Recuperado 14 de abril de 2020, de <http://www.fao.org/in-action/plant-breeding/es/>

FAO. (2019). *Sistema de Regadío Histórico de l'Horta de València*. <http://www.fao.org/giahs/giahsaroundtheworld/designated-sites/europe-and-central-asia/sistema-de-regadio-historico-de-lhorta-de-valencia/es/>

FAO. (2020). *FAOSTAT*. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

Farneti, B., Alarcón, A. A., Cristescu, S. M., Costa, G., Harren, F. J. M., Holthuysen, N. T. E., & Woltering, E. J. (2013). Aroma volatile release kinetics of tomato genotypes measured by PTR-MS following artificial chewing. *Food Research International*, *54*(2), 1579-1588. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.015>

Farneti, B., Alarcón, A. A., Papatotiriou, F. G., Samudrala, D., Cristescu, S. M., Costa, G., Harren, F. J.

- M., & Woltering, E. J. (2015). Chilling-Induced Changes in Aroma Volatile Profiles in Tomato. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1442-1454. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1504-1>
- Figàs, M., Casanova, C., Pereira-Dias, L., Rosa, E., Calduch, M., Herrera, J., Prohens, J., & Soler, S. (2018). Mejora genética de tres variedades de tomate «De Penjar» valencianas para resistencia al virus del mosaico del tomate. *Actas de Horticultura*, 80, 131-134.
- Figàs, M. R., Martín, A., Casanova, C., Soler, E., Prohens, J., & Soler, S. (2017). Millora genètica de la Tomata «Valenciana d'El Perelló» per a resistència al virus del mosaic de la tomata (Tomato Mosaic Virus, ToMV). En S. Soler, M. R. Figàs, & J. Prohens (Eds.), *I Congrés de la Tomaca Valenciana: La Tomaca Valenciana d'El Perelló* (pp. 115-127). Universitat Politècnica de València.
- Figàs, M. R., Prohens, J., Raigón, M. D., Fernández-de-Córdova, P., Fita, A., & Soler, S. (2015). Characterization of a collection of local varieties of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using conventional descriptors and the high-throughput phenomics tool Tomato Analyzer. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(2), 189-204. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0142-1>
- Figueira, J., Câmara, H., Pereira, J., & Câmara, J. S. (2014). Evaluation of volatile metabolites as markers in *Lycopersicon esculentum* L. cultivars discrimination by multivariate analysis of headspace solid phase microextraction and mass spectrometry data. *Food Chemistry*, 145, 653-663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.061>
- Fogle, H. W., & Currence, T. M. (1950). Inheritance of fruit weight and earliness in a tomato cross. *Genetics*, 35(3), 363-380.
- Folkertsma, R. T., Spassova, M. I., Prins, M., Stevens, M. R., Hille, J., & Goldbach, R. W. (1999). Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the Sw-5 locus. *Molecular Breeding*, 5(2), 197-207. <https://doi.org/10.1023/A:1009650424891>
- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(2), 93-123. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616057>
- Fowler, C., & Mooney, P. R. (1990). *Shattering: food, politics, and the loss of genetic diversity* (2.^a ed.). University of Arizona Press.

-G-

- Gallais, A., & Coque, M. (2005). Genetic variation and selection for nitrogen use efficiency in maize: A synthesis. *Maydica*, 50(3), 531-547.
- Ganopoulos, I., Xanthopoulou, A., Konstantinou, S., Karaoglanidis, G. S., Tsaliki, E., Kalivas, A., &

- Madesis, P. (2016). Fast and Accurate Screening of *Solanum melongena* with High-Resolution Melting Analysis for Resistance to Fusarium Wilt. *International Journal of Vegetable Science*, 22(2), 183-189. <https://doi.org/10.1080/19315260.2014.995330>
- Gao, L., Gonda, I., Sun, H., Ma, Q., Bao, K., Tieman, D. M., Burzynski-Chang, E. A., Fish, T. L., Stromberg, K. A., Sacks, G. L., Thannhauser, T. W., Foolad, M. R., Diez, M. J., Blanca, J., Canizares, J., Xu, Y., van der Knaap, E., Huang, S., Klee, H. J., ... Fei, Z. (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature Genetics*, 51, 1044–1051. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0410-2>
- García-Cano, E., Resende, R. O., Boiteux, L. S., Giordano, L. B., Fernández-Muñoz, R., & Moriones, E. (2008). Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology*, 98(5). <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-5-0618>
- García-León, Á., Robledo-Torres, V., Mendoza-Villareal, R., Ramírez-Goodina, F., Valdez-Aguilar, L. A., Gordillo-Melgoza, F. A., García-León, Á., Robledo-Torres, V., Mendoza-Villareal, R., Ramírez-Goodina, F., Valdez-Aguilar, L. A., & Gordillo-Melgoza, F. A. (2018). Producción de variedades tradicionales de tomate con acolchado en invernadero. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 5(14), 303-308. <https://doi.org/10.19136/era.a5n14.1439>
- García-Martínez, S., Andreani, L., Garcia-Gusano, M., Geuna, F., & Ruiz, J. J. (2006). Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: Utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome*, 49(6), 648-656. <https://doi.org/10.1139/G06-016>
- García-Martínez, S., Corrado, G., Ruiz, J. J., & Rao, R. (2013). Diversity and structure of a sample of traditional Italian and Spanish tomato accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 789–798. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9876-9>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Carbonell, P., Salinas, J. F., Cabrera, J. A., & Ruiz-Martínez, J. J. (2020a). UMH1209 and UMH1155 : New ' Moruno Pera ' Tomato Breeding Lines Resistant to Virus. *HortScience*, 55(6), 959–960. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14711-20>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Carbonell, P., Salinas, J. F., Cabrera, J. A., & Ruiz-Martínez, J. J. (2020b). UMH1400 and UMH1401: New Cherry Tomato Breeding Lines Resistant to Virus. *HortScience*, 55(3), 395-396. <https://doi.org/10.21273/hortsci14710-19>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Carbonell, P., & Ruiz, J. J. (2015). UMH 916, UMH 972, UMH 1093, UMH 1127, AND UMH 1139: Four freshmarket breeding lines resistant to viruses within the muchamiel tomato type. *HortScience*, 50(6), 927-929. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.6.927>

- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Carbonell, P., & Ruiz, J. J. (2016). New Breeding Lines Resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus within the 'De la Pera' Tomato Type: UMH 1353 and UMH 1354. *HortScience*, *51*(4), 456-458. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.4.456>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., & Ruiz, J. J. (2011). UMH 1200, a breeding line within the Muchamiel tomato type resistant to three viruses. *HortScience*, *46*(7), 1054-1055. <https://doi.org/10.21273/hortsci.46.7.1054>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., & Ruiz, J. J. (2012). UMH 1203, a multiple virus-resistant fresh-market tomato breeding line for open-field conditions. *HortScience*, *47*(1), 124-125. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.1.124>
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., & Ruiz, J. J. (2014). UMH 1422 and UMH 1415: Two Fresh-market Tomato Breeding Lines Resistant to Tomato Mosaic Virus and Tomato Spotted Wilt Virus. *HortScience*, *49*(11), 1465-1466. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.11.1465>
- García-Martínez, S. (1998). *Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "De la pera"*. Universidad Miguel Hernández, Orihuela.
- García-Martínez, S. (2006). *Mejora genética de variedades tradicionales del sureste español*. Universidad Miguel Hernández, Orihuela.
- Gascuel, Q., Diretto, G., Monforte, A. J., Fortes, A. M., & Granell, A. (2017). Use of Natural Diversity and Biotechnology to Increase the Quality and Nutritional Content of Tomato and Grape. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00652>
- Ghizzoni, C. (2019). Chapter 6: Volatile Taste/Odour Active Compounds and Aroma Generation in Tomato Products. En *Food Chemistry, Function and Analysis* (Vols. 2019-January, Número 9, pp. 114-138). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788016247-00114>
- Gilbert, A. W. (1912). A Mendelian study of tomatoes. *Journal of Heredity*, *Os-7*(1), 169-188. <https://doi.org/10.1093/jhered/os-7.1.169>
- Gill, U., Scott, J. W., Shekasteband, R., Ogundiwin, E., Schuit, C., Francis, D. M., Sim, S.-C., Smith, H., & Hutton, S. F. (2019). Ty-6, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics*, *132*(5), 1543-1554. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03298-0>
- Ginart, S., Caputo, M., Corach, D., & Sala, A. (2019). Q1a3a native-American Y-haplogroup detection in DNA quantification step: A quick diagnosis for Y-chromosome database selection. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *7*(1), 315-317. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.119>

- Gómez, Á. (2020, enero 11). Alimentos: Encontrado el eslabón perdido de la evolución del tomate. *Periódico digital El Confidencial*. https://www.alimente.elconfidencial.com/consumo/2020-01-11/mejores-variedades-eslabon-perdido-tomate_2406320/
- Gonias, E. D., Ganopoulos, I., Mellidou, I., Bibi, A. C., Kalivas, A., Mylona, P. V., Osathanunkul, M., Tsaftaris, A., Madesis, P., & Doulis, A. G. (2019). Exploring genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm of genebank collection employing SSR and SCAR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(6), 1295-1309. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00786-6>
- González, F., Maya, V., Gil, A., López, M., & Vázquez, F. (2012). *Catálogo de especies conservadas en el centro de investigación La Orden-Valdesequera del gobierno de Extremadura*. <http://cicytex.juntaex.es/descargas/descargar.php?id=85>
- Gragera-Facundo, J., Gutiérrez-Perera, J. M., Gil-Torralvo, C. G., Ávila-Lozano, C., Cano-Suárez, J. M., & Esteban-Perdigón, A. (2011). Discriminatory morphologic and agronomic characters that identify Spanish tomato landraces. *Acta Horticulturae*, 918, 583-594. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.918.73>
- Granel, A., & Rambla, J. L. (2013). Biosynthesis of Volatile Compounds. En G. B. Seymour, M. Poole, J. J. Giovannoni, & G. A. Tucker (Eds.), *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening* (pp. 135-161). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118593714.ch6>
- Granier, M., Tomassoli, L., Manglli, A., Nannini, M., Peterschmitt, M., & Urbino, C. (2019). First Report of TYLCV-IS141, a Tomato Yellow Leaf Curl Virus Recombinant Infecting Tomato Plants Carrying the Ty-1 Resistance Gene in Sardinia (Italy) . *Plant Disease*, 103(6), 1437-1437. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-18-1558-pdn>
- Guerrero Lara, L., Pereira, L., Ravera, F., & Jiménez-Aceituno, A. (2019). Flipping the Tortilla: Social-Ecological Innovations and Traditional Ecological Knowledge for More Sustainable Agri-Food Systems in Spain. *Sustainability*, 11(5), 1222. <https://doi.org/10.3390/su11051222>

-H-

- Hamilton, J. P., & Robin Buell, C. (2012). Advances in plant genome sequencing. *The Plant Journal*, 70(1), 177-190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04894.x>
- Harlan, J. R. (1975). Our Vanishing Genetic Resources. *Science*, 188(4188), 617-621. <https://doi.org/10.1126/science.188.4188.617>
- Harlan, H. V., & Pope, M. N. (1922). The use and value of back-crosses in small-grain breeding. *Journal of Heredity*, 13(7), 319-322. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a102237>

- He, C., Poysa, V., & Yu, K. (2003). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, *106*(2), 363-373. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1076-0>
- Hernández, A. (2017, julio 7). *Ruta gastro: Tomates que (de verdad) saben a tomate... ¿a qué restaurantes «peregrinar» para degustarlos?* Revista digital Hola! Cocina. <https://www.hola.com/cocina/noticiaslibros/2017070796367/restaurantes-donde-probar-mejores-tomates-variedades/>
- Herrera, M. del R., Vidalon, L. J., Montenegro, J. D., Riccio, C., Guzman, F., Bartolini, I., & Ghislain, M. (2018). Molecular and genetic characterization of the Ryadg locus on chromosome XI from Andigena potatoes conferring extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical and Applied Genetics*, *131*(9), 1925-1938. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3123-5>
- Hogenboom, N. G. (1972). Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 1. The genus *Lycopersicon*, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. *Euphytica*, *21*(2), 221-227. <https://doi.org/10.1007/BF00036762>
- Hospital, F. (2005). Selection in backcross programmes. En *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 360, Número 1459, pp. 1503-1511). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1670>
- Howell, P., Leigh, F., Bates, R., Gosman, N., Trafford, K., Powell, W., Smith, A. M., & Greenland, A. (2014). Rapid marker-assisted development of advanced recombinant lines from barley starch mutants. *Molecular Breeding*, *33*(1), 243-248. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9930-0>
- Hu, M., Yang, D., Wu, X., Luo, M., & Xu, F. (2020). A novel high-resolution melting analysis-based method for *Salmonella* genotyping. *Journal of Microbiological Methods*, *172*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105806>
- Hu, X. T., Chen, D. Y., Niu, B. Y., Mou, S. T., Xin, X., Wu, Y. J., & Yang, Z. C. (2019). The suitable percentage of tomato straw compost in garden soil for improvement of tomato flavor. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, *25*(4), 611-619. <https://doi.org/10.11674/zwyf.18349>
- Hutton, S. F., & Scott, J. W. (2017). Fla. 7907C: A Fla. 7907 near-isogenic tomato inbred line containing the Begomovirus resistance gene, Ty-1. En *HortScience*. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11827-17>
- Hutton, S. F., Scott, J. W., & Schuster, D. J. (2012). Recessive resistance to tomato yellow leaf curl virus from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as Ty-5 on chromosome 4. *HortScience*, *47*(3), 324-327. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.3.324>
- Hutton, S. F., Scott, J. W., Shekasteband, R., Levin, I., & Lapidot, M. (2015). Combinations of Ty

resistance genes generally provide more effective control against begomoviruses than do single genes. *Acta Horticulturae*, 1069, 59-64. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1069.7>

-I-

Iglesias, M. J., García-López, J., Collados-Luján, J. F., López-Ortiz, F., Díaz, M., Toresano, F., & Camacho, F. (2015). Differential response to environmental and nutritional factors of high-quality tomato varieties. *Food Chemistry*, 176, 278-287. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.043>

Ilg, A., Bruno, M., Beyer, P., & Al-Babili, S. (2014). Tomato carotenoid cleavage dioxygenases 1A and 1B: Relaxed double bond specificity leads to a plenitude of dialdehydes, mono-apocarotenoids and isoprenoid volatiles. *FEBS Open Bio*, 4, 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.06.005>

IPGRI. (1996). *Descriptores para el tomate (Lycopersicon spp.)*. International Plant Genetic Resources Institute.

-J-

Jeyaprakash, S., Heffernan, J. E., Driscoll, R. H., & Frank, D. C. (2020). Impact of drying technologies on tomato flavor composition and sensory quality. *LWT*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108888>

Ji, Y., Scott, J. W., Schuster, D. J., & Maxwell, D. P. (2009). Molecular Mapping of Ty-4, a New Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3 of Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(2), 281-288. <https://doi.org/10.21273/jashs.134.2.281>

Jian, W., Cao, H., Yuan, S., Liu, Y., Lu, J., Lu, W., Li, N., Wang, J., Zou, J., Tang, N., Bouzayen, M., & Li, Z. (2019). SIMYB75, an MYB-type transcription factor, promotes anthocyanin accumulation and enhances volatile aroma production in tomato fruits. *Horticulture Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0098-y>

Jin, L., Zhao, L., Wang, Y., Zhou, R., Song, L., Xu, L., Cui, X., Li, R., Yu, W., & Zhao, T. (2019). Genetic diversity of 324 cultivated tomato germplasm resources using agronomic traits and InDel markers. *Euphytica*, 215(4), 69. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2391-8>

Jordá, C., & Alfaro, A. (1977). La "goma" del tomate. Su relación con el TMV. *Congreso Nacional Sociedad Española de Microbiología. Sección Fitopatología*.

Jordá, C., Martínez, M., Córdoba, M., Martínez, O., Juárez, M., & Font, I. (2003). El "cribado" o "torrao", ¿una nueva enfermedad del cultivo del tomate? *Phytoma España*, 152, 130-136.

Jordá, C., Pérez, A. L., Martínez-Culebras, P., Abad, P., Lacasa, A., & Guerrero, M. M. (2001). First Report of Pepino mosaic virus on Tomato in Spain. *Plant Disease*, 85(12), 1292-1292. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1292C>

Jordan, J. A. (2007). The heirloom tomato as cultural object: Investigating taste and space. *Sociologia Ruralis*, 47(1), 20-41. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9523.2007.00424.x>

-K-

Kiani, G., & Siahchereh, M. (2018). Genetic Diversity in Tomato Varieties Assessed by ISSR Markers. *International Journal of Vegetable Science*, 24(4), 353-360. <https://doi.org/10.1080/19315260.2017.1419397>

Kim, D. H., Jung, Y. J., Kim, J. H., Kim, H. K., Nam, K. H., Lee, H. J., Kim, M. K., Nou, I. S., & Kang, K. K. (2019). Development of male-sterile elite lines using marker-assisted backcrossing (MABC) in tomato. *Horticultural Science and Technology*, 37(6), 744-755. <https://doi.org/10.7235/HORT.20190074>

Kim, M., Park, Y., Lee, J., & Sim, S.-C. (2020). Development of molecular markers for Ty-2 and Ty-3 selection in tomato breeding. *Scientia Horticulturae*, 265, 109230. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109230>

Klee, H. J. (2010). Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytologist*, 187(1), 44-56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03281.x>

Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2013). Genetic challenges of flavor improvement in tomato. *Trends in Genetics*, 29(4), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.003>

Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2018). The genetics of fruit flavour preferences. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 347-356. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0002-5>

Klein, D., Gkisakis, V., Krumbein, A., Livieratos, I., & Köpke, U. (2010). Old and endangered tomato cultivars under organic greenhouse production: Effect of harvest time on flavour profile and consumer acceptance. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(11), 2250-2257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02398.x>

Kreissl, J., & Schieberle, P. (2017). Characterization of Aroma-Active Compounds in Italian Tomatoes with Emphasis on New Odorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(25), 5198-5208. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01108>

Krumbein, A., & Schwarz, D. (2013). Grafting: A possibility to enhance health-promoting and flavour compounds in tomato fruits of shaded plants? *Scientia Horticulturae*, 149, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.003>

Kumar, A., Tiwari, K. L., Datta, D., & Singh, M. (2014). Marker assisted gene pyramiding for enhanced

Tomato leaf curl virus disease resistance in tomato cultivars. *Biologia plantarum*, 58(4), 792-797. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0449-y>

-L-

- Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J., Sturre, M. J. G., De Haan, P., & Hille, J. (2003). Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*, 52, 1039–1051. <https://doi.org/10.1023/A:1025434519282>
- Lapidot, M., Karniel, U., Gelbart, D., Fogel, D., Evenor, D., Kutsher, Y., Makhbash, Z., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Reuveni, M., & Levin, I. (2015). A Novel Route Controlling Begomovirus Resistance by the Messenger RNA Surveillance Factor Pelota. *PLOS Genetics*, 11(10), e1005538. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005538>
- Lázaro, A., Cortes, I., Cabello, F., & de Lorenzo, C. (2014). *Catálogo de tomates tradicionales de la Comunidad de Madrid*. <http://www.mercasa.es>
- Lee, H. J., Kim, B., Bae, C., Kang, W. H., Kang, B. C., Yeom, I., & Oh, C. S. (2015). Development of a single-nucleotide polymorphism marker for the Sw-5b gene conferring disease resistance to Tomato spotted wilt virus in tomato. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 33(5), 730-736. <https://doi.org/10.7235/hort.2015.15025>
- Lee, J. H. J., Jayaprakasha, G. K., Avila, C. A., Crosby, K. M., & Patil, B. S. (2019). Metabolomic studies of volatiles from tomatoes grown in net-house and open-field conditions. *Food Chemistry*, 275, 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.091>
- Lee, J. H. J., Jayaprakasha, G. K., Rush, C. M., Crosby, K. M., & Patil, B. S. (2018). Production system influences volatile biomarkers in tomato. *Metabolomics*, 14(7). <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1385-1>
- Lewis, R. S., Linger, L. R., Wolff, M. F., & Wernsman, E. A. (2007). The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(2), 169-178. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0552-y>
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G. I., Bauer, P., Ling, H.-Q., Ganai, M. W., & Howe, G. A. (2003). The Tomato Suppressor of prosystemin-mediated responses2 Gene Encodes a Fatty Acid Desaturase Required for the Biosynthesis of Jasmonic Acid and the Production of a Systemic Wound Signal for Defense Gene Expression. *The Plant Cell*, 15(7), 1646-1661. <https://doi.org/10.1105/tpc.012237>
- Li, J., Fu, Y., Bao, X., Li, H., Zuo, J., Zhang, M., & Wang, J. (2020). Comparison and analysis of tomato flavor compounds using different extraction methods. *Journal of Food Measurement and*

- Characterization*, 14(1), 465-475. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00102-x>
- Li, Jian, Di, T., & Bai, J. (2019). Distribution of Volatile Compounds in Different Fruit Structures in Four Tomato Cultivars. *Molecules*, 24(14), 2594. <https://doi.org/10.3390/molecules24142594>
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., Zhang, Z., Lun, Y., Li, S., Wang, X., Huang, Z., Li, J., Zhang, C., Wang, T., Zhang, Y., Wang, A., Zhang, Y., Lin, K., Li, C., ... Huang, S. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, 46(11), 1220-1226. <https://doi.org/10.1038/ng.3117>
- Lin, Y. P., Liu, C. Y., & Chen, K. Y. (2019). Assessment of genetic differentiation and linkage disequilibrium in *Solanum pimpinellifolium* using genome-wide high-density SNP markers. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(5), 1497-1505. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200862>
- Liu, Z., Alseekh, S., Brotman, Y., Zheng, Y., Fei, Z., Tieman, D. M., Giovannoni, J. J., Fernie, A. R., & Klee, H. J. (2016). Identification of a *Solanum pennellii* Chromosome 4 Fruit Flavor and Nutritional Quality-Associated Metabolite QTL. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01671>
- López-Terrada, M. (2014). *The History of the Arrival of the Tomato in Europe: An Initial Overview*. <http://traditom.eu/project/history/>
- Lu, X., Cui, M., Yi, Q., & Kamrani, A. (2020). Detection of mutant genes with different types of biosensor methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 126, 115860. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115860>

-M-

- Mackay, J. F., Wright, C. D., & Bonfiglioli, R. G. (2008). A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: Application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods*, 4(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-8>
- Magán, J. J., Gallardo, M., Thompson, R. B., & Lorenzo, P. (2008). Effects of salinity on fruit yield and quality of tomato grown in soil-less culture in greenhouses in Mediterranean climatic conditions. *Agricultural Water Management*, 95(9), 1041-1055. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.03.011>
- Mageroy, M. H., Tieman, D. M., Floystad, A., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2012). A *Solanum lycopersicum* catechol-O-methyltransferase involved in synthesis of the flavor molecule guaiacol. *The Plant Journal*, 69(6), 1043-1051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04854.x>
- MAPA. (s. f.). *Estadísticas del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Recuperado 3 de abril de 2020, de <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas->

agrarias/agricultura/

- Martinez-Carrasco, L., Brugarolas, M., Martinez, A., Ros, M. del M., & Ruiz, J. J. (2014). Factores determinantes del precio de los tomates de variedades tradicionales: un analisis de precios hedonicos. *Economia Agraria y Recursos Naturales*, 14(2), 81-95. <https://doi.org/10.7201/earn.2014.02.04>
- Martínez-Saucedo, M., Ornelas-Fuentes, C., Dedden, M., Sánchez-Urbina, R., Díaz-García, H., Aquino-Jarquín, G., Moreno-Salgado, R., & Granados-Riveron, J. T. (2020). Implementation of high-resolution melting analysis of the porcupine (PORCN) gene for molecular diagnosis of focal dermal hypoplasia: Identification of a novel mutation. *Journal of Gene Medicine*, 22(5). <https://doi.org/10.1002/jgm.3165>
- Massaretto, I. L., Albaladejo, I., Purgatto, E., Flores, F. B., Plasencia, F., Egea-Fernández, J. M., Bolarin, M. C., & Egea, I. (2018). Recovering Tomato Landraces to Simultaneously Improve Fruit Yield and Nutritional Quality Against Salt Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1778. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01778>
- Matsui, K., Miyahara, C., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., & Kajiwara, T. (2000). Fatty Acid Hydroperoxide Lyase in Tomato Fruits: Cloning and Properties of a Recombinant Enzyme Expressed in Escherichia coli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(6), 1189-1196. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1189>
- Mazzucato, A., Ficcadenti, N., Caioni, M., Mosconi, P., Piccinini, E., Reddy, V. R., Sestili, S., & Ferrari, V. (2010). Genetic diversity and distinctiveness in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces: The Italian case study of «A pera Abruzzese». *Scientia Horticulturae*, 125(1), 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.02.021>
- Mejia, L., Teni, R. E., Vidavski, F., Czosnek, H., Lapidot, M., Nakhla, M. K., & Maxwell, D. P. (2005). Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Horticulturae*, 695, 251-256. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.27>
- Mercati, F., Longo, C., Poma, D., Araniti, F., Lupini, A., Mammano, M. M., Fiore, M. C., Abenavoli, M. R., & Sunseri, F. (2015). Genetic variation of an Italian long shelf-life tomato (*Solanum lycopersicon* L.) collection by using SSR and morphological fruit traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(5), 721-732. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0191-5>
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645-663. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x>
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>

-N-

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>

Nathan, A. J., & Scobell, A. (2012). How China sees America. *Foreign Affairs*, 91(5), 32-47.

-O-

Okutani, A., Inoue, S., & Morikawa, S. (2019). Comparative genomics and phylogenetic analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated from domestic animals in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, 71, 128-139. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.022>

Oladokun, J. O., Halabi, M. H., Barua, P., & Nath, P. D. (2019). Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathology*, 68(9), 1579-1586. <https://doi.org/10.1111/ppa.13096>

ONU. (2018). *Transformar la alimentación y la agricultura para alcanzar los ODS*. <http://www.fao.org/3/I9900ES/i9900es.PDF>

Ortiz-Serrano, P., & Gil, J. V. (2010). Quantitative comparison of free and bound volatiles of two commercial tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1106-1114. <https://doi.org/10.1021/jf903366r>

-P-

Padmanabhan, C., Ma, Q., Shekasteband, R., Stewart, K. S., Hutton, S. F., Scott, J. W., Fei, Z., & Ling, K. S. (2019). Comprehensive transcriptome analysis and functional characterization of PR-5 for its involvement in tomato Sw-7 resistance to tomato spotted wilt tospovirus. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44100-x>

Pano, J. L. (2019, agosto 20). *La campaña de tomate rosa de Barbastro espera llegar a los 2,3 millones de kilos, un 15% más*. Diario digital Heraldo. <https://www.heraldo.es/noticias/economia/2019/08/20/la-campana-de-tomate-rosa-de-barbastro-espera-llegar-a-los-2-3-millones-de-kilos-un-15-mas-1330449.html>

Panthee, D. R., Brown, A. F., Yousef, G. G., Ibrahim, R., & Anderson, C. (2013). Novel molecular marker associated with Tm2a gene conferring resistance to tomato mosaic virus in tomato.

- Plant Breeding*, 132(4), 413-416. <https://doi.org/10.1111/pbr.12076>
- Paolo, D., Bianchi, G., Morelli, C. F., Speranza, G., Campanelli, G., Kidmose, U., & Lo Scalzo, R. (2019). Impact of drying techniques, seasonal variation and organic growing on flavor compounds profiles in two Italian tomato varieties. *Food Chemistry*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125062>
- Pardo-García, A. I., Martínez-Gil, A. M., López-Córcoles, H., Zalacain, A., & Salinas, R. (2013). Effect of eugenol and guaiacol application on tomato aroma composition determined by headspace stir bar sorptive extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1147-1155. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5866>
- Patana-Anake, P., & Barringer, S. (2015). Effect of temperature, pH, and food additives on tomato product volatile levels. *International Food Research Journal*, 22(2), 561-571.
- Pavan, S., Schiavulli, A., Lotti, C., & Ricciardi, L. (2014). CAPS technology as a tool for the development of genic and functional markers: Study in peas. En Y. Shavrukov (Ed.), *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology*. Nova Publishers.
- Peláez, A. (2016, julio 25). *Los tomates con sabor recuperan su espacio en el campo malagueño*. Diario digital SUR. <https://www.diariosur.es/economia/agroalimentacion/201607/25/tomates-sabor-recuperan-espacio-20160724214723.html?ref=https:%2F%2Fwww.google.com%2F>
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2005). New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424-434. <https://doi.org/10.1600/0363644054223657>
- Pérez Mesa, J. C. (2009). Should Almería (Spain) have to be worried, thinking that their tomato export is currently affected by international competition? En K. Mattas & editor (Eds.), *Agricultural Economics Review* (Vol. 08, Número 2). <https://doi.org/10.22004/ag.econ.178229>
- Pete Wrapson. (2015, abril 23). *A guide to Italian tomatoes*. Around the world. <https://www.jamieoliver.com/features/a-guide-to-italian-tomatoes/>
- Picó, B., Díez, M. J., & Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus — a review. *Scientia Horticulturae*, 67(3-4), 151-196. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00945-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00945-4)
- Picó, B., Herraiz, J., Ruiz, J. J., & Nuez, F. (2002). Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*, 94(1-2), 73-89. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00376-4)
- Piombino, P., Sinesio, F., Moneta, E., Cammareri, M., Genovese, A., Lisanti, M. T., Mogno, M. R., Peparaió, M., Termolino, P., Moio, L., & Grandillo, S. (2013). Investigating physicochemical,

- volatile and sensory parameters playing a positive or a negative role on tomato liking. *Food Research International*, 50(1), 409-419. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.033>
- Ponce-Valadez, M., Escalona-Buendía, H. B., Villa-Hernández, J. M., de León-Sánchez, F. D., Rivera-Cabrera, F., Alia-Tejacal, I., & Pérez-Flores, L. J. (2016). Effect of refrigerated storage (12.5°C) on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit flavor: A biochemical and sensory analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.010>
- Prasanna, H. C., Sinha, D. P., Rai, G. K., Krishna, R., Kashyap, S. P., Singh, N. K., Singh, M., & Malathi, V. G. (2015). Pyramiding Ty-2 and Ty-3 genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. *Plant Pathology*, 64(2), 256-264. <https://doi.org/10.1111/ppa.12267>
- Pulido-Bosch, A., Rigol-Sanchez, J. P., Vallejos, A., Andreu, J. M., Ceron, J. C., Molina-Sanchez, L., & Sola, F. (2018). Impacts of agricultural irrigation on groundwater salinity. *Environmental Earth Sciences*, 77(5), 197. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7386-6>

-R-

- Raffo, A., Nicoli, S., Nardo, N., Baiamonte, I., Daloise, A., & Paoletti, F. (2012). Impact of different distribution scenarios and recommended storage conditions on flavor related quality attributes in ripening fresh tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10445-10455. <https://doi.org/10.1021/jf3028528>
- Rai, V. P., Singh, A. K., Jaiswal, H. K., Singh, S. P., Singh, R. P., & Waza, S. A. (2015). Evaluation of molecular markers linked to fragrance and genetic diversity in Indian aromatic rice. *Turkish Journal of Botany*, 39(2), 209-217. <https://doi.org/10.3906/bot-1405-117>
- Rambla, J. L., Alfaro, C., Medina, A., Zarzo, M., Primo, J., & Granell, A. (2015). Tomato fruit volatile profiles are highly dependent on sample processing and capturing methods. *Metabolomics*, 11(6), 1708-1720. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0824-5>
- Rambla, J. L., & Granell, A. (2020). Determination of Plant Volatile Apocarotenoids. En M. Rodríguez-Concepción & R. Welsch (Eds.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 2083, pp. 165-175). NLM (Medline). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9952-1_12
- Rambla, J. L., Medina, A., Fernández-Del-Carmen, A., Barrantes, W., Grandillo, S., Cammareri, M., López-Casado, G., Rodrigo, G., Alonso, A., García-Martínez, S., Primo, J., Ruiz, J. J., Fernández-Muñoz, R., Monforte, A. J., & Granell, A. (2017). Identification, introgression, and validation of fruit volatile QTLs from a red-fruited wild tomato species. *Journal of Experimental Botany*, 68(3), 429-442. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw455>

- Rambla, J. L., Tikunov, Y. M., Monforte, A. J., Bovy, A. G., & Granell, A. (2013). The expanded tomato fruit volatile landscape. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4613-4623. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru128>
- Randhawa, H. S., Mutti, J. S., Kidwell, K., Morris, C. F., Chen, X., & Gill, K. S. (2009). Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005752>
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. En *Pharmacogenomics* (Vol. 8, Número 6, pp. 597-608). Future Medicine Ltd London, UK . <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>
- Renard, C. M. G. C., Ginies, C., Gouble, B., Bureau, S., & Causse, M. (2013). Home conservation strategies for tomato (*Solanum lycopersicum*): Storage temperature vs. duration-Is there a compromise for better aroma preservation? *Food Chemistry*, 139(1-4), 825-836. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.038>
- Rick, C. M. (1974). Association of an allozyme with nematode resistance. *Tomato Genet. Coop. Rep*, 24, 25.
- Rick, C. M. (1986). Germplasm resources in the wild tomato species. *Acta Horticulturae*, 190, 39-48. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1986.190.2>
- Roselló, S., Díez, M. J., & Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The tomato spotted wilt virus - A review. *Scientia Horticulturae*, 67(3-4), 117-150. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00946-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00946-6)
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. En S. Misener & S. Krawetz (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 132. Humana Press.
- RTVE. (2017, enero 27). *Ciencia para recuperar el sabor del tomate*. <https://www.rtve.es/noticias/20170127/ciencia-para-recuperar-sabor-del-tomate/1481048.shtml>
- Rubio, F., Alonso, A., García-Martínez, S., & Ruiz, J. J. (2016). Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 198, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.025>
- Ruiz De Galarreta, J. I., Prohens, J., & Tierno, R. (2016). *Las variedades locales en la mejora genética de plantas*. <http://www.bibliotekak.euskadi.net/WebOpac>
- Ruiz, J., & García-Martínez, S. (2009). Tomato varieties «Muchamiel» and «De la pera» from the southeast of Spain: Genetic improvement to promote on-farm conservation. *Biodiversity Technical Bulletin*, 15, 171-176.

Ruiz, J. J., Valero, M., García-Martínez, S., Serrano, M., & Moral, R. (2006). Effect of recent genetic improvement on some analytical parameters of tomato fruit quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37(15-20), 2647-2658. <https://doi.org/10.1080/00103620600823109>

-S-

Sawaddipanich, V., & Chanthai, S. (2016). Headspace-single drop microextraction followed by gas chromatographic determination of key aroma compounds in tomato fruits and their sample products. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(3), 1271-1282. <https://doi.org/10.13005/ojc/320301>

Schouten, H. J., Tikunov, Y., Verkerke, W., Finkers, R., Bovy, A., Bai, Y., & Visser, R. G. F. (2019). Breeding Has Increased the Diversity of Cultivated Tomato in The Netherlands. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01606>

SCOPUS. (s. f.). SCOPUS. Recuperado 27 de marzo de 2020, de https://www.scopus.com/results/results.uri?numberOfFields=0&src=s&clickedLink=&edit=&editSaveSearch=&origin=searchbasic&authorTab=&affiliationTab=&advancedTab=&scint=1&menu=search&tablin=&searchterm1=%22tomato+quality%22&field1=TITLE_ABS_KEY&dateType=Publ

Scott, J. (2006). Breeding for Resistance to Viral Pathogens. En T. & F. 2005 (Ed.), *Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2* (pp. 457-485). Universidad de Wisconsin - Madison.

Selli, S., Kelebek, H., Ayseli, M. T., & Tokbas, H. (2014). Characterization of the most aroma-active compounds in cherry tomato by application of the aroma extract dilution analysis. *Food Chemistry*, 165, 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.147>

Shasidhar, Y., Variath, M. T., Vishwakarma, M. K., Manohar, S. S., Gangurde, S. S., Sriswathi, M., Sudini, H. K., Dobariya, K. L., Bera, S. K., Radhakrishnan, T., Pandey, M. K., Janila, P., & Varshney, R. K. (2020). Improvement of three popular Indian groundnut varieties for foliar disease resistance and high oleic acid using SSR markers and SNP array in marker-assisted backcrossing. *Crop Journal*, 8(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.07.001>

Shen, J., Tieman, D., Jones, J. B., Taylor, M. G., Schmelz, E., Huffaker, A., Bies, D., Chen, K., & Klee, H. J. (2014). A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 419-428. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert382>

Sim, S.-C., Durstewitz, G., Plieske, J., Wieseke, R., Ganai, M. W., Van Deynze, A., Hamilton, J. P., Buell, C. R., Causse, M., Wijeratne, S., & Francis, D. M. (2012). Development of a Large SNP

- Genotyping Array and Generation of High-Density Genetic Maps in Tomato. *PLoS ONE*, 7(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040563>
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldridge, M., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2004). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal*, 40(6), 882-892.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02263.x>
- Soler, S., Figàs, M. del R., & Prohens, J. (2017). *I Congrés de la tomaca valenciana: La tomaca valenciana d'El Perelló* (E. U. P. de València (ed.)). <http://hdl.handle.net/10251/81890>
- Solgenomics. (2019, septiembre). *Sol Genomics Network*.
https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome
- Solomon, A. M., Han, K., Lee, J. H., Lee, H. Y., Jang, S., & Kang, B. C. (2019). Genetic diversity and population structure of Ethiopian Capsicum germplasm. *PLoS ONE*, 14(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216886>
- Strano, T., Ruberto, G., Patanè, C., & La Rosa, S. (2011). Qualitative analysis of volatile compounds in local landraces of tomato cultivated in South Italy. *Acta Horticulturae*, 918, 517-523.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.918.64>
- Sztejn, K. (1962). Interspecific crosses in the genus *lycopersicum* - I. Backcrosses to *lycopersicum glandulosum*. *Euphytica*, 11(2), 149-156. <https://doi.org/10.1007/BF00033787>
- T-**
- Tandon, K. S., Baldwin, E. A., & Shewfelt, R. L. (2000). Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3), 261-268.
[https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00143-5)
- Tanksley, S. D., Bernachi, D., Beck-Bunn, T., Emmatty, D., Eshed, Y., Inai, S., Lopez, J., Petiard, V., Sayama, H., Uhlig, J., & Zamir, D. (1998). Yield and quality evaluations on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the Tm2a gene for resistance to the tobacco mosaic virus. *Euphytica*, 99, 77-83. <https://doi.org/10.1023/A:1018320232663>
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, G. B., Messeguer, R., Miller, J. C., Miller, L., Paterson, A. H., Riider, M. S., Wing, R. A., Wu, W., & Young, N. D. (1992). High Density Molecular Linkage Maps of the Tomato and Potato Genomes. *Genetics Society of America*, 132, 1141-1160.
- Termes Coll, B. (2019). *Mejora genética de cuatro variedades locales de tomate de Valencia y dos*

- de Cataluña para resistencia al Virus del Mosaico del Tomate (ToMV) y al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. [Universidad Politécnica de Valencia].
<https://riunet.upv.es:443/handle/10251/115478>
- Tieman, D., Bliss, P., McIntyre, L. M., Blandon-Ubeda, A., Bies, D., Odabasi, A. Z., Rodríguez, G. R., van der Knaap, E., Taylor, M. G., Goulet, C., Mageroy, M. H., Snyder, D. J., Colquhoun, T., Moskowitz, H., Clark, D. G., Sims, C., Bartoshuk, L., & Klee, H. J. (2012). The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences. *Current Biology*, 22(11), 1035-1039. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.016>
- Tieman, D. M., Zeigler, M., Schmelz, E. A., Taylor, M. G., Bliss, P., Kirst, M., & Klee, H. J. (2006). Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 887-896. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj074>
- Tieman, D., Taylor, M., Schauer, N., Fernie, A. R., Hanson, A. D., & Klee, H. J. (2006). Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8287-8292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602469103>
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F. R., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., Rambla, J. L., Beltran, K. S. O., Taylor, M., Zhang, B., Ikeda, H., Liu, Z., Fisher, J., Zemach, I., Monforte, A., Zamir, D., Granell, A., Kirst, M., Huang, S., & Klee, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391-394. <https://doi.org/10.1126/science.aal1556>
- Tikunov, Y. (2005). A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiology*, 139(3), 1125-1137. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068130>
- Tikunov, Y. M., Molthoff, J., de Vos, R. C. H., Beekwilder, J., van Houwelingen, A., van der Hooft, J. J. J., Nijenhuis-de Vries, M., Labrie, C. W., Verkerke, W., van de Geest, H., Zamora, M. V., Pesa, S., Rambla, J. L., Granell, A., Hall, R. D., & Bovy, A. G. (2013). Non-smoky GLYCOSYLTRANSFERASE1 prevents the release of smoky aroma from tomato fruit. *Plant Cell*, 25(8), 3067-3078. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114231>
- Tomata de penjar.* (s. f.). Recuperado 19 de marzo de 2020, de <https://tomatadepenjar.com/es/presentacion/>
- Tomate de Los Palacios.* (s. f.). Recuperado 8 de abril de 2020, de <https://www.tomatedelospalacios.org/nuestros-tomates/>
- Tomates de el Perelló.* (s. f.). Recuperado 19 de marzo de 2020, de <https://tomatesdelperello.com/#variedades>
- TRADITOM.* (s. f.). Recuperado 20 de marzo de 2020, de <http://traditom.eu/es/>

-V-

- Vance, C. P. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. *Plant Physiology*, 127(2), 390-397. <https://doi.org/10.1104/pp.127.2.390>
- Vela-Hinojosa, C., Escalona-Buendía, H. B., Mendoza-Espinoza, J. A., Díaz De León-Sánchez, F., Lobato-Ortíz, R., Rodríguez-Pérez, J. E., Ramírez-Aguilar, M., Pérez-Díaz, F., Villa-Hernández, J. M., & Pérez-Flores, L. (2018). Chemical and sensory analysis of native genotypes and experimental lines of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Fruits*, 73(1), 60-71. <https://doi.org/10.17660/th2018/73.1.7>
- Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., Edwards, J. D., & Bai, Y. (2013). The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genetics*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>
- Verlaan, M. G., Szinay, D., Hutton, S. F., de Jong, H., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., & Bai, Y. (2011). Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene Ty-1. *The Plant Journal*, 68(6), 1093-1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04762.x>
- Vicente, A. (2014, octubre 10). 'Rosa de Altea', rescatado el sabor del tomate auténtico. Periódico digital La Marina Plaza. <https://lamarinaplaza.com/2014/10/10/rosa-de-altea-rescatado-el-sabor-del-tomate-autentico/>
- Vidavski, F., Czosnek, H., Gazit, S., Levy, D., & Lapidot, M. (2008). Pyramiding of genes conferring resistance to Tomato yellow leaf curl virus from different wild tomato species. *Plant Breeding*, 127(6), 625-631. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01556.x>
- Vishwakarma, M. K., Arun, B., Mishra, V. K., Yadav, P. S., Kumar, H., & Joshi, A. K. (2016). Marker-assisted improvement of grain protein content and grain weight in Indian bread wheat. *Euphytica*, 208(2), 313-321. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1598-6>
- Vogel, J. T., Tieman, D. M., Sims, C. A., Odabasi, A. Z., Clark, D. G., & Klee, H. J. (2010). Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(13), 2233-2240. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4076>
- Vogel, K. E. (2009). Backcross breeding. *Methods in Molecular Biology*, 526, 161-169. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_14

-W-

- Wang, C. H., Li, W., Tian, Y. K., Hou, D. L., & Bai, M. D. (2016). Development of molecular markers for genetic and physical mapping of the PcDw locus in pear (*Pyrus communis* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *91*(3), 299-307. <https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1155319>
- Wang, D., & Seymour, G. B. (2017). Tomato Flavor: Lost and Found? *Molecular Plant*, *10*(6), 782-784. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.04.010>
- Wang, Li-bin, Bai, J., & Yu, Z. (2016). Difference in volatile profile between pericarp tissue and locular gel in tomato fruit. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(12), 2911-2920. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61324-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61324-7)
- Wang, Li-bin, Bai, J., & Yu, Z. (2017). Responses of volatile compounds in inner tissues on refrigeration in full ripe tomatoes. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(6). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13272>
- Wang, Li-bin, Baldwin, E. A., & Bai, J. (2016). Recent Advance in Aromatic Volatile Research in Tomato Fruit: The Metabolisms and Regulations. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(2), 203-216. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1638-1>
- Wang, Libin, Baldwin, E. A., Plotto, A., Luo, W., Raithore, S., Yu, Z., & Bai, J. (2015). Effect of methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment on the volatile profile in tomato fruit subjected to chilling temperature. *Postharvest Biology and Technology*, *108*, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.005>
- Wang, Li-bin, Qian, C., Bai, J., Luo, W., Jin, C., & Yu, Z. (2018). Difference in volatile composition between the pericarp tissue and inner tissue of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13387>
- Wang, T., Li, H. T., Zhu, H., Qi, S. Y., Zhang, Y. M., Zhang, Z. J., & Zou, Q. D. (2019). Comparative Analyses of Genetic Variation in a Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Germplasm Collection with Single Nucleotide Polymorphism and Insertion-Deletion Markers. *Russian Journal of Genetics*, *55*(2), 204-211. <https://doi.org/10.1134/S1022795419020182>
- Wang, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhou, R., Yu, W., & Zhao, T. (2018). Application of Whole Genome Resequencing in Mapping of a Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene. *Scientific Reports*, *8*(1), 9592. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27925-w>
- Wann, E. V., & Johnson, K. W. (1963). Intergeneric Hybridization Involving Species of *Solanum* and *Lycopersicon*. *Botanical Gazette*, *124*(6), 451-455. <https://doi.org/10.1086/336235>
- Wu, B., Zhong, G. Y., Yue, J. Q., Yang, R. T., Li, C., Li, Y. J., Zhong, Y., Wang, X., Jiang, B., Zeng, J. W.,

- Zhang, L., Yan, S. T., Bei, X. J., & Zhou, D. G. (2014). Identification of pummelo cultivars by using a panel of 25 selected SNPs and 12 DNA segments. *PLoS ONE*, *9*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094506>
- Wu, Q., Tao, X., Ai, X., Luo, Z., Mao, L., Ying, T., & Li, L. (2018). Effect of exogenous auxin on aroma volatiles of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology*, *146*, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.010>
- Y-**
- Yan, Z., Pérez-de-Castro, A., Díez, M. J., Hutton, S. F., Visser, R. G. F., Wolters, A.-M. A., Bai, Y., & Li, J. (2018). Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Tomato Germplasm. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01198>
- Yang, X., Caro, M., Hutton, S. F., Scott, J. W., Guo, Y., Wang, X., Rashid, M. H., Szinay, D., de Jong, H., Visser, R. G. F., Bai, Y., & Du, Y. (2014). Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene Ty-2 on chromosome 11 of tomato. *Molecular Breeding*, *34*, 749–760. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0072-9>
- Young, N. D., & Tanksley, S. D. (1989). RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, *77*(3), 353-359. <https://doi.org/10.1007/BF00305828>
- Z-**
- Zanor, M. I., Rambla, J.L., Chaïb, J., Steppa, A., Medina, A., Granell, A., Fernie, A. R., & Causse, M. (2009). Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *Journal of Experimental Botany*, *60*(7), 2139-2154. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp086>
- Zhang, B. C., Zhang, G. R., Ji, W., Yang, R. Bin, Zou, G. W., Chen, K. C., Wei, K. J., & Gardner, J. P. A. (2017). Development and characterization of 32 SNP markers for the northern snakehead (*Channa argus*) using high resolution melting (HRM). *Conservation Genetics Resources*, *9*(4), 631-634. <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0743-z>
- Zhang, J., Zhao, J., Xu, Y., Liang, J., Chang, P., Yan, F., Li, M., Liang, Y., & Zou, Z. (2015). Genome-Wide Association Mapping for Tomato Volatiles Positively Contributing to Tomato Flavor. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01042>
- Zhang, L. P., Khan, A., Niño-Liu, D., & Foolad, M. R. (2002). A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon*

-
- esculentum x *Lycopersicon hirsutum* cross. *Genome*, 45(1), 133-146.
<https://doi.org/10.1139/g01-124>
- Zhao, J., Sauvage, C., Zhao, J., Bitton, F., Bauchet, G., Liu, D., Huang, S., Tieman, D. M., Klee, H. J., & Causse, M. (2019). Meta-analysis of genome-wide association studies provides insights into genetic control of tomato flavor. *Nature Communications*, 10(1), 1534.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09462-w>
- Zhou, R., Wu, Z., Cao, X., & Jiang, F. L. (2015). Genetic diversity of cultivated and wild tomatoes revealed by morphological traits and SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 13868-13879. <https://doi.org/10.4238/2015.October.29.7>
- Zhu, G., Wang, S., Huang, Z., Zhang, S., Liao, Q., Zhang, C., Lin, T., Qin, M., Peng, M., Yang, C., Cao, X., Han, X., Wang, X., van der Knaap, E., Zhang, Z., Cui, X., Klee, H., Fernie, A. R., Luo, J., & Huang, S. (2018). Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding. *Cell*, 172(1-2), 249-261. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.019>
- Zhu, Y., Sims, C. A., Klee, H. J., & Sarnoski, P. J. (2018). Sensory and Flavor Characteristics of Tomato Juice from Garden Gem and Roma Tomatoes with Comparison to Commercial Tomato Juice. *Journal of Food Science*, 83(1), 153-161. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13980>
- Zou, J., Chen, J., Tang, N., Gao, Y., Hong, M., Wei, W., Cao, H., Jian, W., Li, N., Deng, W., & Li, Z. (2018). Transcriptome analysis of aroma volatile metabolism change in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit under different storage temperatures and 1-MCP treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 135, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.08.017>