



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE
ORIHUELA**

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

**Efecto de la introducción de genes de
resistencia a virosis en tomate sobre
caracteres agronómicos y de calidad
organoléptica de variedades localmente
adaptadas**

Tesis doctoral

Fernando Rubio López

2015



Efecto de la introducción de genes de resistencia a virosis en tomate sobre caracteres agronómicos y de calidad organoléptica de variedades localmente adaptadas

Tesis doctoral realizado por el Ingeniero Agrónomo Fernando Rubio López en el Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al grado de Doctor.

Orihuela, 1 de abril de 2015



JUAN JOSÉ RUIZ MARTÍNEZ, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández,
y **SANTIAGO GARCÍA MARTÍNEZ**, Profesor Contratado Doctor de la Universidad Miguel Hernández,

HACEN CONSTAR

que la presente tesis ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente el trabajo realizado por el Ingeniero Agrónomo Fernando Rubio López para optar al grado de Doctor.

Dr. Juan José Ruiz Martínez

Dr. Santiago García Martínez

Orihuela, 1 de abril de 2015



Dr. Ángel Antonio Carbonell Barrachina, Doctor en Química, Catedrático de Universidad y Coordinador del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (Retos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández Elche,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada '**Efecto de la introducción de genes de resistencia a virosis en tomate sobre caracteres agronómicos y de calidad organoléptica de variedades localmente adaptadas**' del que es autor el Ingeniero Agrónomo **Fernando Rubio López** ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Juan José Ruiz Martínez** y **Dr. Santiago García Martínez**, profesores de Universidad, los cuales considero conforme en cuanto a forma y contenido para que sea presentada para su correspondiente exposición pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a uno de abril del dos mil quince.

Fdo.: **Dr. Ángel Antonio Carbonell Barrachina**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan José Ruiz Martínez por ser mi director, guiarme en el desarrollo de la tesis y permitirme unirme a este fenomenal grupo de trabajo de Orihuela.

Al Dr. Santiago Martínez por su gran labor de asesoramiento en la etapa inicial de mi trabajo fin de carrera, permitiéndome también llegar con éxito a la etapa final de mi doctorado.

A mis compañeros de laboratorio por hacerme más llevadera esta dura pero emocionante etapa de doctorado, especialmente a Arantxa, Adrián, Pedro,...

Así como los técnicos de laboratorio José María Sánchez, Carmen Ballester, José Joaquín García y Javier Vives que me han permitido desarrollar mi actividad práctica diaria con mayor valor científico añadido.

A los antiguos alumnos, ahora ya Sr.Ingenieros, Cristina, Faby, Borja, María, candela, Oscar, Eva y Antonio por su amistad y permitir una actividad amena, competente e inolvidable en los ensayos con los tomates.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN), por los proyectos de referencia AGL2008-03822, AGL2011-26957 y IT2009-0005 con los que ha apoyado las investigaciones conducentes a esta Tesis Doctoral y mi estancia en la Facultad Agraria de Nápoles (Italia).

Al la Dra. Rosa Rao y Dr. Giandomenico Corrado por permitirme formar parte de su grupo en Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II durante mi estancia breve de doctorado en Italia.

A mis padres, hermano/as, Juan, Ade y Ana, que siempre han estado presentes en los buenos y malos momentos depositando toda su confianza en mí, y en especial mi mujer Juana.



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE
ORIHUELA**

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

**Efecto de la introducción de genes de
resistencia a virosis en tomate sobre
caracteres agronómicos y de calidad
organoléptica de variedades localmente
adaptadas**

Tesis doctoral

Fernando Rubio López

2015



Efecto de la introducción de genes de resistencia a virosis en tomate sobre caracteres agronómicos y de calidad organoléptica de variedades localmente adaptadas.

ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	3
PRÓLOGO.....	7
1.- INTRODUCCIÓN.....	12
1.1.- Importancia económica del tomate.....	12
1.2.- Variedades tradicionales de tomate.....	13
1.2.1.- Origen, tipos y problemática.....	14
1.2.2.- Necesidad de introducir resistencias genéticas.....	16
1.2.3.- Estudio de la variabilidad en las variedades tradicionales.....	18
1.3.- Programa de mejora.....	20
1.3.1.- Caracterización agronómica de las variedades tradicionales.....	23
1.3.2.- Realización de cruzamientos.....	23
1.3.3.- Realización de retrocruces.....	24
1.3.4.- Selección asistida por marcadores.....	24
1.3.5.- Líneas enviadas al registro.....	26
1.3.6.- Próximos envíos.....	28
1.4.- Efecto de la introducción de genes de especies silvestres relacionadas	28
1.4.1.- Ejemplos en tomate.....	28
1.4.2.- Ejemplos en otros cultivos.....	29
2.- OBJETIVOS.....	30
3.- PUBLICACIONES.....	31
3.1.- Bajo revisión	
3.1.1.- Rubio <i>et al.</i> (2015).Journal of the Science of Food and Agriculture.	31
3.2.-Publicados	
3.2.1.- García-Martínez <i>et al.</i> (2011). Hortscience.....	54
3.2.2.- García-Martínez <i>et al.</i> (2012). Hortscience.....	57
3.2.3.- García-Martínez <i>et al.</i> (2014).Hortscience.....	60



3.2.4.-García-Martínez <i>et al.</i> (2011). Journal of the Science of Food and Agriculture.....	63
3.3.-Títulos de obtención vegetal	
3.3.1.-Variedad de tomate UMH1200. Número registro: 20114962.....	72
3.3.2.-Variedad de tomate UMH1203. Número registro: 20114963.....	74
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78
6.- CONCLUSIONES.....	82
7.- BIBLOGRAFÍA.....	86



Según lo establecido en la norma de doctorado de la Universidad Miguel Hernández para la defensa de una tesis doctoral con mención internacional es necesario: "Que parte de la tesis doctoral, al menos el resumen y las conclusiones, se haya redactado y sea presentado en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en su campo de conocimiento, distinta a cualquier de las lenguas oficiales en España." En este caso se ha escogido la lengua inglesa.

SUMMARY

The UMH research group "Agricultural Biodiversity and Breeding Varieties" started in 1998 at Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), a breeding program for the simultaneous introduction of three dominant genes that confer resistance to three of the most relevant viruses in south-eastern Spain. These viruses are *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Procedures for the inclusion of two tomato breeding lines, "Muchamiel" (UMH1200) and "De la Pera" (UMH1203), in the Spanish Protected and Commercial Variety Register were initiated in 2011. Plant variety right titles for both breeding lines with the three resistance genes were obtained in July 2013. Last year procedures for inclusion of another ten breeding lines, with different genotypes, were initiated, which are expected to be finalized during 2015 and 2016. We have obtained other tomato breeding lines with all the homozygote combinations for the three resistance genes, which can be considered quasi-isogenic lines of the traditional varieties. We have used this set of breeding lines in order to analyze the effect of the respective introgressions. Tomato seeds from both varieties were obtained during the first year (2009/2010) in order to perform genetic evaluations. By selfing these breeding lines, we obtained all the homozygote combinations for the three resistance genes. The genotype of each line was confirmed using molecular markers linked to the resistant genes, routinely used in the breeding program. During 4 years, agronomic and quality parameters were studied in the set of lines corresponding to "Muchamiel" and "De la pera" through eight essays carried out under different agricultural production and different locations. In all experiments, some parameters were negatively affected by the chromosome segment containing the *Ty-1* gene. Data from all the experiments were jointly analyzed using multivariate analysis methods. ToMV resistance gene effect was significant for the 5 'De la Pera' and 'Muchamiel' trials, except for number of fruits. TSWV gene effect was also significant, except for number of inflorescences per plant, total yield and commercial yield. Finally, TYLCV resistance gene had an important and significant effect, except for SSC, as previously reported in other studies carried out by



our group. In all cases, using individual analysis, grouping by varietal type or analyzing all the trials jointly, the fragment that contained the *Ty-1* gene showed a greater effect. We used near-infrared spectroscopy technology (NIRS) in order to estimate the more important mineral contents of our breeding lines at the end of the breeding program. Our results suggested that NIRS could also be used in the selection of lines during a breeding program, an issue that we will try to address in our future breeding work. However, the estimations of soluble solids (SSC) and acidity (TA) obtained using dry samples of tomato may be useful only for screening purposes. More research must be done on NIRS analysis using fresh samples and intact tomatoes, in order to improve the estimation of SSC and TA.

The obtained breeding lines could be grown under ToMV, TYLCV and TSWV virus infection conditions. It would be almost impossible to cultivate these traditional varieties without these resistances. However, the negative effects of the introduced genes observed in some agricultural conditions, such as slight decreases in yield and some organoleptic characteristics, suggest that further breeding work is needed. In addition, we are currently selecting new breeding lines from other varieties like “Cherry” or “De la pera moruno” and we also are developing hybrids between breeding lines and traditional cultivars from diverse origins.



RESUMEN

El grupo de investigación de la UMH “Biodiversidad Agrícola y Mejora Genética de Variedades” empezó en 1998 en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) un programa de mejora para la introducción de genes de resistencia a tres de las virosis más importantes que afectan al cultivo del tomate en el sureste español. Estas virosis 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). En 2011 se iniciaron los trámites para la inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas de dos líneas de mejora de tomate de los tipos “Muchamiel” (UMH1200) y “De la Pera” (UMH1203), ambas tienen genes de resistencia en homocigotas a los tres virus comentados anteriormente. Los títulos de obtención vegetal fueron concedidos dos años después, en julio de 2013. Durante los años 2013 y 2014 se enviaron diez líneas más derivadas del programa de mejora, con distintos genotipos, las cuales se prevé que serán inscritas en ambos registros durante 2015 y 2016.

A partir de los materiales desarrollados con resistencia a las tres virosis, hemos obtenido líneas de mejora que tienen todas las combinaciones posibles de los tres genes de resistencia en homocigosis, las cuales pueden considerarse líneas cuasi-isogénicas de las respectivas variedades tradicionales. Este conjunto de líneas ha posibilitado el análisis detallado de los efectos de las respectivas introgresiones. Durante el primer año (2009/2010) se obtuvieron las semillas necesarias para disponer de todos los genotipos necesarios para llevar a cabo el análisis genético en las variedades de tomate “De la Pera” y “Muchamiel”. Se consiguió disponer de todos los estados, homocigoto sensible y resistente, para cada uno de los genes de resistencia introducidos, empleando para ello los marcadores moleculares para cada gen de resistencia seleccionados en proyectos de investigación anteriores. Se llevó a cabo durante 4 años la evaluación agronómica y de algunos parámetros relacionados con la calidad organoléptica del tomate en las líneas de “Muchamiel” y “De la pera” realizando ocho ensayos bajo diferentes sistemas de producción agraria y en distintas localidades. En todos ellos se vio que la introducción del segmento cromosómico que contiene la región de los genes de resistencia a virosis, sobre todo el que contiene a *Ty-1*, fue desfavorable para algunos caracteres agronómicos y de calidad. La información procedente de todos los experimentos fue analizada conjuntamente utilizando métodos de análisis multivariante. El efecto del gen de resistencia en ToMV fue significativo para los 5 ensayos “De la pera” y “Muchamiel”, excepto para el número de frutos. También tuvo efecto significativo para el gen TSWV, excepto para



parámetros como número de inflorescencias por planta, producción total y producción comercial. Para el gen de resistencia TYLCV se observó un efecto importante y muy significativo, excepto para el contenido en sólidos solubles, como se ha observado previamente en otros trabajos realizados por el grupo. En todos los casos, tanto en los ensayos individuales como agrupando por tipo varietal o realizando los análisis en conjunto, el fragmento introgresado que tuvo un mayor efecto fue el que contiene el gen de resistencia *Ty-1*, que confiere resistencia a TYLCV.

Una vez obtenidas las líneas de mejora al final del ciclo del programa, para estimar el contenido de los principales elementos minerales presentes en el fruto, hemos utilizado la tecnología de espectroscopia en el infrarrojo cercano (en inglés NIRS). Nuestros resultados sugieren que la técnica NIRS también podría ser utilizada en la selección de líneas durante un programa de mejora, un objetivo que se intentará abordar en nuestro trabajo futuro de mejora. Sin embargo, la estimación de los sólidos solubles y de la acidez, obtenida a partir de muestras secas de tomate, puede ser útil sólo para llevar a cabo un cribado o selección preliminar. Sería interesante continuar el análisis NIRS usando muestras frescas y tomates intactos, con el fin de mejorar las estimaciones.

Las nuevas líneas obtenidas pueden cultivarse en presencia del virus del ToMV, TSWV y TYLCV, en condiciones en las que sería casi imposible cultivar las variedades tradicionales originales. Sin embargo, los efectos negativos de los genes introducidos y/o de la carga de ligamiento, que se observan en algunas condiciones de cultivo implican que el programa de mejora debe seguir en marcha. Actualmente se están desarrollando además nuevas líneas de mejora de otros tipos varietales, como "Cherry" o "De la pera moruno", y también se están desarrollando híbridos entre líneas de mejora y variedades tradicionales de diverso origen.



PRÓLOGO

Este documento se ha elaborado siguiendo la normativa de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la “Presentación de Tesis Doctorales como un conjunto de publicaciones”, y se ha dividido en las siguientes partes:

1.- Una *Introducción*, en la que se presenta el tema de la tesis y los antecedentes del trabajo realizado.

2.- Un apartado de *Objetivos*.

3.- Un apartado de *Publicaciones*, que incluye los artículos publicados y el manuscrito pendiente de aceptación en el momento de depósito de la tesis, recogiendo únicamente los publicados o enviados a revistas recogidas en el SCI:

3.1.- Bajo revisión

Efecto de la introducción de resistencia genética a virosis

3.1.1.-**Rubio, F.**, García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., Valero, M., Ruiz, J.J. (enviado). Introgression of virus-resistance genes into traditional tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.): effects on yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

3.2.-Publicados

Líneas del programa de mejora enviadas al registro

3.2.1.-García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, 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.

3.2.2.-García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, 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.

3.2.3.-García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, 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):1-2.

Análisis de la variabilidad del material vegetal

3.2.4.-García-Martínez, S., Nazario, L., Alonso, A., Agulló, E., **Rubio, F.**, Moral, R., Ruiz, J.J. (2011). Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: quick estimation by near-infrared reflectance (NIRS). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **92**(6),1178-1185.



3.3.-Títulos de obtención vegetal

Registro de las variedades vegetales

3.3.1.-Variedad de tomate UMH1200. Número título: 2618. Número registro:
20114962

3.3.2.-Variedad de tomate UMH1203. Número título: 2619. Número registro:
20114963

4.- Un apartado de *Material y Métodos*. Aunque en las publicaciones se detalle el material y métodos, ampliamos en este apartado para una mejor comprensión de los experimentos.

5.- Un apartado de *Resultados y Discusión*.

6.- Un apartado de *Conclusiones*.

7.- Finalmente un apartado de *Bibliografía* en el que se reseñan todas las referencias que aparecen citadas en el texto, aunque también lo estén en los artículos.

Durante el desarrollo de esta Tesis hemos colaborado con los grupos e investigadores siguientes:

-Grupo de Investigación Aplicada en Agroquímica y Medio Ambiente, especialmente a Raúl Moral, Luis Nazario y Enrique Agulló.

-Grupo Calidad y Seguridad Alimentaria, especialmente a Ángel Antonio Carbonell.

-Grupo de Post-Recolección de Frutas y Hortalizas, especialmente a María Serrano, Domingo Martínez, Daniel Valero, Pedro J. Zapata.

-Grupo de Economía, política y Desarrollo Agroambiental y del Medio Rural, especialmente a Margarita Brugarolas, África Poveda y Laura Martínez.

-Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, especialmente a Miguel Juárez

-A Rosa Rao y Giandomenico Corrado, Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Biotecnologie Vegetali.

-Técnicos de laboratorio José María Sánchez, Carmen Ballester, José Joaquín García y Javier Vives.



La Mejora Genética Vegetal es una ciencia que engloba y necesita a un elevado número de campos del conocimiento, o disciplinas distintas, como la botánica, genética, citología, fisiología vegetal, agronomía, edafología, patología vegetal, entomología, etc. Desde el punto de vista del mejorador es imposible que sea un experto en todos y cada uno de estos campos, por lo que los programas de mejora deben ser llevados a cabo por equipos multidisciplinares. La colaboración con los grupos citados anteriormente nos ha permitido estudiar una serie de parámetros funcionales (licopenos y carotenos,...), componentes volátiles, contenido en minerales (macroelementos y microelementos), de calidad (azúcares y ácidos), caracteres agronómicos (producción, peso medio,...), expresión génica, patológicos, análisis sensorial, valoración o aceptación por parte del consumidor que hubiera sido imposible llevar a cabo sin dicha colaboración.

Otra parte del trabajo realizado durante el transcurso de estos años ha sido la divulgación, intentar dar a conocer nuestros resultados a un público lo más amplio posible. En el caso de la Mejora en general, y de las variedades tradicionales en particular, es importante que el proyecto que se está realizando sea conocido, especialmente en la zona de influencia de estas variedades. Por nuestra parte, este objetivo se ha intentado asistiendo a un buen número de congresos, tanto nacionales como internacionales, de ciencias hortícolas, agroalimentarias, y de mejora genética, así como enviando los resultados del trabajo realizado a revistas de divulgación nacionales e internacionales.

Para que este trabajo quede reflejado, aparecen a continuación cronológicamente las referencias de los artículos de divulgación y las comunicaciones a congresos:

Scarano,D., **Rubio, F.**, Ruiz, J.J., Rao, R., Corrado, G. (2014). Morphological and genetic diversity among and within common bean(*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the Campania region(Southern Italy). *Scienza horticultrae*: **180**: 72-78.

Barrantes, W., Fernández-del-Carmen, A., Lopez-Casado, G., García-Martínez, S., Alonso, A., **Rubio, F.**, Ruiz, J.J., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., Monforte, A. (2014). A new genomic library of introgression lines from *Solanum pimpinellifolium*. QualityFruit, 3rd Annual Conference of the COST ACTION FA1106, Greece.

Rubio, F., García-Martínez, S., Alonso A., Corrado, G., Rao, R., Coppola, V., Ruiz, J.J. (2013). Expresión cuantitativa de genes relacionados con la ruta biosintética de carotenoides en líneas de mejora de tomate resistente a virosis. VII Congreso Ibérico de agroingeniería y ciencias hortícolas.Póster Madrid.



García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., **Rubio, F.**, Valero, M. (2013). Líneas de tomate "De la Pera" obtenidas en la Universidad Miguel Hernández resistentes a diversas virosis. VII Congreso Ibérico de agroingeniería y ciencias hortícolas. Póster Madrid.

García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., **Rubio, F.**, Valero, M. (2013). Nuevas líneas de mejora de tomate Muchamiel resistentes a virus del programa de mejora genética de la EPSO-UMH. VII Congreso Ibérico de agroingeniería y ciencias hortícolas. Póster Madrid.

Alonso A., García-Martínez, S., Grau, A., **Rubio, F.**, Carbonell, P., Chacón, B., Ruiz, J.J. (2012). Interés agronómico de híbridos de tomate obtenidos cruzando líneas resistentes de la UMH y variedades locales de distintos orígenes. Horticultura 304:28-Interempresas.

Rubio, F., García-Martínez, S., Alonso, A., Chacón, B., A. Grau, A., Valero, M., Ruiz, J.J. (2012). Desarrollo de variedades resistentes de tomate 'De la Pera': Efecto de la introducción de genes de resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV. Horticultura 302:58-Interempresas.

Rubio, F., García-Martínez, S., Alonso, A., Chacón, B., Grau, A., Valero, M., Ruiz, J.J. (2012). Introducción de genes de resistencia a virosis en variedades de tomate tradicional 'De la Pera' y sus efectos sobre caracteres agronómicos.. XIII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Almería. Acta de Horticultura 60:9.

García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., **Rubio, F.**, Valero, M., Ruiz, J.J. (2011). Simultaneous introgression of three resistance genes into tomato landraces using marker-assisted selection: results of a breeding program. Plant GEM Istanbul. Abstract book.

Rubio, F., García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., Valero, M., Ruiz, J.J. (2010). Introgressing resistance genes into traditional tomato varieties: effects on yield and quality. Lisboa. Acta de Horticultura 935:29-33..

Durante la realización de la tesis he codirigido varios trabajos fin de carrera siguiendo uno de los principales objetivos de mi proyecto el cual es: "Estudiar el efecto de las regiones cromosómicas que contienen los genes *Sw-5* (confiere resistencia a TSWV), *Ty-1* (confiere tolerancia a TYLCV) y *Tm-2a* (confiere resistencia a ToMV) sobre caracteres agronómicos y de calidad, en líneas de mejora de tomate en diferentes localidades", los cuales aparecen a continuación:

Coves, C. (2010). Puesta a punto de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a virosis y caracterización agronómica en líneas de mejora de tomate "De la Pera". Trabajo final de carrera. Universidad Miguel Hernández.



Ruiz, F. (2011) Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate “De la Pera”. Trabajo Final de Carrera. UMH.

Chacón, B. (2011). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora del tomate “De la Pera” cultivadas bajo malla. Trabajo Final de Carrera. UMH.

Teruel, C. (2012). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate “Muchamiel”, injertadas sobre el patrón Beaufort y cultivadas al aire libre. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.

Jover, M. (2012). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate “Muchamiel”, cultivadas al aire libre durante el ciclo primavera-verano 2011. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.

Almarcha, O. (2012). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en línea de mejora de tomate "Muchamiel" (*S. lycopersicum*) cultivadas en invernadero. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.

Rosa, A. (2013). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate “De la Pera” cultivadas bajo malla. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.

Sánchez, E. (2013). Efecto sobre algunas propiedades funcionales de la introducción de genes de resistencia a virosis en líneas de mejora de tomate “Muchamiel”. *Solanum lycopersicum* L. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.

Por otra parte, merece mención mi Trabajo final del máster de Agroecología desarrollo rural y agroturismo, cuyo objetivo fue realizar una evaluación de calidad sensorial (flavor, textura, apariencia y aroma), de dos líneas de tomate “Muchamiel” mejorados y uno tradicional (como referencia), cultivadas todas ellas en condiciones ecológicas. Para ello se realizó una serie de catas con consumidores no entrenados.

Rubio, F. (2011). Análisis sensorial de tomates Muchamiel en cultivo ecológico. Trabajo Final de Máster Agroecología desarrollo rural y agroturismo. Universidad Miguel Hernández.

1. INTRODUCCIÓN



1.- INTRODUCCIÓN

El tomate pertenece a la familia de las Solanáceas, siendo conocido por *Solanum lycopersicum* (Peralta *et al.*, 2008) tal y como fue denominado originalmente por Linneo en 1753. El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las verduras más consumidas por el hombre. Se puede consumir en fresco, como parte de ensaladas, también como producto elaborado (pelado en conserva, troceado, triturado, en zumo, desecado, en confitura). El tomate aparece como ingrediente en muy diversos platos y alimentos precocinados.

Se trata de una especie originaria de la región andina, que comprende hoy día parte de Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú (Sims, 1980). Recientemente, Blanca *et al.* (2012) indican que hubo un proceso de pre domesticación que ocurrió en la región andina, que se completo en Mesoamérica antes de la llegada de los españoles.

Con el descubrimiento de América, el tomate fue llevado a Europa y otras partes del mundo a inicios del siglo XVI (Peralta y Spooner 2005; Paran *et al.* 2007). La aceptación del tomate fue desigual: mientras que en España e Italia se utilizó en la alimentación desde el principio en los demás países se utilizó sólo como ornamental, por sus flores amarillas y sus bayas. Esta situación se mantuvo en muchos países del Norte de Europa hasta finales del siglo XVIII - principios del XIX. Esto pudo deberse a que las solanáceas europeas eran ricas en alcaloides, sustancias que tenían efectos somníferos, paralizantes y a veces mortales (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995).

El tomate tiene muchas características que lo convierten en una planta modelo particularmente interesante, como son sus frutos carnosos, raíz simpodial, hojas compuestas, etc., que otras plantas como el arroz o *Arabidopsis* no tienen. Muchas de estas características son agrónomicamente importantes y no pueden ser estudiadas con ninguna otra planta modelo (Kimura y Sinha, 2008).

1.1.- Importancia económica del tomate

El tomate es una de las hortalizas más ampliamente difundidas en todo el mundo y de mayor valor económico (Cuartero, 2001). Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. A ello contribuye el hecho de que se trata de un producto destinado a ser consumido en fresco o bien procesado de múltiples maneras (Costa y Heuvelink, 2005). El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. De hecho, en nuestro país la producción de tomate representó la mayor producción con 4 millones de toneladas y



una superficie de 48 mil hectáreas, entre todos los cultivos de hortalizas durante el año 2012 (MARM, 2015).

En España, la superficie de cultivo de tomate es mayoritariamente de regadío, con una superficie aproximada de sesenta y cuatro mil hectáreas, siendo además el cultivo al aire libre predominante sobre el cultivo protegido. Si analizamos la producción por comunidades autónomas, destacan fundamentalmente Extremadura y Andalucía con casi dos millones y un millón setecientas mil toneladas durante 2011, respectivamente. En tercer lugar se sitúa la Región de Murcia con casi cuatrocientas mil toneladas de producción. La Comunidad Valenciana se encuentra en el octavo puesto, con una participación de tan sólo el 1,7% de la producción total nacional (INE, 2015).

A nivel mundial, España se sitúa como el octavo país productor de tomate con 4 millones de toneladas, el tercer país en cuanto a volumen exportado con 964.054 toneladas, tanto tomate fresco como en conserva, y como el décimo país importador de tomate con 144.608 toneladas, según datos de 2012 (FAOSTAT, 2015).

1.2.- Variedades tradicionales de tomate

Desde su introducción los agricultores han ido desarrollando ecotipos adaptados a condiciones locales y seleccionando variedades. No es, por tanto, de extrañar que después de siglos de selección dispongamos de un impresionante patrimonio formado por variedades tradicionales o locales de muchos cultivos, en su mayor parte caracterizadas por su excelente calidad. Estas variedades son pues el resultado del trabajo de selección y mejora realizado por los agricultores (García-Martínez, 1998; Guzmán *et al.*, 2000; Cebolla, 2005) y se hallan inmersas en el proceso coevolutivo, que les otorga un carácter dinámico y diverso (González y Guzmán, 2006). De esta manera, el criterio tenido en cuenta para la selección, respondía fundamentalmente a la rusticidad del cultivo, así como a otro tipo de aspectos, relacionados más bien con la calidad del fruto. Con los años se ha constituido de esta forma una serie de grupos varietales bien adaptados a cada ambiente y con productos muy apreciados en los mercados locales a los que se destinaban.

Algunas de las variedades tradicionales destacables en el sureste español son “Muchamiel” de Alicante, el “Tres cascós de Elche”, el “De la Pera” en la Vega Baja del Segura, “El Valenciano”, los “tomates morunos”, o el “Flor de Baladre” en Murcia.



1.2.1.- Origen, tipos y problemática

En función de las características morfológicas de los frutos (fundamentalmente forma, tamaño y color), las variedades tradicionales se pueden clasificar en distintos tipos o grupos varietales, más o menos homogéneos. En la figura 1 aparecen los frutos de algunas de estas variedades tradicionales. El tipo varietal “De la Pera” está formado por un conjunto de variedades cuyos frutos se caracterizan por tener cierta forma aperada. Se cultivan principalmente en el sur de la provincia de Alicante y en las poblaciones vecinas de Murcia. Estos frutos tenían un doble uso; los primeros frutos recolectados se destinaban a consumo en fresco, mientras que los últimos se empleaban en conserva. La variedad “Muchamiel” toma el nombre de la misma localidad alicantina. Está formado por un conjunto de variedades que tienen el fruto aplastado, más o menos rizado y de mayor tamaño que el anterior tipo. Se cultivan en el norte de Alicante, Valencia y también Murcia. Su principal uso es para consumo en fresco sobre todo en ensaladas. El “Tres cascos” de Elche, se caracteriza por la forma aperada de sus frutos con tres lóbulos o “cascos” fuertemente marcados, cultivado en la zona del campo de Elche. Su tamaño es un poco mayor que el “De la pera”, y al igual que estos también tiene un doble uso, consumo en fresco y conserva. El tipo varietal “Valenciano” se identifica por la forma acorazonada de sus frutos y su principal uso es para consumo en fresco en ensaladas. En las sierras del sureste español se dan un conjunto de variedades, algunas similares en morfología a “Muchamiel”, pero que en su maduración presentan un color rojo más oscuro muy cercano al morado. Por esta coloración característica reciben el nombre de tomates “morunos”. Por último, la variedad “Flor de Baladre” proviene de Murcia, y se caracteriza por tener una forma y tamaño de sus frutos parecida al “Muchamiel”, siendo éstos un poco mas acostillados o rizados (Nuez y Ruiz, 1999).

Existen muchísimas variedades tradicionales más en España, pudiéndose afirmar que, prácticamente en cualquier zona donde el tomate haya sido cultivado desde hace bastante tiempo, se han seleccionado variedades locales, siendo la adaptación a las condiciones agroclimáticas específicas y la calidad organoléptica los principales criterios de selección.

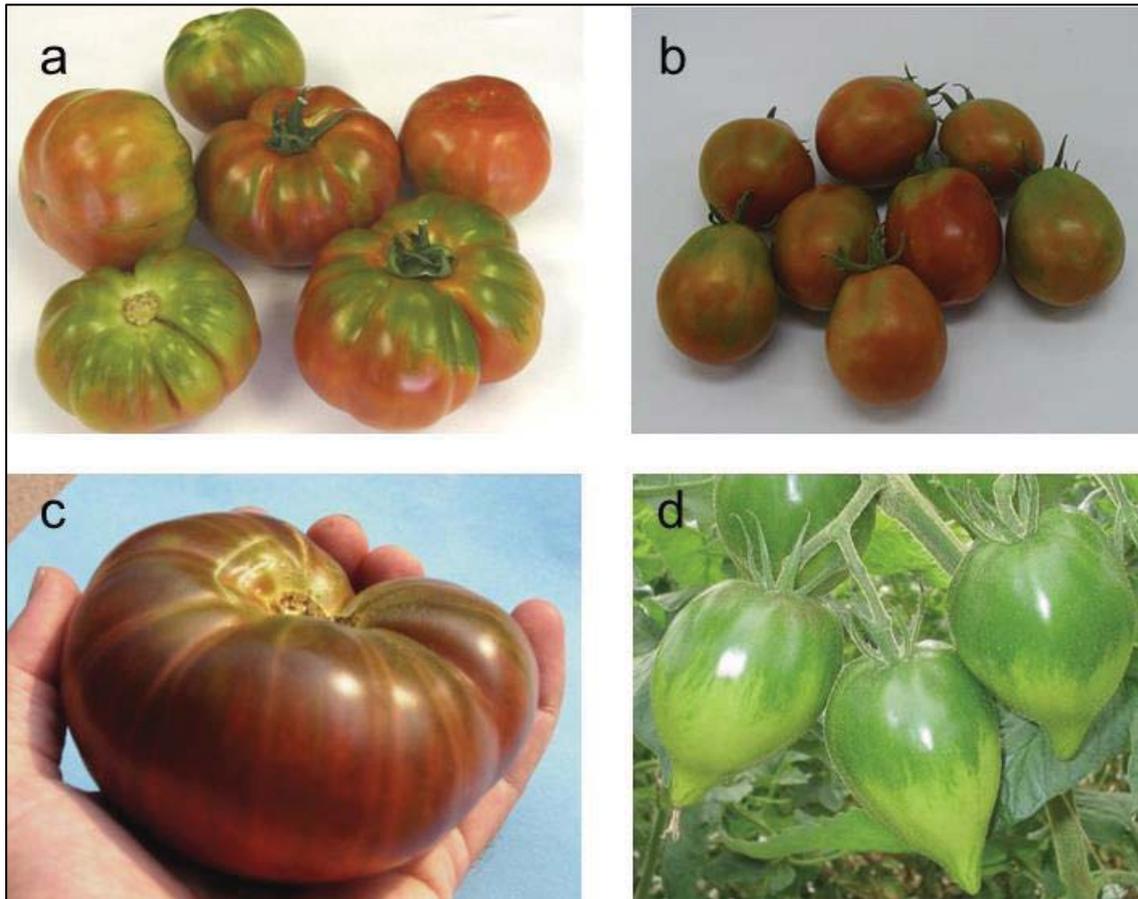


Figura 1: Frutos de las variedades tradicionales Muchamiel (a), De la pera (b), morunos (c) y Valenciano (d).

Todas las variedades tradicionales de tomate tienen en común sus excepcionales características organolépticas, que las hacen muy apreciadas por parte de los consumidores locales. La preferencia de los consumidores españoles por una mayor calidad, por productos reconocidos localmente y su rechazo hacia los costes medioambientales derivados de la distancia entre los centros de producción y los de consumo (“food miles”), podrían hacer que el mercado local fuera adecuado para estas variedades. Además un alto porcentaje de consumidores pagaría más por una variedad de tomate local (“Muchamiel” o “De la Pera”), según Brugarolas *et al.* 2009. Sin embargo, son sensibles a todas y cada una de las virosis que afectan al tomate, lo que hace prácticamente imposible su cultivo, favoreciendo un progresivo abandono de su cultivo y sustitución por otras variedades modernas, en su mayoría híbridos F1 (Nuez *et al.*, 1998). De esta forma se va produciendo la sustitución de las variedades tradicionales por las mejoradas. Actualmente, ya hemos perdido una parte considerable de este patrimonio agrícola.

Este abandono supone una pérdida irreversible de diversidad genética, ya que, además de las claras diferencias apreciables a simple vista, como forma, tamaño o



color, se ha comprobado que también existen para caracteres de calidad tanto entre los distintos tipos varietales como dentro de cada uno de ellos (Ruiz *et al.*, 2005a,b; Ruiz *et al.*, 2006). Este hecho implica una grave pérdida, pues la diversidad significa seguridad frente a enfermedades, plagas y condiciones climáticas inesperadas (Cooper *et al.*, 1992). El efecto negativo de la sustitución de los cultivos y variedades tradicionales por cultivares mejorados fue mucho menos evidente a primera vista, pero supuso una pérdida extraordinaria de diversidad genética (Frankel y Hawkes, 1975).

El tomate hospeda más de 200 especies de un gran abanico de plagas y patógenos que generan significativas pérdidas económicas, pero la naturaleza también nos ha provisto de una gran variedad de resistencias, disponible en las especies silvestres (Bai y Lindhout, 2007).

Para utilizar una mayor proporción de la diversidad genética disponible una posible alternativa es volver a distribuir semillas de variedades tradicionales (y especies silvestres relacionadas) a los agricultores, así como incorporarlas a programas de mejora. Estos programas producirían variedades tradicionales mejoradas, que deberían ser ensayadas en distintas condiciones para comprobar su adaptación a los sistemas de cultivo, como paso previo hacia un sistema de mejora integrado. En definitiva se trata de acciones con la finalidad de permitir una mayor posibilidad de elección de variedades para los agricultores (Cooper *et al.*, 1994).

Por razones económicas, la mejora de estas variedades con un limitado mercado queda fuera de los programas de las empresas productoras de semillas, por lo que debe ser abordada preferentemente por organismos públicos (Nuez y Ruiz, 1999).

1.2.2.- Necesidad de introducir resistencias genéticas

La sensibilidad a todos los patógenos que afectan al tomate es la principal causa del abandono de las variedades tradicionales. Por lo tanto, su recuperación pasa por la introducción de resistencia genética a dichos patógenos.

A partir de los años 30 empezaron a utilizarse distintas especies silvestres en los programas de mejora (Rick, 1986), especialmente con el objetivo de introgresar determinados genes de resistencia en variedades cultivadas. Su importancia es tal, que el tomate es la especie cultivada que ha sufrido más introgresiones de genes de resistencia procedentes de otras especies emparentadas (Hajjar y Hodgkin, 2007). De entre ellos cabe destacar los siguientes, presentes en la mayor parte de los cultivares comerciales actuales: *Tm-1* y *Tm-2* (resistencia a ToMV), *Sw-5* (resistencia a TSWV), *Frl* (resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*) y *Mi* y *Mi-3* (resistencia a diferentes especies de Meloidogyne), procedentes de *S. peruvianum*; *I* e *I-2*



(resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 0 y 1), *Ve* (resistencia a *Verticillium dahliae*), *Cf-2*, *Cf-5*, *Cf-6* y *Cf-9* (resistencia a diferentes razas de *Cladosporium fulvum*), *Sm* (resistencia a *Stemphyllium* sp.) y *Pto* (resistencia a *Pseudomonas syringiae* pv. *tomato*), procedentes de *S. pimpinellifolium*; *I-3* (resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2) procedente de *S. pennellii*; *Ty-1* y *Ty-3* (resistencia a TYLCV) procedente de *S. chilense*; y *Ty-2* (resistencia a TYLCV) procedente de *S. habrochaites* (Robertson y Labate, 2007).

En la siguiente tabla se presenta un resumen de las principales especies silvestres de tomate, como recursos genéticos, con las características de genes de interés que han sido o podrían ser consideradas en programas de mejora del cultivo.

Tabla 1. Características agronómicas de interés de las especies silvestre de tomate. (Tomado de Prohens *et al.*, 2008).

Especies	Características de interés
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> L.	Tolerancia a humedad, resistencia a hongos y enfermedades del suelo
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg and <i>S. galapagense</i> S. Darwin & Peralta	Tolerancia a salinidad, "jointless genes" y espesor del pericarpio
<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	Alto contenido de azúcares
<i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	Resistencia a bacterias
<i>S. pennellii</i> Correll	Resistencia a sequía
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D. M. Spooner	Tolerancia a frío y heladas, resistencia a insectos y enfermedades
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	Resistencia a sequía y enfermedades
Complejo peruvianum: <i>S. peruvianum</i> (L.), <i>S. arcanum</i> (Peralta), <i>S. corneliomuelleri</i> (J.F. Macbr.), <i>S. huaylasense</i> (Peralta & S. Knaap	Resistencia a virus, hongos y bacterias

En esta tabla 1 se puede observar que la especie silvestre *S. habrochaites* S. Knapp & D. M. Spooner (anteriormente *Lycopersicon hirsutum* D.), se ha utilizado como fuente de resistencia a enfermedades en tomate cultivado, como el hongo *Phytophthora infestans*, tizón tardío (Brouwer and St.Clair, 2004), y la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Francis *et al.*, 2001).



En 1998 empezó un programa de mejora para la introducción de genes de resistencia a las tres virosis más importantes que afectan al cultivo del tomate en el sureste español. Estas virosis son el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) y el virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV).

La mayoría de las resistencias de las que se dispone son monogénicas, o de tipo vertical, por lo que se corre el riesgo de que sean superadas. Sin embargo, su introducción es más fácil, cosa que no ocurre con la resistencia poligénica u horizontal, la cual es más estable, pero de más difícil introducción. Por éstas y otras razones, como la agresiva dinámica de lanzamiento de nuevas variedades por parte de las casas de semillas, la mejora genética para plagas y enfermedades se ha centrado en la resistencia monogénica o vertical (Nuez *et al.*, 2004).

En los últimos años podemos encontrar muchos ejemplos de utilización de marcadores moleculares en programas de mejora contra plagas y enfermedades en tomate, como los de Masuelli *et al.* (2000), Robert *et al.* (2001), Langella *et al.* (2004), Skupinova *et al.* (2004), Garland *et al.* (2005) y Gardner *et al.* (2012). También hay ejemplos en leñosas (Lecouls *et al.*, 2004), así como para otros caracteres como contenido en aceites (Tanhuanpää and Vilkki, 1999), azúcares (Yousef and Juvik, 2001) o caracteres organolépticos (Joseph *et al.*, 2004). Esto demuestra la utilidad de los marcadores en los programas de mejora. Las casas de semillas también emplean marcadores moleculares en sus programas de mejora, pero por razones obvias muchos de estos marcadores no suelen ser de dominio público.

1.2.3.- Estudio de la variabilidad en las variedades tradicionales

A simple vista se pueden apreciar diferencias entre las distintas variedades de tomate, tanto tradicionales como comerciales, para distintos caracteres (figuras 1 y 2). Estas diferencias fácilmente observables se pueden agrupar en caracteres agronómicos (rendimiento, cuajado en condiciones adversas, resistencia a distintos factores bióticos o abióticos) y morfológicos (forma, tamaño y color de distintas partes de la planta). Actualmente hay un programa de análisis de imagen, de uso libre, para el estudio morfológico y morfométrico del fruto de tomate como es el "Tomatoanalyzer" con el cual se han realizado trabajos, por ejemplo: Gonzalo y van der Knaap, 2008; Gonzalo *et al.*, 2009; Mazzucato *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2011; u otras especies como papaya (Blas *et al.*, 2012) o berenjena (Plazas *et al.*, 2013).



Figura 2: Diversidad de frutos de tomate.

Existe otro tipo de diferencias que sólo se pueden detectar mediante métodos analíticos. El contenido en distintos compuestos (azúcares, acidez, microelementos, componentes volátiles responsables del aroma y propiedades funcionales), pertenecen a este segundo tipo de diferencias, más sutiles que las primeras, y que frecuentemente necesitan la puesta a punto de una metodología específica para poder ser estudiadas. Estas diferencias, por ejemplo en la composición del fruto, son tan importantes como las primeras. Así, se estudió en tomate el contenido de macroelementos y microelementos mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS), cuyos resultados se recogen en el artículo publicado en la revista *Journal of the Science of Food and Agriculture* (García-Martínez *et al.*, 2011)

Con los avances producidos en los últimos años en las técnicas de biología molecular, se ha hecho posible además detectar parte de las diferencias a nivel de secuencia del ADN. Debido a que estudiar los genes sigue siendo difícil, se suelen emplear marcadores moleculares para estimar y estudiar esta variabilidad genética. Con el tiempo se han ido realizando muchos estudios de variabilidad genética e identificación varietal en tomate usando marcadores moleculares. Entre los primeros estudios en tomate y en especies silvestres relacionadas, destacan los trabajos de Smulders *et al.* (1997), Alvarez *et al.* (2001), Park *et al.* (2004), Tam *et al.* (2005) y Fray *et al.* (2005).



Los marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) reflejan polimorfismos que afectan a un único nucleótido de una secuencia de ADN. Son marcadores bialélicos, codominantes, altamente reproducibles, son los más abundantes y se encuentran distribuidos aleatoriamente por el genoma de cualquier especie. Actualmente, hay una gran cantidad de técnicas de genotipado de SNPs que permiten analizar miles de muestras en forma rápida y eficiente (Ragoussis, 2009). En los últimos años, ha habido enormes avances en las técnicas de genotipado, incluyendo micromatrices que permiten estudiar millones de SNPs. Además, los costes de genotipado han bajado considerablemente haciéndolos cada día más asequibles. Las plataformas más populares permiten analizar desde 10 SNPs a más de 1 millón de ellos, en una sola reacción, y por tanto, economizan al máximo tiempo y coste. Dentro de las plataformas para genotipado de alto rendimiento, destacan por su mayor utilización en tomate la de Affymetrix GeneChip (Sim *et al.*, 2009) y la de Illumina Infinium BeadArray (Sim *et al.*, 2012; Corrado *et al.*, 2013).

Otros ejemplos en otras especies, que estudian y comparan tanto la caracterización morfológica como molecular, se puede observar en el trabajo de variedades tradicionales de judía de la Campania (Italia), realizado por Scarano, **Rubio et al.** (2014).

Actualmente, se está estudiando la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real, usando de molde c-ARN (ácido ribonucleico complementario), para caracterizar las rutas biosintéticas de algunos componentes interesantes en los tomates como carotenoides, licopenos, etc, como por ejemplo los trabajos de Stigliani *et al.* (2011) o **Rubio et al.** (2013).

1.3.- Programa de mejora

Como se ha comentado anteriormente, por razones económicas, la mejora de las variedades tradicionales con un limitado mercado queda fuera de los programas de las empresas productoras de semillas, por lo que debe ser abordada preferentemente por organismos públicos (Nuez y Ruiz, 1999).

Todo programa de mejora genética está basado en la búsqueda de genes de interés tanto agronómico como de calidad para su posterior introducción en una variedad, con el objetivo de conferir a la misma unos caracteres determinados. La selección asistida por marcadores moleculares de los materiales que incorporan este tipo de genes, es actualmente la metodología más adecuada. De esta forma se acelera el proceso de selección y por tanto se reduce considerablemente la duración de un programa de mejora.



También se ha comentado anteriormente, miembros del actual grupo de investigación de la UMH “Biodiversidad Agrícola y Mejora Genética de Variedades”, comenzaron en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) un programa de mejora para la introducción de genes de resistencia a las tres virosis más importantes que afectan al cultivo del tomate en el sureste español. Estas virosis son el virus del mosaico del tomate (ToMV), el virus del bronceado del tomate (TSWV) y el virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (TYLCV). Existen otras virosis, como el mosaico del pepino dulce (PepMV) o el “Torrao”, que tienen incidencia sobre el tomate, pero no se disponía de fuentes efectivas e resistencia en aquel momento, por lo que no se planteó su introducción.

Las etapas que comprende el programa son las siguientes:

- ✓ Caracterización agronómica de variedades tradicionales.
- ✓ Realización de cruzamientos.
- ✓ Realización de retrocruzamientos.
- ✓ Fijación de los genes de resistencia.
- ✓ Selección de las mejores líneas.
- ✓ Inscripción en los registros de variedades comerciales y protegidas

Se han empleado marcadores moleculares para la selección precoz de los individuos portadores de todos los genes de interés. En las distintas generaciones de retrocruzamiento se han empleado de forma complementaria la selección genotípica, mediante marcadores, y la selección fenotípica. Esta selección fenotípica se realiza para seleccionar, entre las plantas portadoras de los genes de interés (según los marcadores empleados) aquellas que no manifiesten síntomas de las virosis y que tengan mejores características de cuajado, tamaño de fruto, uniformidad, producción, etc. Ambas técnicas, la selección fenotípica y genotípica, no son excluyentes, habiéndose confirmado que el resultado óptimo se obtiene empleando una combinación de las dos técnicas (Capel *et al.*, 2000; Martín, 2002; García-García, P., 2004).



En la figura 3 aparece el esquema con las etapas del programa de mejora en curso, así como el momento de realización.

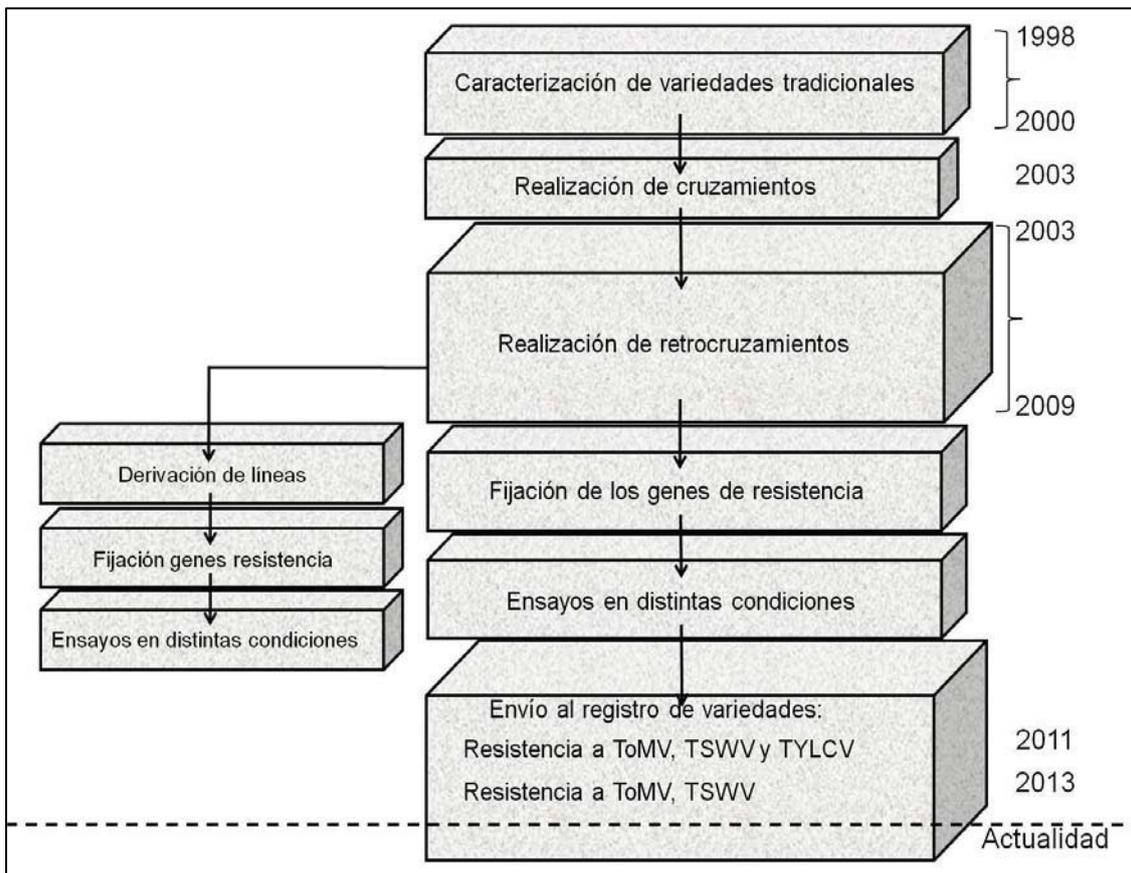


Figura 3: Esquema con las etapas del programa de mejora.

Este programa de mejora es un largo proceso en el que es muy importante seleccionar de forma adecuada para no perder las características de las variedades tradicionales. Algunas líneas con resistencia genética derivadas de este programa, podrían ser muy adecuadas para la producción en cultivo ecológico, donde está muy limitado el uso de productos fitosanitarios, su uso favorece un elevado nivel de biodiversidad y la preservación de los recursos naturales (reglamento CE nº834/2007). Además se promueve una doble función social, por una parte la producción en agricultura ecológica que gestiona bienes públicos que contribuyen a la protección del medio ambiente y el desarrollo rural, y por otra parte este tipo de agricultura es un método sostenible de producir productos autóctonos, con cierto valor de calidad organoléptica, que responde a la demanda de consumidores concienciados con el medio natural, como se recoge en **Rubio** (2011).



1.3.1.- Caracterización agronómica de las variedades tradicionales

La caracterización y conservación de las variedades locales es uno de los objetivos principales en su preservación y utilización (Ercolano *et al.*, 2008). Estos cultivares tradicionales presentan en general una excelente calidad organoléptica y atesoran una amplia variabilidad genética (Adalid *et al.*, 2008), que los conforma como una interesante fuente de variabilidad para la mejora de la calidad interna de los cultivares modernos (Valcarcel, 2009; Saha *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta el gran esfuerzo y la duración de un programa de mejora se entiende la importancia crítica de la etapa de caracterización, pues hay que asegurarse bien de cómo es el material de partida. Para los datos de caracterización se dispone de “descriptores” para homogeneizar la información (IPGRI, 1996).

En el caso del programa de mejora desarrollado por nuestro grupo de investigación, la caracterización tuvo lugar durante varios años (del 1998 al 2000). Se evaluaron distintas accesiones en diferentes ambientes y durante varias campañas. Las primeras caracterizaciones llevadas a cabo se recogen en los Trabajos de fin de carrera de Ingeniero Técnico Agrícola de García-Martínez, S. (1998), Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "De la pera" y Alonso, A. (1998) Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "Muchamiel".

1.3.2.- Realización de cruzamientos

Tan importante como la caracterización de las variedades tradicionales a mejorar es la elección de la variedad que será la fuente de los genes de resistencia en nuestro programa de mejora. En este caso recurrimos al híbrido comercial F1 Anastasia (*S. lycopersicum* L.) de Seminis Vegetable Seeds, que contiene los genes: *Tm-2a* que le proporciona resistencia al virus del mosaico (ToMV), *Sw-5* que confiere resistencia al virus del bronceado (TSWV) y finalmente *Ty-1* que le otorga tolerancia al virus de la cuchara (TYLCV) (Pérez de Castro *et al.*, 2007). Estas fuentes de resistencia provienen, de las especies silvestres de tomate *Solanum peruvianum* L. para ToMV y TSWV y de la planta *Solanum chilense* D. para virus de la cuchara (TYLCV), respectivamente. (Robertson y Labate 2007, Prohens *et al.* 2008).

Los cruces intraespecíficos se realizaron de forma manual y el porcentaje de frutos cuajados que producen semillas dependió de distintos factores (la posición de la flor en el ramillete, las condiciones de temperatura, iluminación, humedad, etc.). En nuestras condiciones este porcentaje de frutos cuajados osciló entre el 10 y el 40% (García-Martínez, 2006).



1.3.3.- Realización de retrocruces

Después de realizar los cruces tendremos que cruzar de nuevo por la variedad tradicional (retrocruzar) para recuperar al máximo posible sus características manteniendo de forma simultánea la resistencia/tolerancia del híbrido.

Para poder conocer en cada generación los individuos portadores de los genes de resistencia/tolerancia con los que continuar los retrocruces hemos empleado marcadores moleculares ligados a ellos. La obtención de la información sobre la presencia o no de cada uno de los genes que deseamos mantener, tradicionalmente se conseguía observando la respuesta fenotípica de las plantas ante la inoculación del virus. La selección fenotípica presenta multitud de inconvenientes, por ejemplo que la sintomatología no siempre es clara (debido principalmente al efecto del ambiente), que se pueden producir escapes en la inoculación del virus, que obliga a manejar de forma adecuada poblaciones del insecto vector, etc. El empleo de marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia evita muchos de estos inconvenientes, pero la selección fenotípica sigue siendo necesaria. En cada generación se hace un seguimiento individualizado de las plantas para, aunque el marcador las indique como resistentes/tolerantes, eliminar aquellas que manifiesten síntomas de alguna de las virosis. Sin embargo, no es posible para todas las virosis llevar a cabo la selección fenotípica en todos los ciclos de cultivo. Simultáneamente, tiene lugar una selección en base a caracteres deseables, tanto agronómicos como de forma de los frutos (aspecto muy característico de los tipos varietales que centran nuestro programa de mejora) y sobretodo organolépticos.

1.3.4.- Selección asistida por marcadores

La existencia de marcadores moleculares ligados a los genes de interés permite realizar una selección genotípica (porque se basa en una diferencia en la secuencia de ADN) e indirecta (porque se selecciona el marcador, no el gen). Al tratarse de una selección genotípica se dejan de lado los efectos que el ambiente, el manejo de los vectores y la posibilidad de escapes puedan tener. Además, estos marcadores permiten una selección precoz, en semillero, de los individuos resistentes/tolerantes con lo que se trasplantan únicamente los individuos de interés con las consiguientes ventajas de ahorro de espacio y tiempo. Se facilita así el trabajo con un elevado número de plantas, necesario para obtener suficientes individuos con los tres genes de resistencia/tolerancia que pretendemos incorporar a nuestras líneas, tras la evaluación con los marcadores.



Sin embargo, el uso de marcadores presenta también una serie de inconvenientes como son su coste, personal especializado, la dificultad en su puesta a punto y la posibilidad de errores por recombinación. Las ventajas superan con creces estos aspectos negativos, por lo que el uso de marcadores en mejora es muy extenso. Cuando comenzó el programa de mejora se emplearon marcadores previamente descritos por otros autores y los resultados de cosegregación obtenidos con los tres marcadores utilizados fueron muy buenos. Sin embargo, dos de ellos no se comportaban como codominantes con nuestro material vegetal, por lo que se decidió desarrollar nuevos marcadores (García-Martínez, 2006). El empleo de marcadores no debe suponer el abandono de la evaluación de los síntomas en las plantas, pues podrían tener lugar fenómenos de recombinación entre el marcador y el gen o bien podrían producirse errores en el proceso de genotipado.

1.3.5.- Inscripción en los registros de variedades comerciales y protegidas

En 2011 se solicitó la inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas de las primeras líneas de mejora con resistencia a virosis derivadas del Programa de mejora de la EPSO.

La línea de mejora UMH1200 (figura 4) es homocigota para los genes *Tm-2^a*, *Sw-5* y *Ty-1*, que confieren resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), al virus del bronceado del tomate (TSWV) y al virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (TYLCV), respectivamente. Esta línea, del tipo “Muchamiel”, se obtuvo por autofecundación de un triple heterocigoto, tras cinco retrocruces. La línea de mejora es similar a la accesión (M18) de la variedad tradicional de la que deriva, con la excepción del hombro del fruto, que es menos intenso. En el ensayo realizado en invernadero, no se encontraron diferencias significativas entre la línea de mejora UMH 1200 y la variedad tradicional M18. Sin embargo, en el ensayo realizado al aire libre, la línea de mejora sufrió un acusado descenso de producción, de más del 50% respecto a la accesión tradicional. Estos resultados están publicados en la revista HortScience (García-Martínez *et al.* 2011).

La línea de mejora UMH1203 (figura 4), del tipo varietal “De la pera”, cuenta con las mismas resistencias que la anterior, y también se obtuvo tras cinco retrocruces por autofecundación de un triple heterocigoto. La línea de mejora tiene un tamaño, forma y características organolépticas similares a la accesión (P21) de la variedad tradicional, de la que deriva. La producción de la línea de mejora fue similar a la de la variedad tradicional en los ensayos al aire libre realizados. Sin embargo, en los ensayos realizados bajo invernadero se obtuvo un descenso de producción que oscila



entre el 30 y el 50%. Estos resultados se recogen en un artículo publicado en la revista HortScience (García-Martínez *et al.* 2012).



Figura 4: Frutos de las líneas UMH1200 (izquierda) y UMH1203 (derecha).

Como alternativa para superar el descenso de producción obtenido en las líneas con resistencia en homocigosis a las tres virosis, se desarrollaron líneas con diferentes combinaciones de resistencias. Todas ellas tienen en común que no contienen el gen *Ty-1*, que confiere resistencia a TYLCV, que es el que parecía tener un mayor efecto negativo, en ensayos preliminares (Alonso *et al.*, 2008).

A finales de 2013 se solicitó la inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas de líneas de mejora “De la pera” y “Muchamiel” con resistencia a ToMV y TSWV, o sólo a ToMV, y ninguna con resistencia a TYLCV.



Figura 5: Frutos de las líneas UMH1415 (izquierda) y UMH1422 (derecha).



Para el tipo "De la pera" se desarrollaron las líneas UMH1415, con resistencia a ToMV y TSWV, y también la UMH1422, resistente únicamente a ToMV, ambas tras nueve retrocruces (figura 5). Los frutos de estas líneas tienen también un tamaño medio, entre 70 y 90 gramos, forma aperada y hombro verde bastante intenso, además su calidad organoléptica es similar a la de la variedad tradicional. La producción obtenida por estas líneas, comparada con la variedad tradicional, varía en función de las condiciones. Al aire libre no se encontraron diferencias, bajo invernadero produjeron más que la variedad tradicional, mientras que bajo malla la línea UMH1415 obtuvo una producción ligeramente inferior (García-Martínez *et al.*, 2014).

Para el tipo "Muchamiel" se desarrollaron las líneas UMH1093, UMH1127 y UMH1139, todas ellas con resistencia a ToMV y TSWV, y con 5 retrocruces (figura 6). La producción obtenida por estas líneas es igual o superior a la de la variedad tradicional, tanto al aire libre como en invernadero, salvo en algún ensayo, en el que se observó una ligera reducción (García-Martínez *et al.*, en preparación).

Se espera que a finales de 2015 finalice el proceso y se inscriban las líneas de mejora sin resistencia a TYLCV en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas.



Figura 6: Frutos de las líneas UMH1093 (izquierda arriba) y UMH1127 (derecha arriba) y UMH1139.



1.3.6.- Próximos envíos

Otras obtenciones derivadas del Programa de mejora de la EPSO para las que se podrá empezar en breve el proceso de inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas son las siguientes:

- UMH972, línea de mejora “Muchamiel” únicamente con resistencia a ToMV y muy productiva.
- UMH1353 y UMH1354 línea de mejora “De la pera” con resistencia a ToMV y TSWV y una gran productividad.
- UMH1400 línea “Cherry” con forma aperada con resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV.
- UMH1401 línea “De la pera” con resistencia a virosis del tipo ToMV y TSWV.
- UMH1209 línea “De la pera moruna” porque al madurar tienen un color rojo oscuro chocolatado con resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV.
- UMH1155 línea “De la pera moruna” porque también al madurar tienen un color rojo oscuro chocolatado, con resistencia a ToMV y TSWV.
- Híbridos entre líneas de mejora “Muchamiel” con resistencia y variedades tradicionales de diverso origen, con los genes de resistencia en heterocigosis a los 3 virus.

1.4.- Efecto de la introducción de genes de especies silvestres relacionadas

Las fuentes de resistencia suelen encontrarse en especies relacionadas en tomate u otros cultivos. Frecuentemente la introducción de genes de especies silvestres merma la producción y la calidad organoléptica de las especies cultivadas, debido al efecto negativo de aquéllas en los cruces interespecíficos.

1.4.1.- Ejemplos en tomate

Hay varios trabajos donde se ha comprobado el efecto negativo de la introducción de genes procedentes de especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado. Tanksley *et al.* (1998) observaron leves reducciones en producción y calidad asociadas a la introducción de resistencia a ToMV en tomate. Por otro lado, la especie silvestre *S. hirsutum*, que confiere resistencia a *Phytophthora infestans*, contenía alelos perjudiciales en caracteres importantes para la horticultura según Brouwer and St.Clair (2004). En dos estudios de líneas de tomate segregantes al gen *Ty-1* (el cual confiere resistencia a TYLCV), Alonso *et al.* (2008) encontraron que la región del cromosoma 6 que contiene el gen, es desfavorable para los caracteres agronómicos y de calidad. Más recientemente, en otro estudio se demostró que no hay recombinación



genética, probablemente debido a la inversión del segmento que contiene al gen *Ty-1* Verlaan *et al.* (2011). En el trabajo realizado por García-Martínez *et al.* (2012) se encontró una reducción en la producción de tomate del 33%, en el peso medio de los frutos un 17% y para la acidez un 10%, comparando homocigoto resistente con homocigoto sensible, mientras que no se encontraron diferencias significativas para sólidos solubles. En uno de los artículos que forman parte de esta tesis (Rubio, F., García-Martínez, S., Alonso A., Grau A., Valero M., Ruiz J.J. Introgression of virus-resistance genes into traditional tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.): effects on yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, enviado), se ha estudiado el efecto de la introducción simultánea de los genes de resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV, siendo este último el que ha tenido un mayor efecto negativo.

1.4.2.- Ejemplos en otros cultivos

También hay publicaciones donde se describe el efecto negativo de la introducción de genes de resistencia de especies silvestres en otros cultivos, debido a la introgresión de genes no deseados o carga de ligamiento, como se estudió en el trigo y cebada (Brown, 2002). Por otro lado, Lewis *et al.* (2007) observaron una disminución en producción y calidad en plantas de tabaco con el gen “N” (que proviene de *Nicotiana glutinosa* L.), el cual confiere resistencia a “TMV”, sugiriendo la existencia de carga de ligamiento. En cultivos leñosos como el manzano (*Malus domestica* Bork) las plántulas homocigotas resistentes a la sarna o roña (producida por el hongo *Venturia inaequalis*) presentaron menor vigor (Gao and van de Weg, 2005).

2. OBJETIVOS



2.-OBJETIVOS

Esta tesis se ha realizado dentro del programa de mejora de variedades tradicionales de tomate que se está realizando en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández. En esta tesis se plantearon conseguir los siguientes objetivos:

- Evaluación del efecto de la introducción de los genes de resistencia a ToMV, TSWV y TYLCV sobre algunos parámetros agronómicos y de calidad en tomate. Para ello se estudiarán, en distintas campañas y condiciones de cultivo, dos colecciones de líneas que contienen todas las combinaciones posibles de los tres genes de resistencia a virosis introducidos en homocigosis, una del tipo “De la pera” y otra del “Muchamiel”.
- Continuar con el desarrollo de nuevas líneas de mejora con resistencia a virus (dentro del Programa de Mejora), y su posterior inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas.
- Puesta a punto de la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) para estimar distintos parámetros de frutos de tomate. Esta técnica puede suponer un ahorro de trabajo importante, lo que podría facilitar la tarea de selección.

3. PUBLICACIONES



3.- PUBLICACIONES

3.1.- Bajo revisión

Efecto de la introducción de resistencia genética a virosis

- 3.1.1.-**Rubio, F.**, García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., Valero, M., Ruiz, J.J. (enviado). Introgression of virus-resistance genes into traditional tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.): effects on yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.



Journal of the Science of Food and Agriculture



Introgression of virus-resistance genes into traditional tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.): effects on yield and quality

Journal:	<i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i>
Manuscript ID:	JSFA-15-0779
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	29-Mar-2015
Complete List of Authors:	Rubio, Fernando; UMH, APPLIED BIOLOGY Alonso, Arantxa; Universidad Miquel Hernández, Tecnologia Agroalimentaria García-Martínez, Santiago; Universidad Miquel Hernández, Biología Aplicada Ruiz, Juan; MIGUEL HERNANDEZ UNIVERSITY, APPLIED BIOLOGY
Key Words:	<i>Solanum lycopersicum</i> , De la Pera, Muchamiel, linkage drag

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

JSFA@wiley.com



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introgression of virus-resistance genes into traditional tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.): effects on yield and quality

Fernando Rubio, Aranzazu Alonso, Santiago Garcia-Martinez, Juan J. Ruiz

Departamento Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández. Carretera de Beniel,
km 3,2. 03312-Orihuela-, Alicante (Spain)

Running title: Effects on yield and quality of virus-resistance genes



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

BACKGROUND:

Several tomato landraces are very popular in south-eastern Spain for their organoleptic fruit quality, but these cultivars are highly susceptible to several viruses. Our breeding program has recently developed breeding lines with introgressed genes for virus resistance. In order to evaluate possible effects on yield and fruit quality of these introgressed genes for resistance, breeding lines corresponding to 'De la Pera' and 'Muchamiel' landraces were grown in replicated assays under commercial production conditions in five different locations and trial conditions.

RESULTS:

The effect of the introgressed ToMV resistance gene was significant for all 'De la Pera' and 'Muchamiel' trials, except for the parameter number of fruits per plant. TSWV gene effects were also significant, except for the number of inflorescences per plant, total and commercial yield. Finally, TYLCV resistance gene had an important effect, except for SSC, as it was observed in previous studies carried out by our group.

CONCLUSIONS:

Advanced breeding lines carrying ToMV and TSWV resistance genes in homozygous conditions can be developed without important losses in agronomic and quality characteristics. However, the *Ty-1* gene used for TYLCW resistance should be used only in heterozygous conditions.

KEY WORDS: *Solanum lycopersicum*, 'De la Pera', 'Muchamiel', linkage drag.



INTRODUCTION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

'Muchamiel', 'De la Pera', 'Valenciano' or 'Flor de Baladre' are traditional tomato cultivar types, which are very popular in south eastern Spain for their organoleptic fruit quality. They are still being cultivated by local farmers in small orchards. Frequently ignored outside their production area, these tomatoes are highly esteemed by local people due to their excellent quality. In local markets, traditional cultivars sell for three to six times the price of the hybrid varieties.¹ However, these landraces are severely endangered with the risk of extinction, because of their high susceptibility to several viruses, such as those caused by the ToMV, TSWV and TYLCV.² Although the presence of the viruses in tomato fields greatly fluctuates from one year to another, their incidence strongly decrease the benefits obtained by farmers, and even make non-viable in many areas the cultivation of landraces. The abandonment of these traditional cultivars would lead to an irreversible loss of genetic diversity. Commercial hybrid varieties with genetic resistances to the viruses have been developed, but these resistance genes have not been introgressed into local varieties, since they represent only a small seed-market share.

In 1998 we started a breeding program for the simultaneous introduction of three dominant genes (*Im-2a*, *Sw-5*, and *Ty-1*) that confer resistance to the three most relevant viruses in south-eastern Spain (ToMV, TSWV and TYLCV, respectively) into 'Muchamiel' and 'De la Pera' traditional cultivars using marker assisted backcrossing. The genes *Im-2a* and *Sw-5* come from the wild tomato *Solanum peruvianum* L., and *Ty-1* originated in the *Solanum chilense* (Dunal) Reiche accession LA1969, another wild tomato specie. As a preliminary result of the breeding program, we have obtained promising pre-breeding materials, which have to be further adapted to the specific agroclimatic conditions of different localities.¹ Breeding line Muchamiel UMH 1200³, homozygous for the three resistance genes, was the first release produced by this breeding program. This homozygous breeding line compared with the original landrace suffer from yield penalties, which are variable depending on the growing conditions. There have been published reports indicating the negative effect of resistance gene introductions, due to the introgressed genes and/or to the linkage drag.⁴ Tanksley *et al.*⁵ observed slight reductions in yield and fruit quality in processing tomatoes with ToMV resistance. Lewis *et al.*⁶ reported yield and quality reduction in tobacco plants



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

containing the *N* gene (coming from the wild *Nicotiana glutinosa* L.), that confers resistance to TMV, suggesting the role of linkage drag. *S. hirsutum* segments containing deleterious alleles in intervals adjacent to those containing the late blight resistance were found at horticulturally important traits by Brouwer and St.Clair.⁷

Studying two tomato breeding lines segregating for *Ty-1* gene, Alonso *et al.*⁸ found that the introgression of the *Ty-1* gene was unfavorable for several productive and quality characters. In an open field experiment with 'De la Pera' near isogenic lines (NILs), homozygous for one, two or the three introgressed genes, Rubio *et al.*⁹ found that the introgression of *Tm-2a*, *Sw-5* and *Ty-1* genes affected agronomic and quality traits, probably due to other genes introduced along with the resistance genes during backcrossing (linkage drag). Multiple chromosome region introduction tend to mask and difficult the effect estimation in agronomic and quality traits. NILs are identical for the entire genome except for the single introgressed region, and they could allow us a more efficient estimation of the effects of introgressed regions, both individually or/and jointly.¹⁰ The development of a NIL population needs a demanding task effort and long time, but it allows us better precise effect estimation, including interactions.¹¹

The main objective of this assay was to determine and quantify the possible effects of ToMV, TSWV and TYLCV resistance introgressions (determined by *Tm-2a*, *Sw-5* and *Ty-1* genes, respectively) on yield or quality of fresh market tomatoes. In attempting to address this question, we have developed two sets of near isogenic lines (NILs) in 'De la Pera' and 'Muchamiel' traditional cultivar genetic backgrounds, containing all the homozygous combinations for the three resistance genes. These NILs were grown in replicated trials in five locations in south eastern Spain and were evaluated for yield and some quality traits.



MATERIALS AND METHODS

Plant material

NILs sets, both for 'De la Pera' and 'Muchamiel' cultivars were developed from selfing two triple heterozygous plants from the UMH tomato breeding program (Figure 1). These plants were selected from populations developed through eight and eleven backcrosses, respectively. The NIL populations consisted of two sets of eight lines containing all the homozygous combinations for the three resistance genes (*Tm-2a*, *Sw-5* and *Ty-1*) from a donor parent, in the genetic background of traditional cultivars. The genotypes are listed in Table 1, with four genotypes duplicated for 'De la Pera' and six for 'Muchamiel'. The genotype of each line was confirmed using three CAPS markers (*To-3*, *Aps-F2* and *CT220*) linked to the resistance genes, routinely used in the breeding program in course.¹

Field experiments

'De la Pera' and 'Muchamiel' lines were grown in different locations (Alicante, Spain) and crop systems from 2009 to 2012 (Table 2). Abbreviations for each trial are: P1, P2 and P3 for 'De la Pera' experiments, and M1 and M2 for 'Muchamiel' experiments. Seeds were germinated in greenhouses and transplanted to the field at the appropriate time in each location at standard plant densities (Table 2). Field experiments consisted of 2 to 4 replications per NIL, with 6 to 8 plants each. Ungrafted plants were grown vertically with single stem, except for M1 trial, which were grafted in Beaufort rootstock (De Ruiter) and grown with two stems. A total of eight traits were evaluated for each Spanish location. At the beginning of the growing season, mild ToMV symptoms were detected in some susceptible plants in some crop cycles. However, symptoms were decreasing over time and were not detected during harvesting. TSWV and TYLCV infected plants were not found in any cycle.

Evaluated traits

Number of inflorescences per plant, measured as the number of inflorescences with at least one open flower the day before harvest. Number of inflorescences with fruits per plant, measured as the number of inflorescences with at least one visible fruit the day before harvest. Number of fruits per plant, measured as the total fruits harvested per

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3 plant. Fruit weight, expressed in grams. Commercial yield, fruits were individually
4 harvested at commercial ripening state, weekly, expressed in g/plant. Only those
5 weighting more than 50 grams were considered commercial fruits. Total yield,
6 considered as the weight of all the fruits harvest per plant, expressed in g/plant. Soluble
7 solids content (SSC) was measured at 8-12 commercial ripening fruits per plot and
8 genotype, at harvest. After the fruits had been juiced, SSC were estimated with an
9 Atago PR-100 digital refractometer, per duplicate, expressing the results as °Brix.
10 Titratable acidity (TA) was measured by pHmatic 23 CRISON with 0.1mol L⁻¹ NaOH
11 to pH 8.1, in the same samples used for SSC measurements. Data were expressed as
12 percentage of citric acid.
13
14
15
16
17
18
19
20

21 *Statistical analysis*

22 In each trial, all traits were analyzed using multifactor ANOVA, comparing the
23 genotype RR (resistant) with the genotype ss (susceptible), for each of the three
24 introduced resistance genes (ToMV, TSWV and TYLCV). To perform a jointly analysis
25 of the 5 trials, normalization was accomplished by subtracting from each value the trait-
26 location mean and then dividing by the standard deviation.⁵ Probability values for
27 contrasts between genotypes were calculated using Newman-Keuls test. Percentage of
28 change in trait means between the RR and ss genotypes for each trait were calculated by
29 subtracting the ss mean from the RR mean and dividing by the ss mean, and then
30 multiplying by 100.⁵
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the percentage of change for the parameters in each trial. For ToMV resistant gene (Figure 1A) significant differences were found in several parameters for at least one assay. Different significant effects were found between 'De la Pera' and 'Muchamiel' trials for the number of inflorescences with fruit per plant, RR genotypes showing higher number than ss for the M1 and M2 trials, while no differences were detected for P1 and P3 trials. For fruit weight, the ss genotype showed higher values than RR also for M1 and M2 trials, while for P1 and P2 the values were higher for the RR genotypes. Finally, the titratable acidity was higher in RR genotypes than in ss genotypes for M1 and M2, while in P2 and P3 it was not significant. The values of the effect of this gene ranged from 31.4% for total production in P1 trial to -15.4% for fruit weight in the M2 trial. SSC parameter showed significant differences, being higher in the susceptible genotypes, except for P3 and M2 trials, in which no significant differences were found.

For the TSWV resistant gene (Figure 1B) significant differences were also found for many parameters in at least one of the trials. Again, different significant effects were found between 'De la Pera' and 'Muchamiel' trials for number of fruits, commercial yield and total yield. In all cases the RR genotypes showed higher values than the ss genotypes for 'Muchamiel' trials. However, the effect in 'De la Pera' trials was the opposite. TSW gen effect measured as percentage of change ranged from 22.3% for fruit number to -14.1% for TA.

In the case of TYLCV resistant gene (Figure 1C) significant differences were found for many parameters, except for SSC in P1 and M2 trials. Only for SSC different significant effects were found between 'De la Pera' and 'Muchamiel' trials. RR genotypes showed higher values than ss genotypes in M1 and M2 assays, while in P2 and P3 trials the ss genotype scored higher values. For the other characters, and even for all individual tests, the values of ss genotype were higher than those of the RR genotypes. The percentage change ranged from 8.6% to -55.1% for SSC and total production, both the M1 cycle. For total and commercial yield parameters significant differences were found in percentages of change, being around -50% at all levels, both in 'De la Pera' and in 'Muchamiel' trials, which clearly indicated the important negative

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

7

JSFA@wiley.com



1
2
3 effect that produced the introgression of the fragment containing the resistance gene *Ty-*
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

effect that produced the introgression of the fragment containing the resistance gene *Ty-1*.

Analysis of the 'De la Pera' trials

Table 3 shows the results of the ANOVA in 'De la Pera' trials (P1, P2 and P3), for the three introgressed resistance genes, and their percentages of change.

In the study of ToMV resistance gene, different significant effects between RR and ss genotypes were found in 5 out of the 8 studied characters (number of fruits, fruit weight, commercial production, total production and SSC). In the rest of studied parameters, the differences were no significant. For the characters with significant differences, values of the resistant plants were higher than those of the susceptible ones, except for SSC. The characters that showed a greater effect were commercial yield, total yield and fruit weight per plant with 18.6%, 17.7% and 11.7%, respectively. These results could be attributed to the slight incidence of ToMV virus affecting plants in the beginning of the growing cycle, as previously discussed in materials and methods. The presence of ToMV in some susceptible plants could be responsible for the slight decreases obtained compared with the resistant plants, which were not infected. In the assays reported by Tanksley *et al.*,⁵ which measured the effect of the introduction of the *Tm-2a* allele in a processed tomato line, the RR genotypes showed lower values for pH than the ss genotypes, while ss genotype showed greater values in total production and SSC x production in red. The decreased scores occurred in the RR genotypes could be caused by the segment of chromosome harboring the *Tm-2a* gene, which possibly contains one or more tightly linked deleterious recessive genes whose negative effects would be revealed only in the homozygous state, according to Tanksley *et al.*⁵

When studying the effect of TSWV resistance gene, different significant effects between RR and ss genotypes were only found in 3 of 8 parameters studied (total production, SSC and titratable acidity). For the rest of studied parameters, the differences were not significant. Resistant homozygous genotypes showed higher values than susceptible homozygous, except for SSC. These results suggest that the presence of the fragment containing the allele *Sw-5* only produced a slight decrease in these parameters, since the effect ranged from -2.7% to -4.7%, significantly lower than the values obtained for the effect due to ToMV and TYLCV resistant genes.



1
2
3 Finally, for the TYLCV resistance gene significant differences between the RR
4 and ss genotypes were found for all studied characters, except for the SSC which
5 showed no significant differences. For the majority of the characters with significant
6 differences, values of the percentages of change were always negative, indicating that
7 the ss genotype had greater values than the RR genotypes, ranging from -6.27% for
8 the number of inflorescences with fruits per plant to -51.65 % for commercial yield.
9 Therefore, the chromosome region containing the *Ty-1* gene clearly showed a
10 deleterious effect greater than regions containing the *Tm-2a* and *Sw-5* genes.
11
12
13
14
15
16

17 In a previous field experiment conducted under open air conditions, the RR
18 homozygote for *Ty-1* showed also important decreases for several traits. Alonso *et al.*
19 (2008) found a 31% reduction for yield, a 20% reduction for fruit weight and 20%
20 reduction for TA. Again, no significant effect was found for SSC. These results indicate
21 that the introgression of *Ty-1* gene adversely affects agronomic and quality traits,
22 probably due also to other genes introduced along with the resistant gene and not
23 removed during backcrossing (linkage drag). Verlaan *et al.*¹² reported the suppression of
24 recombination in the *S. chilense* region containing *Ty-1* gene, due to the occurrence of
25 two chromosomal inversions between *S. chilense* LA1969 (the donor species of the *Ty-1*
26 locus) and *S. lycopersicum*.
27
28
29
30
31
32
33

34 Analysis of the 'Muchamiel' trials

35
36
37 Table 4 shows the results of the ANOVA in 'Muchamiel' trials (M1 and M2),
38 for the three introgressed virus resistance genes, and their percentages of change.
39
40

41 Significant effects between RR and ss genotypes for ToMV resistance gene were
42 found in 5 of 8 studied characters, number of inflorescences, number of inflorescences
43 with fruit per plant, number of fruits, fruit weight, and TA. Except for the parameter
44 fruit weight, RR genotypes showed higher values than ss genotypes. The gene effect
45 ranged from 5.2% for number of inflorescences to 19.3% for number of fruits. The
46 characters that showed a greater effect were number of fruit, TA and fruit weight with
47 19.3%, 12.4% and 14.8%, respectively. As previously stated, the presence of ToMV in
48 some susceptible plants could be responsible for the decreases obtained in the
49 susceptible genotypes.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

When dealing with TSWV resistance, different significant effects between RR and ss genotypes were found in all parameters studied. RR genotypes showed always greater value than the ss genotypes, except for number of fruits, SSC and TA. The range of variation for the percentages of change in this case ranged from -2.8% for SSC to 21.1% for number of fruits. While in the 'Muchamiel' assays significant differences between RR and ss genotypes were found for all parameters, in 'De la Pera' trials (Table 4) differences were only found for total yield, SSC and TA. For the majority of the characters evaluated in the 'Muchamiel' trials, the values of the resistant homozygotes were greater than those of the susceptible homozygotes, except for fruit weight. The opposite occurred for parameters evaluated in 'De la Pera' trials. However, results for 'Muchamiel' and 'De la Pera' trials coincided regarding quality parameters, since susceptible homozygotes showed greater values than resistant homozygotes. This fact suggested that the presence of the fragment that containing the *Sw-5* allele slightly decreased the values for these parameters.

Finally, for TYLCV resistance gene, significant differences between the RR and ss genotypes were found for all studied characters. The change percentages were always negative, indicating that the ss genotypes showed greater values than the RR genotypes, ranging from -6.27% for the number of inflorescences with fruits per plant to -51.65 % for commercial production. Similar results were observed in 'De la Pera' trials (Table 3).

In a previous experiment conducted under greenhouse, with a 'Muchamiel' breeding line segregating for *Ty-1* allele, the RR homozygote for *Ty-1* showed reduction percentages for several important traits. Garcia-Martínez *et al.*¹³ found a 33% reduction for the yield, 17% reduction for fruit weight and 10% reduction for TA, comparing RR genotypes with ss genotypes, while no significant effect were found for SSC. Again, these results indicate that the introgression of *Ty-1* gene adversely affected agronomic and quality traits, probably due to other genes also introduced along with the resistant gene and not removed during backcrossing (linkage drag).¹⁴⁻¹⁶

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Joint analysis of the 'Muchamiel' and the 'De la Pera' trials

Table 5 shows the results of the ANOVA of 'De la Pera' and 'Muchamiel' trials (P1, P2, P3, M1 and M2). When analyzing the effects of ToMV resistant gene, different significant effects between RR and ss genotypes were found for all studied characters, except for fruit weight. The characters, which showed a greater effect for resistant genotypes were commercial yield, total yield and number of fruit per plant with 11.7%, 10.9% and 8.1%, respectively.

For TSWV resistance, different significant effects between RR and ss genotypes were found in 5 out of 8 studied parameters (number of inflorescences with fruits, number of fruits, fruit weight, SSC and titratable acidity), resistant genotypes showing higher values than susceptible genotypes. The opposite situation was found for the rest of parameters, suggesting a slight effect of the fragment containing the allele *Sw-5*, since the parameters varied from 3.2% to -7.1%, significantly lower values than those obtained for ToMV and TYLCV resistance genes. Furthermore, no significant differences were found in total and commercial yield.

Finally, for TYLCV resistance, significant differences between the RR and ss genotypes were found for all studied characters, except for SSC which was not significant. In the case of characters with significant differences, the effects of the gene introgression were always negative, indicating that the ss genotypes showed greater values than the RR genotypes. The presence of the fragment containing the allele *Ty-1* clearly had a detrimental effect since the percentage of change for the parameters evaluated ranged from -6.1% for number of inflorescences to -51.2 % for commercial production, significantly greater values than those obtained for ToMV and TYLCV resistance genes.

CONCLUSIONS

Consistently across all the analysis performed, the chromosome fragment that had a greater effect was that containing the *Ty-1* gene, which conferred resistance to TYLCV. This gene introgression affected negatively all studied parameters, except for SSC, and their effect was particularly important for total and commercial yields, which was decreased by 50%. This reduction in agricultural yield would only be acceptable when cultivating under high levels of virus infection. The effects of the other introduced



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

fragment (*Tm-2a* and *Sw-5*) were minor and showed to be more variable, increasing or decreasing depending on the trial and the studied parameter. To our knowledge, no other study has been reported quantifying the effect of the introgression of genetic resistance to TSWV and TYLCV in tomato cultivars. This information could be very useful for tomato breeders. Advanced breeding lines carrying ToMV and TSWV resistance genes in homozygous conditions can be developed without important losses in agronomic and quality characteristics. However, the Ty-1 gene used for TYLCW resistance should be used only in developing cultivars for highly virus-infected areas; otherwise it should be used in heterozygous conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank J.M. Sánchez and C. Ballester for assisting in analysis, A. Grau for crop practices, and Fabiola Ruiz, Borja Chacón, Candela Teruel, María Jover and Antonio Rosa for collaborating in these studies. This work was partially supported by the Spanish MICINN through projects AGL2005-03946, AGL2008-03822 and AGL2011-26957.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- 1 Ruiz JJ and 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 n° 15*, ed. by Vetelainen M, Negri V and Maxted N. Rome, pp. 171-176 (2009).
- 2 Picó B, Herraiz J, Ruiz JJ and Nuez F, Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Sci Horti* 94(1-2), 73-89 (2002).
- 3 García-Martínez, S, Grau, A, Alonso, A, Rubio, F, Valero, M. and Ruiz JJ, UMH 1200, a breeding line within the Muchamiel tomato type, resistant to three viruses. *HortScience* 46(7):1054-1055 (2011).
- 4 Brown JKM, Yield penalties of disease resistance in crops. *Curr Opin Plant Biol* 5:339-344 (2002).
- 5 Tanksley SD, Bernachi D, BeckBunn T, Emmatty D, Eshed Y, Inai S, Lopez J, Petiard V, Sayama H, Uhlig J and Zamir D. 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 (1998).
- 6 Lewis RS, Linger LR, Wolff M.F and Wernsman EA. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theor Appl Genet* 115, 169-178 (2007).
- 7 Brouwer DJ and St Clair DA, 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 (2004).
- 8 Alonso A, García-Martínez S, Arroyo A, García-Gusano M, Grau A, Giménez-Ros M, Romano ME, Valero M and Ruiz JJ, 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 (2008).
- 9 Rubio F, García-Martínez S, Alonso A, Grau A, Valero M, Ruiz JJ, Introgressing resistance genes into traditional tomato varieties: effects on yield and quality. 28th International Horticultural Congress. Lisboa 2010.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 10 Eshed Y and Zamir D, An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141, 1147–1162 (1995).
- 11 Keurentjes JJB, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Hanhart CJ, Blankestijn-DeVries H, Effgen S, Vreugdenhil D, and Koomneef M, Development of a Near-Isogenic Line Population of *Arabidopsis thaliana* and Comparison of Mapping Power With a Recombinant Inbred Line Population. *Genetics* 175: 891–905 (2007).
- 12 Verlaan MG, Szinay D, Hutton SF, de Jong H, Kormelink R, Visser GF, Scott JW, Bai Y. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *Plant J* 1093–1103 (2011).
- 13 García-Martínez S, Giménez M, Alonso A, Grau A, Valero M, Parra J, Aguilar A, Gamayo, JDD and Ruiz JJ, The introgression of genetic resistance to TYLCV into traditional tomato varieties caused similar yield reductions under different growing conditions. *Acta Horticulturae* 935: 149-152 (2012).
- 14 García-Martínez, S, Grau A, Alonso A, Rubio F, Valero M and Ruiz JJ, UMH 1203, a multiple virus-resistant fresh-market tomato breeding line for open-field conditions. *HortScience* 47(1):1-2 (2012).
- 15 García-Martínez S, Grau A, Alonso A, Rubio F, Valero M and Ruiz JJ, UMH 1422 and UMH 1415: Two De la pera Tomato Type Breeding Lines Resistant to Viruses with Reduced Linkage drag *HortScience* 49 (11):1465-1466 (2014).
- 16 García-Martínez S, Grau A, Alonso A, Rubio F, Valero M and Ruiz JJ, UMH 1093, UMH 1127 and UMH 1139: Three Muchamiel Tomato Type Breeding Lines Resistant to ToMV and TSWV, with Reduced Linkage drag *HortScience* (in press).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

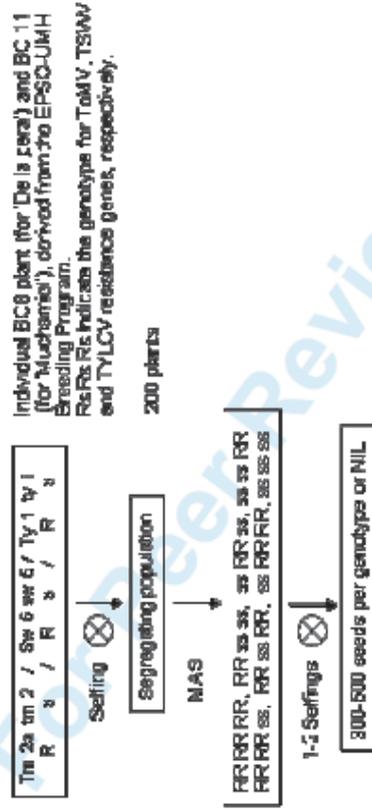
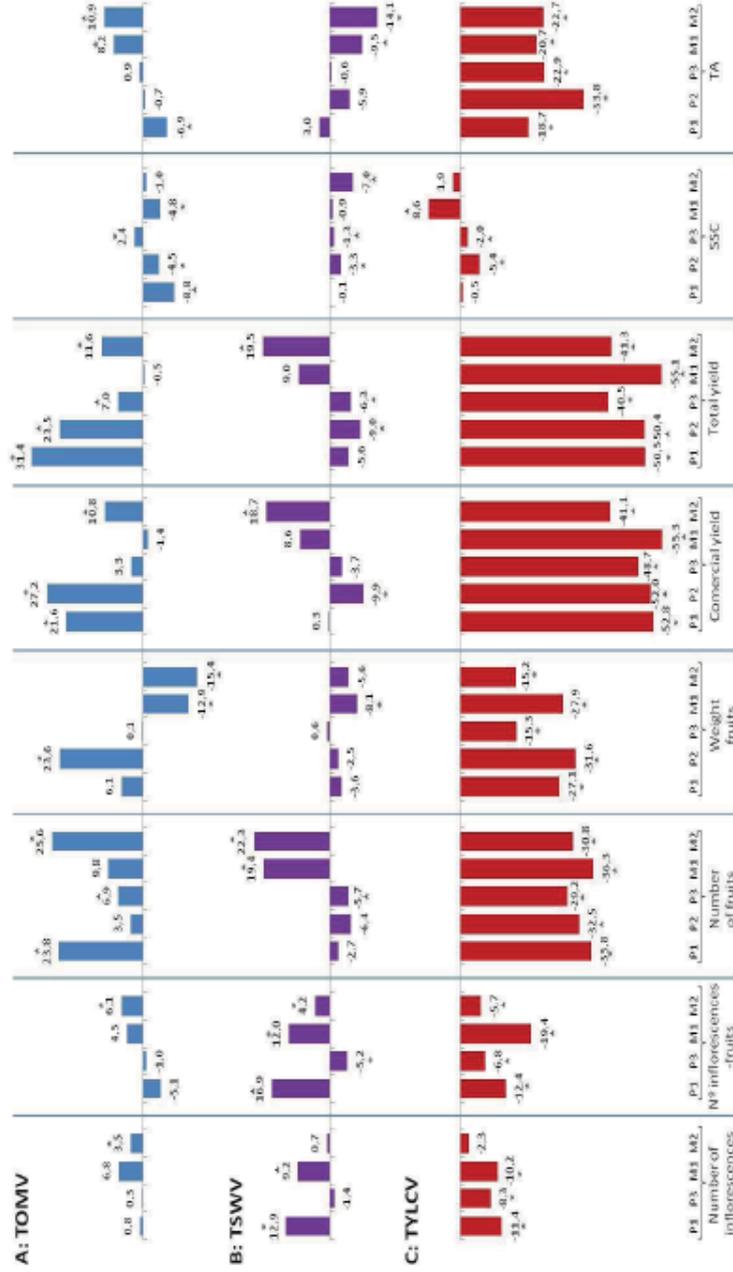


Figure 1: Breeding scheme for NIL development. The different generations are included in boxes, linking successive generations with an arrow. Selfing rounds are depicted as "encircled multiple symbols". Marker Assisted Selection (MAS) step indicated marker screenings to fix the different genotypes. R₂R₃R₄ and ss mean resistant heterozygous, resistant homozygous and susceptible homozygous, respectively.

Figure 2: Effect of the virus resistance [A (ToMV), B (TSWV) and C (TYLCV)] introgressions on studied traits for each trial. Calculated percentage changes are represented at the top of bars.



Calculated percentage change: traits means between the RR homozygous subtracting ss homozygous and dividing by ss homozygous mean and then multiplying by 100.
*Significantly different at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test).



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Set of the Near Isogenic Lines (NILs) used in this assay, with the genotype for each virus resistance gene (RR, resistant homozygous and ss, susceptible homozygous)

'Muchamiel'				'De la pera'			
Line	Genotype			Line	Genotype		
	<i>Tm-2a</i>	<i>Ty-1</i>	<i>Svr-5</i>		<i>Tm-2a</i>	<i>Ty-1</i>	<i>Svr-5</i>
939	RR	RR	RR	1385	RR	RR	RR
1000	RR	RR	RR	1339	RR	RR	RR
776	RR	RR	ss	565	RR	RR	ss
887	RR	RR	ss	631	RR	RR	ss
916	RR	ss	ss	1422	RR	ss	ss
972	RR	ss	ss	1415	RR	ss	RR
942	RR	ss	RR	1458	ss	RR	ss
1002	RR	ss	RR	1378	ss	RR	RR
929	ss	RR	ss	1413	ss	RR	RR
800	ss	RR	RR	1487	ss	ss	RR
879	ss	ss	RR	1278	ss	ss	ss
891	ss	ss	RR	1449	ss	ss	ss
850	ss	ss	ss				
993	ss	ss	ss				

Table 2: General information and growing conditions of the trials.

General information		Trial conditions					
Variety	Code	Location Latitude/ Longitude	Crop system	Cycle and year	Repetition	Plants per plot	Plant density (pl/m ²)
De la Pera'	P1	Orihuela (Alicante)	Open field	Apr.-July 2009	2	10-15	2,5
		38°04'13" -0°58'57"					
	P2	Agost (Alicante)	Plastic greenhouse	Apr.-Aug. 2010	3-4	10	2,5
	P3	Orihuela (Alicante)	Mesh greenhouse	Apr.-July 2012	3	6-7	2,5
		38°04'05" -0°58'51"					
	M1	Orihuela (Alicante)	Open field	Apr.-Aug. 2011	2	8	1,35
	M2	Orihuela (Alicante)	Open field	Apr.-Aug. 2011	2	7	2,7
		38°04'13" -0°58'57"					

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

Table 3: Parameter means for 'De la Pera' trials (P1, P2 and P3) for RR and ss genotypes and the three introgressed virus resistance genes (ToMV, TSWV and TYLCV). Significance level was obtained from a Multifactor ANOVA. Percentage change values were calculated by subtracting the ss mean from the RR mean and dividing by the ss mean, and then multiplying by 100. In positive values when the RR genotype was higher than the ss genotype. The jointly analysis was performed with the standardized values for each individual cycle.

Cycles P1/P2/P3/ Resistance genes	RR	ss	Number of inflorescences per plant	Number of inflorescences with fruits per plant	Number of fruits per plant	Fruit weight (g/plant)	Concord yield (g/plant)	Yield (g/plant)	Soluble solid content (SSC) (°Brix)	Titratable acidity (g/100 g citric acid)
ToMV	7.99	7.83	2%	6.49	35.01*	66*	1936*	2308*	4.74*	0.35
										-0.8%
TSWV	7.92	7.91	0.1%	6.48	33.68	62	1747	2084*	4.72*	0.34*
										-4.7%
TYLCV	7.58*	8.25	-8.1%	6.30*	27.38*	54*	1168*	1468*	4.76	0.31*
										-20.4%
					40.34	71	2406	2801	4.81	0.39

* Significantly different at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test).

Table 4. Parameter means for Muehambel trials (M1 and M2) for RR and ss genotypes and the three introgressed virus resistance genes (ToMV, TSWV and TYLCV). Significance level was obtained from a Multifactor ANOVA. Percentage change values were calculated by subtracting the ss mean from the RR mean and dividing by the ss mean, and then multiplying by 100. In positive values when the RR genotype was higher than the ss genotype. The jointly analysis was performed with the standardized values for each individual cycle.

Cycles/MIM2/ Resistance genes	RR	ss	Number of inflorescences per plant	Number of inflorescences with fruits per plant	Number of fruits per plant	Fruit weight (g/plant)	Commercial yield (g/plant)	Yield (g/plant)	Soluble solid content (SSC) (°Brix)	Titimable acidity (g/100 g citric acid)
ToMV	6.89*	5.2%	5.19*	6.8%	18.97*	138*	2662	2746	3.39	0.32*
	6.55		4.86		15.49	162	2506	2570	3.63	0.29
TSWV	6.83*	3.2%	5.20*	7.1%	19.09*	145*	2768*	2848*	3.56*	0.29*
	6.61		4.85		15.77	156	2406	2468	3.66	0.32
TYLCV	6.57*	-5.1%	4.73*	-11.2%	13.87*	133*	1772*	1823*	3.71*	0.27*
	6.90		5.32		21.01	167	3396	3493	3.50	0.34

* Significantly different at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Table 5: Parameter means for all trials for RR and ss genotypes and the three introgressed virus resistance genes (ToMV, TSWV and TYLCV). Significance level was obtained from a Multifactor ANOVA. Percentage change values were calculated by subtracting the ss mean from the RR mean and dividing by the ss mean, and then multiplying by 100. In positive values when the RR genotype was higher than ss genotype. The jointly analysis was performed with the standardized values for each individual cycle.

Cycles Resistance genes	Number of inflorescences per plant	Number of inflorescences with fruits per plant	Number of fruits per plant	Fruit weight (g/plant)	Commercial yield (g/plant)	Yield (g/plant)	Soluble solid content (SSC) (°Brix)	Titratable acidity (g/100 g citric acid)
ToMV RR	7.44*	5.85*	28.30*	97	2196*	2562*	4.27*	0.34*
ss	7.19	5.71	26.18	95	1964	2312	4.34	0.33
TSWV RR	7.37	5.88*	27.78*	93*	2115	2470	4.24*	0.32*
ss	7.26	5.69	26.70	99	2045	2404	4.38	0.35
TYLCV RR	7.09*	5.53*	22.12*	81*	1365*	1706*	4.32	0.30*
ss	7.54	6.04	32.36	111	2796	3168	4.29	0.37

* Significantly different at $P < 0.05$ (Newman-Keuls test).



3.2.-Publicados

Líneas del programa de mejora enviadas al registro

- 3.2.1.-García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, 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.



HORTSCIENCE 46(7):1054–1055. 2011.

UMH 1200, a Breeding Line within the Muchamiel Tomato Type Resistant to Three Viruses

Santiago García-Martínez, Adrián Grau, Aranzazu Alonso, Fernando Rubio, Manuel Valero, and Juan J. Ruiz¹

Department of Applied Biology, Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel, km. 3.2, 03312, Orihuela, Spain

Additional index words. ToMV, TSWV and TYLCV, Tm-2a, Sw-5 and Ty-1

Muchamiel is a tomato landrace that is very popular in southeastern Spain as a result of its organoleptic fruit 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. However, this landrace is severely endangered and at risk of extinction as a result of its high susceptibility to several viruses such as those caused by the *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), and *Tomato yellow curl virus* (TYLCV) (Picó et al., 2002). To introgress genetic resistances to ToMV, TSWV, and TYLCV into the Muchamiel landrace, a breeding program has been carried out over the last 10 years at Miguel Hernández University (Spain). Breeding line UMH 1200 is the first release produced by this breeding program. UMH 1200 has medium-sized fruits (150 to 190 g) and organoleptic characteristics similar to those of the original landrace. This homozygous breeding line suffers from a yield penalty compared with the original landrace, which is variable depending on the growing conditions, but its tolerance/resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV has been demonstrated in several field and greenhouse trials.

Origin

Breeding line UMH 1200 was obtained by crossing a Muchamiel line (accession M18, previously selected for high yield and uniformity) with the commercial cultivar Anastasia F₁ (Seminis Vegetable Seeds) followed by five generations of backcrossing to the Muchamiel cultivar. Anastasia was used as the donor parent of the *Tm-2^a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes (Pérez de Castro et al., 2005), conferring resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV, respectively. 'Anastasia' is a popular tomato cultivar in Spain with indeterminate and vigorous plant growth as well as good foliage cover. Marker-assisted selection was used in each generation

Received for publication 25 Feb. 2011. Accepted for publication 1 June 2011.

This work was partially supported by the Spanish MICINN through projects AGL2002-03329, AGL2005-03946, and AGL2008-03822.

¹To whom reprint requests should be addressed; e-mail juan.j.ruiz@umh.es.

to select the plants that carried the three resistance genes. In addition, a high selection pressure for Muchamiel characteristics was applied during each backcross generation. After five additional generations of selfing and selection, the pure-breeding line, UMH 1200, homozygous for the three introgressed virus resistance genes, was selected from a single BC₅F₅ family whose seed was multiplied by self-pollination. UMH 1200 resistances to ToMV and TSWV have been additionally verified by mechanical inoculation assays, and tolerance to TYLCV has been demonstrated in several assays performed in naturally infested fields.

Description

UMH 1200 is homozygous for the *Tm-2^a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes. As is the case with the cultivar M18, the breeding line has indeterminate growth with intermediate foliage density, ripe fruits do not separate easily from pedicels during harvest, and they sometimes have yellow shoulders. However, the green shoulders of UMH 1200 fruits are frequently less intense than those of the original landrace fruits. In trials carried out in 2010, no significant differences in yield were found between the breeding line and cultivar M18 in the

greenhouse (Table 1). However, there was a very important yield decrease in UMH 1200 in the open field crops. Similar results were obtained for the number of fruits per plant and the average fruit weight. These results as well as additional, as-yet unpublished data indicate that the introgression of the resistance genes affects traits of importance for fresh tomatoes. Whether the observed effects are the result of one, two, or three of the introgressed resistance genes, or the result of genes associated through linkage drag, is an important question that we are studying, although the yield problems are mainly as a result of the introgression of the *Ty-1* gene (Rubio et al., 2010). Negative effects associated with the introgression of resistance genes have been reported previously in tomato (Tanksley et al., 1998) as well as in other crops (Brown, 2002; Lewis et al., 2007). However, the comparison of the sensory profiles and volatile composition of the breeding line to the original landrace during cold storage indicated that organoleptic fruit quality had been recovered through the backcrossing program. Moreover, fruits of the breeding line demonstrated better postharvest behavior with higher firmness achieving better scores in odor and aroma at the end of the storage period (Alonso et al., 2010). Because no specific selection for better postharvest behavior was performed during backcrossing, this result could very well be the effect of the introduction of the genetic resistance to the viruses. Data we obtained reinforce the idea that genetic improvement for disease resistance in the Muchamiel landrace can be achieved without reducing the sensory quality and aroma complexity of the fruits (Alonso et al., 2009).

Use

Breeding line UMH 1200 has genetic tolerance/resistance to the three most important viruses in tomato in southeastern Spain. The incidence of these viruses greatly reduces the profits obtained by farmers and even makes the cultivation of landraces nonviable in many

Table 1. Yield traits, titratable acidity (TA), and soluble solids concentration (SSC) of the breeding line UMH 1200, the Muchamiel landrace (accession M18), and Boludo F₁, grown in the open field (2009 and 2010) and greenhouse (2010), in the spring–summer crop cycle.

	Marketable yield (kg/plant) ^a	Avg fruit wt (g) ^a	Fruit number per plant ^a	TA (g/100 g) ^b	SSC (°Brix) ^b
Open field 2009					
UMH 1200	2.05 a ^c	145 a	14.7 a	0.53 a	4.6 a
Accession M18	3.14 b	220 b	14.1 a	0.54 a	4.3 a
Boludo F ₁	4.25 c	101 a	40.0 b	0.60 b	5.4 b
Open field 2010					
UMH 1200	2.15 a	190 a	10.7 a	0.37 a	4.9 b
Accession M18	4.75 b	227 b	20.7 b	0.33 a	4.2 a
Boludo F ₁	4.82 b	169 a	24.3 b	0.71 b	7.4 c
Greenhouse 2010					
UMH 1200	3.83	141 b	27.3 a	0.30 a	3.9 a
Accession M18	4.40	182 c	24.5 a	0.34 b	3.8 a
Boludo F ₁	4.84	102 a	50.2 b	0.48 c	4.6 b

^aMean of six plants per plot for two replicates.

^bMean of six fruits per plot for two replicates.

^cMean values in a column followed by a different letter are significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).



areas, especially in the open field. Despite the yield decrease associated with the introgressed resistances, the breeding line is available for cropping in open fields, where the viruses' incidence is especially intense, allowing farmers to obtain an acceptable harvest. This breeding line may also be used in breeding programs to facilitate the introgression of the resistance genes into other landraces. We are also developing F₁ hybrids by crossing UMH 1200 with other selected Muchamiel lines to increase yield by using the genetic resistance in a heterozygous state.

Availability

Small trial seed samples of the UMH 1200 breeding line are available for research purposes (contact the authors).

Literature Cited

- Alonso, A., S. García-Martínez, L. Vázquez-Araujo, J.J. Ruiz, and A.A. Carbonell-Barrachina. 2010. Comparative post-harvest behaviour of traditional and virus-resistant Muchamiel tomatoes. *J. Sci. Food Agr.* 90:1056–1062.
- Alonso, A., L. Vázquez-Araujo, S. García-Martínez, J.J. Ruiz, and A.A. Carbonell-Barrachina. 2009. Volatile compounds of traditional and virus-resistant breeding lines of Muchamiel tomatoes. *Eur. Food Res. Technol.* 230:315–323.
- Brown, J.K.M. 2002. Yield penalties of disease resistance in crops. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 339–344.
- 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., M.J. Díez, and F. Nuez. 2005. Evaluation of breeding tomato lines partially resistant to *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon chilense*. *Can. J. Plant Pathol.* 27:268–275.
- Picó, B., J. Herraiz, J.J. Ruiz, and F. Nuez. 2002. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Sci. Hort.* 94:73–89.
- Rubio, F., S. García-Martínez, A. Alonso, A. Grau, M. Valero, and J.J. Ruiz. 2010. Introgressing resistance genes into traditional tomato varieties: Effects on yield and quality. 28th International Horticultural Congress, Lisboa, Portugal.
- Tanksley, S.D., D. Bernachi, T. BeckBunn, D. Emmatty, Y. Eshed, S. Inai, J. Lopez, V. Pétian, H. Sayama, J. Uhlig, and D. Zamir. 1998. Yield and quality evaluations on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the Tm2^a gene for resistance to the *Tobacco mosaic virus*. *Euphytica* 99:77–83.



Líneas del programa de mejora enviadas al registro

- 3.2.2.-García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, 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.



HORTSCIENCE 47(1):124–125. 2012.

UMH 1203, a Multiple Virus-resistant Fresh-market Tomato Breeding Line for Open-field Conditions

Santiago García-Martínez, Adrián Grau, Aranzazu Alonso, Fernando Rubio, Manuel Valero, and Juan J. Ruiz¹

Department of Applied Biology, Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel, km. 3,2, 03312, Orihuela, Spain

Additional index words. ToMV, TSWV and TYLCV, Tm-2a, Sw-5, Ty-1

'De la Pera' is a tomato landrace that is very popular in a limited area in southeastern Spain as a result of its organoleptic fruit quality. Its cultivation is restricted to a small area in the Segura River region in Alicante. Fruits have a juicy and firm texture, a high proportion of seeds and mucilage, and are strongly flavored. Fruits weigh between 75 and 125 g, varying from elongated-oval to bell shape with dark green shoulders and without ribs. However, like most 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 curl virus* (TYLCV) (Ruiz et al., 2005). A breeding program for the introgression of resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV into several tomato landraces has been carried out over the last 10 years at Miguel Hernández University (Spain). Breeding line UMH 1203 is the second release from this breeding program (García-Martínez et al., 2011). UMH 1203 has medium-sized fruits (70 to 100 g) and organoleptic characteristics similar to those of the landrace. Under greenhouse cropping, this homozygous breeding line suffers from a yield penalty, but its performance in open-field conditions is similar to the original landrace.

Origin

Breeding line UMH 1203 has been developed following the same breeding scheme as that used for the development of UMH 1200 (García-Martínez et al., 2011). UMH 1203 has been obtained by crossing a 'De la Pera' line (accession P21, previously selected for fruit morphological characteristics, high yield, and uniformity) with the commercial F₁ cultivar Anastasia (Seminis Vegetable Seeds, Saint Louis, MO) followed by six generations of backcrossing to the 'De la Pera' line. Anastasia was used as the donor parent of

the *Tm-2^a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes (Pérez de Castro et al., 2007), conferring resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV, respectively. At the time the breeding program began, 'Anastasia' was a popular tomato cultivar in Spain, suitable both for greenhouse and open-field production. Marker-assisted selection was used in each generation to select the plants that carried the three resistance genes (García-Martínez et al., 2003). In addition, a high selection pressure for 'De la Pera' characteristics (bell shape, green shoulder, tolerance to blossom end rot) and good agronomic behavior was applied during each backcross generation. After five additional generations of selfing and selection, the pure-breeding UMH 1203, homozygous for the three introgressed virus resistance genes, was selected from a single BC₅F₅ family whose seed was multiplied by

self-pollination. UMH 1203 resistances have been demonstrated in several field and greenhouse trials. In addition, ToMV and TSWV resistances were verified by mechanical inoculation assays, and tolerance to TYLCV has been demonstrated in several naturally infested fields.

Description and Performance

UMH 1203 has indeterminate growth with intermediate foliage density. The green shoulders of UMH 1203 fruits (Fig. 1) are frequently less intense than those of the original landrace fruits. Ripe fruits separate easily from pedicels during harvest, as is the case with the line P21. In trials carried out in 2009, 2010, and 2011, no significant differences in yield were found between UMH 1203 and P21 in the open-field crops (Table 1). However, UMH 1203 showed a very important yield decrease in the two greenhouse trials. Average fruit weight of UMH 1203 was similar to that of the traditional cultivar and no significant differences were found for the titratable acidity between the breeding line and the original line, except in the 2011 open-field trial. In two of the trials, significant differences were detected for soluble solids content, but differences were not consistent, because in the 2009 open-field trial, the line P21 reached slightly higher values than UMH 1203, but the opposite result was shown in the 2010 trial. The results of the organoleptic test presented in Table 2 also suggest a high level of similarity between the two lines for sensory aspects of fruit quality. Significant differences between the



Fig. 1. Fruits of UMH 1203.

Received for publication 14 Oct. 2011. Accepted for publication 10 Nov. 2011.

This work was partially supported by the Spanish MICINN through projects AGL2002-03329, AGL2005-03946, and AGL2008-03822.

¹To whom reprint requests should be addressed; e-mail juan.j.ruiz@umh.es.



Table 1. Yield traits, titratable acidity (TA), and soluble solids concentration (SSC) of the breeding line UMH 1203, the 'De la Pera' landrace (accession P21), and Boludo F₁, grown in 2009, 2010, and 2011 in the open field and in 2010 and 2011 under greenhouse in the spring to summer crop cycle.

	Marketable yield (kg/plant) ^a	Avg fruit wt (g) ^a	Fruit number per plant ^a	TA (g/100 g) ^b	SSC (°Brix) ^b
Open field 2009					
UMH 1203	1.85 a ^c	82 a	21.9 a	0.51 a	4.93 a
Accession P21	1.95 a	88 a	22.4 a	0.51 a	5.18 b
Boludo F ₁	2.92 b	97 b	30.0 b	0.60 b	4.74 a
Open field 2010					
UMH 1203	2.71 a	91 a	30.0 a	0.30 a	4.49 b
Accession P21	2.65 a	87 a	32.6 a	0.32 a	4.10 a
Boludo F ₁	4.48 b	136 b	33.9 a	0.54 b	5.10 c
Greenhouse 2010					
UMH 1203	2.26 a	78 a	29.2 a	0.30 a	4.05 a
Accession P21	3.72 b	106 b	35.4 b	0.30 a	3.89 a
Boludo F ₁	4.84 c	101 b	50.2 c	0.48 b	4.57 b
Open field 2011					
UMH 1203	2.76 a	89 a	34.1 a	0.45 b	4.53 a
Accession P21	3.14 a	87 a	42.3 b	0.34 a	4.47 a
Boludo F ₁	5.30 b	137 b	48.4 b	0.75 c	4.52 a
Greenhouse 2011					
UMH 1203	1.40 a	71 a	16.0 a	0.43 a	5.23 b
Accession P21	2.79 b	72 a	34.7 b	0.48 a	5.17 b
Boludo F ₁	5.12 c	95 b	50.7 c	0.74 b	4.61 a

^aMean of six plants per plot for two replicates.

^bMean of six fruits per plot for two replicates.

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

Table 2. Comparative sensory analysis of UMH 1203 and accession P21 grown in the open field in 2011 in the spring to summer crop cycle.^a

Line	External appearance	Flavor	Texture	Overall acceptability
	Mean ^b	Mean	Mean	Mean
UMH 1203	3.8 ± 0.12	3.2 ± 0.13	3.4 ± 0.10	3.2 ± 0.11
Accession P21	3.2 ± 0.08	3.4 ± 0.20	3.5 ± 0.13	3.3 ± 0.09
Significance	*	ns	ns	ns

^aFor sensory analysis, fruits were washed and cut into wedges.

^bEach value is the mean (± SE) of the scores of 33 untrained tasters on a 1 (very bad) to 5 (very good) scale. ns, *Non-significant or significant at $P \leq 0.05$ according to the *t* test.

breeding line UMH 1203 and line P21 were detected for external appearance, but not for flavor, texture, and overall acceptability. UMH 1203 showed higher values for external appearance than P21, but the original line received slightly higher scores for flavor,

texture, and overall acceptability. The main goal of the breeding program was to obtain a breeding line with virus resistance that maintains the fruit morphological and organoleptic characteristics of the 'De la Pera' landrace.

Use

Breeding line UMH 1203 has genetic tolerance/resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV, the three most important viruses in tomato in southeastern Spain. The incidence of these viruses in tomato landraces greatly reduces the profits obtained by farmers, and even makes their cultivation nonviable in many areas, especially in open-field conditions. The breeding line is available for open-air cropping where the viruses' incidence is especially intense, allowing farmers to obtain an acceptable harvest. This breeding line may also be used in breeding programs to facilitate the introgression of the resistance genes into other landraces or heirloom tomatoes.

Availability

Small trial seed samples of the UMH 1203 breeding line are available for research purposes (contact the authors).

Literature Cited

- García-Martínez, S., A. Grau, A. Alonso, F. Rubio, M. Valero, and J.J. Ruiz. 2011. UMH 1200, a breeding line within the muchamiel tomato type, resistant to three viruses. *HortScience* 46:1054-1055.
- García-Martínez, S., C. Sánchez, J. Castelló, A. Grau, M. Valero, A. Ferrández, and J.J. Ruiz. 2005. Empleo de marcadores moleculares para la introducción múltiple de genes de resistencia a virus (ToMV, TSWV y TYLCV) en variedades tradicionales de tomate alicantinas. *Agrícola Vergel* 255:140-143.
- 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.
- Ruiz, J.J., S. García-Martínez, B. Picó, M. Gao, and C.F. Quiros. 2005. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional M. varieties of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130:88-94.



Líneas del programa de mejora enviadas al registro

- 3.2.3.-García-Martínez, S., Alonso, A., Grau, A., **Rubio, F.**, Valero, 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):1-2.



HORTSCIENCE 49(11):1465–1466. 2014.

UMH 1422 and UMH 1415: Two Fresh-market Tomato Breeding Lines Resistant to *Tomato Mosaic Virus* and *Tomato Spotted Wilt Virus*

Santiago García-Martínez, Adrián Grau, Aranzazu Alonso, Fernando Rubio, Manuel Valero, and Juan J. Ruiz¹

Department of Applied Biology, Universidad Miguel Hernández, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Carretera de Beniel, km. 3,2, 03312, Orihuela, Spain

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

The incidence of several viral diseases such as those caused by *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) makes tomato landrace cultivation practically nonviable in many areas of south-eastern Spain, especially in open-field conditions (Ruiz et al., 2005). ‘De la Pera’ and ‘Muchamiel’ are two tomato landraces that are very appreciated as a result of their organoleptic fruit quality. The Miguel Hernández University breeding program for the introgression of virus resistance into Spanish landraces has already resulted in the release of two breeding lines, UMH 1200 and UMH 1203, both homozygous for *Tm-2^a*, *Ty-1*, and *Sw-5* genes (García-Martínez et al., 2011, 2012). These breeding lines allow farmers to obtain acceptable harvest under intense virus infection conditions. However, when compared with the original landraces under low virus incidence conditions, important yield decreases were obtained for these breeding lines, ranging between 50% and 75% decrease for UMH 1200 and between 40% and 50% for UMH 1203 (García-Martínez et al., 2011, 2012). These results are the result of the introgressed genes and/or to the linkage drag, as previously reported in processing tomatoes (Tanksley et al., 1998) and in fresh tomato (Rubio et al., 2012), although the yield problems are mainly the result of the introgression of the *Ty-1* gene for *Tomato yellow curl virus* (TYLCV) resistance. For this reason, we have developed the breeding lines UMH 1422 and UMH 1415 without TYLCV resistance. The two lines are useful for tomato cropping in the spring to summer growing cycle, when the incidence of the viruses caused by TYLCV is less intense. Both lines have medium-sized fruits (70 to 90 g) with a bell shape and green shoulders

(Fig. 1). Organoleptic characteristics of the fruits are similar to those of the original landrace. UMH 1422 is homozygous only for the *Tm-2^a* resistance gene, whereas UMH 1415 is homozygous for the *Tm-2^a* and *Sw-5* resistance genes. These breeding lines obtained yields similar to the original landrace in several trials.

Origin

Breeding lines UMH 1422 and UMH 1415 were obtained by crossing a ‘De la Pera’ cultivar (accession P21, previously selected for fruit morphological characteristics, high yield, and uniformity) with the commercial cultivar Anastasia F₁ (Seminis Vegetable Seeds, St. Louis, MO) used as the donor parent of the *Tm-2^a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes (Pérez de Castro et al., 2007), conferring

resistance to ToMV, TSWV, and TYLCV, respectively. Using marker-assisted selection for the three virus resistance genes, nine backcross generations to the ‘De la Pera’ cultivar were performed. Several trials under different infection conditions (mechanical inoculation for ToMV and natural infection for TYLCV and TSWV) were carried out to control the presence of the resistance alleles in the backcross generations and the effectiveness of the molecular markers. In addition, a high selection pressure for ‘De la Pera’ characteristics (bell shape, green shoulder, low sensitivity to blossom-end rot) and good agronomic behavior were applied during all backcross generations. After the selfing of a single triple heterozygous plant from a BC₃F₉ family followed by two additional generations of selfing and selection, the pure breeding lines UMH 1422, homozygous only for *Tm-2^a*, and UMH 1415, homozygous only for *Tm-2^a* and *Sw-5*, were selected using molecular markers and multiplied by self-pollination in a greenhouse under controlled conditions.

Description and Performance

UMH 1422 is homozygous for *Tm-2^a* (ToMV resistance gene), whereas UMH 1415 is homozygous for *Tm-2^a* and *Sw-5* (ToMV and TSWV resistance genes, respectively). The lines have indeterminate growth with intermediate foliage density. From 2009 to 2011 we cultivated UMH 1422, UMH 1415, and the recurrent cultivar P21 under different conditions (open field, greenhouse, and mesh-covered net house) in the spring to summer crop cycle, the most widely used growing cycle in the traditional area of ‘De la Pera’ tomato cultivation. UMH 1422 showed

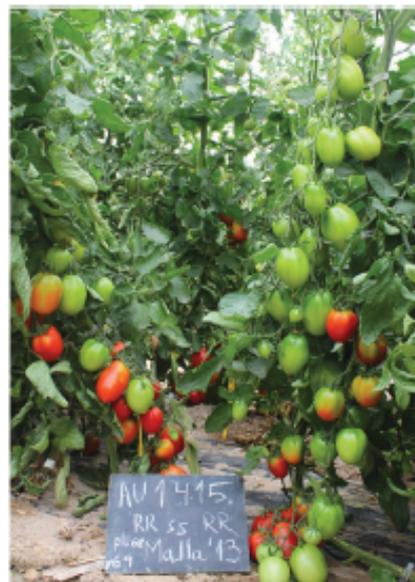


Fig. 1. Fruits of UMH 1415.

Received for publication 28 Aug. 2014. Accepted for publication 5 Oct. 2014.

This work was partially supported by the Spanish MICINN through projects AGL2005-03946, AGL2008-03822, and AGL2011-26957.

¹To whom reprint requests should be addressed; e-mail: juanj.ruiz@umh.es.



Table 1. Yield traits, titratable acidity (TA), and soluble solids concentration (SSC) of the breeding lines UMH 1422, UMH 1415, and 'De la Pera' landrace (accession P21) grown in the open field, greenhouse, and mesh-covered net house in the spring to summer crop cycle.

	Marketable yield (kg/plot) ^a	Avg fruit wt (g) ^b	Fruit number per plot ^c	TA (g/100 g) ^d	SSC (°Brix) ^e
Open field 2009					
UMH 1422	2.61 ^a	82.8	31.7 ab	0.53 a	4.25 a
UMH 1415	2.67	74.3	36.1 b	0.51 a	4.02 a
Accession P21	2.23	76.6	28.9 a	0.63 b	5.81 b
Greenhouse 2010					
UMH 1422	2.65 c	88.7 b	30.3	0.56 ab	4.99 a
UMH 1415	2.32 b	82.7 b	27.9	0.53 a	4.84 a
Accession P21	2.02 a	70.2 a	28.8	0.60 b	5.30 b
Mesh-covered net house 2011					
UMH 1422	2.85 b	74.2 b	38.4	0.55 ab	5.01 a
UMH 1415	2.51 a	68.0 a	37.1	0.53 a	5.12 ab
Accession P21	3.08 b	79.7 c	38.7	0.59 b	5.25 b

^aMean of 10 plants per plot for two replicates.

^bMean of 10 fruits per plot for two replicates.

^cMean values in a column followed by a different letter are significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Table 2. Sensory analysis for the breeding lines UMH 1422 and UMH 1415 and 'De la Pera' landrace (accession P21) grown in the mesh-covered net house in 2011 in the spring to summer crop cycle.^a

Line cultivar	External appearance ^b	Flavor	Texture	Overall acceptability
UMH 1422	2.7 b ^a	2.2	2.6	2.3
UMH 1415	2.3 a	2.5	2.5	2.4
Accession P21	2.4 a	2.4	2.5	2.4

^aFor sensory analysis, fruits were washed and cut into wedges. The tests were conducted according to the ranking method (Gould, 1983).

^bEach value is the mean of the scores of 42 untrained tasters on a 1 (bad) to 3 (good) scale.

^cEach value in a column followed by a different letter are significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

similar or better agronomic characteristics than the original cultivar P21 (Table 1). UMH 1415 yielded similarly or lower than UMH 1422, whereas the differences with the cultivar P21 depended on the trial. A significant decrease in both titratable acidity and soluble solid content of fruit was found for the breeding lines compared with the landrace, in the three trials, being less marked in the trial performed under the mesh-covered net house in 2011 (Table 1). However, tomato tasting panels composed of untrained tasters found no significant differences between the breeding lines and P21 line for flavor, texture, and overall acceptability, although the panels detected differences for external appearance (Table 2). UMH 1422 received higher scores for external appearance than UMH 1415 and P21, whereas UMH 1415 and P21 showed no significant differences for this trait. Results of sensory analysis indicated similar organoleptic values of the breeding lines and the traditional cultivar, suggesting that the introgressed resistance genes have not reduced significantly fruit organoleptic quality.

Use

UMH 1422 has genetic resistance to ToMV, whereas UMH 1415 has genetic resistance to ToMV and TSWV, viruses that usually affect tomato landrace cultivation in southeastern Spain, especially in open-field conditions. These breeding lines could be useful for tomato cultivation in the spring to summer growing cycle, when the incidence of the diseases caused by TYLCV is less intense, as a result of the low population levels of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Genn.). The reduced linkage drag in these lines is not only evident from the consumer acceptability similar to that of the recurrent landrace, but also from the no decrease in yield. As previous releases produced by our breeding program, UMH 1422 and UMH 1415 are being licensed to a private company to develop F_1 hybrids by crossing them with other landraces and breeding lines to use the genetic resistance in a heterozygous state. In addition, UMH 1422 and UMH 1415 have been incorporated into breeding programs to facilitate the introgression of the resistance genes into several other tomato Spanish landraces.

Availability

Small trial seed samples of the UMH 1422 and UMH 1415 breeding lines are available for research purposes (contact the authors).

Literature Cited

- García-Martínez, S., A. Grau, A. Alonso, F. Rubio, M. Valero, and J.J. Ruiz. 2011. UMH 1200, a breeding line within the Muchamiel tomato type resistant to three viruses. *HortScience* 46:1054-1055.
- 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* 47:1-2.
- Gould, W.A. 1983. Tomato production, processing and quality evaluation. 2nd Ed. AVI Publ., Westport, CT.
- 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.
- Ruiz, J.J., S. García-Martínez, B. Picó, M. Gao, and C.F. Quiros. 2005. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130:88-94.
- Tanksley, S.D., D. Bernachi, T. BeckBarn, 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 *Tm-2^e* gene for resistance to the Tobacco mosaic virus. *Euphytica* 99:77-83.



Análisis de la variabilidad del material vegetal

- 3.2.4.-García-Martínez, S., Nazario, L., Alonso, A., Agulló, E., **Rubio, F.**, Moral, R., Ruiz, J.J. (2011). Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: quick estimation by near-infrared reflectance (NIRS). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **92**(6),1178-1185.



Research Article



Received: 20 April 2011

Revised: 31 July 2011

Accepted: 22 August 2011

Published online in Wiley Online Library: 26 September 2011

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.4661

Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: quick estimation by near infrared reflectance spectroscopy

Santiago García-Martínez,^a Luis N Gálvez-Sola,^b Arantxa Alonso,^a Enrique Agulló,^b Fernando Rubio,^a Juan J Ruiz^{a*} and Raúl Moral^b

Abstract

BACKGROUND: Several tomato landraces are very popular in south-eastern Spain for their organoleptic fruit quality, but these cultivars are highly susceptible to several viruses. A breeding programme is being carried out for the introduction of virus resistances into these landraces. In the last steps of our breeding programme a high number of breeding lines must be evaluated for agronomic and organoleptic quality parameters. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology shows considerable promise and is ideally suited to the requirements of breeders.

RESULTS: Significant differences between a set of 35 tomato breeding lines, seven landraces and one commercial hybrid were observed for quality and mineral content parameters, suggesting that there are considerable levels of genetic diversity between the cultivar groups studied. Using NIRS on dry samples of tomato constitutes a feasible technique to estimate the content of several minerals (C, N, P, K, Ca, Na, Mn, Mg and Cu) according to the coefficient of determination for calibration ($R^2 > 0.90$). NIRS estimations of soluble solids content and titratable acidity obtained were considered useful only for general screening purposes.

CONCLUSIONS: NIRS technology may be a useful tool in the selection of lines coming out of tomato breeding programs, allowing a quick estimation of mineral content. However, the estimation of soluble solids content and titratable acidity by NIRS must be improved.

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: tomato quality; traditional cultivars; organoleptic quality; NIRS

INTRODUCTION

In the last few years, there have been a growing number of scientific publications related to functional-attribute measurement in tomato, but literature dealing with the evaluation of tomato fruit micronutrient content is rather scarce.^{1–4} As a result, recent breeding programmes in tomato have been focusing on organoleptic and nutrient quality. In addition, it is known that inadequate consumption of essential nutrients (at least 49 nutrients for human metabolic needs) may result in adverse metabolic disturbances that may lead to sickness, poor health or impaired development in children.^{5,6} Several epidemiological studies have indicated the beneficial effects of tomato consumption in the prevention of several major chronic diseases, such as certain types of cancer and cardiovascular diseases.⁷ As tomatoes can be consumed both raw or after processing, they can provide a significant proportion of total antioxidants in the diet, including ascorbic acid, α -tocopherols, carotenes and a wide variety of phenolic compounds.⁸

'Muchamiel', 'De la Pera', 'Morunos', 'Cherry', 'Valencianos' and 'Flor de Baladre' are very popular tomato landraces in south-eastern Spain for their organoleptic fruit quality, and are still cultivated by local farmers in small fields. However, these landraces

are severely endangered and at risk of extinction since they are highly susceptible to several viruses.⁹ A breeding programme was carried out for the introduction of three dominant genes (*Tm-2²*, *Sw-5* and *Ty-1*, derived from wild tomato relatives) that confer resistance to the three most relevant viruses in south-eastern Spain (ToMV, TSWV and TYLCV, respectively) into traditional 'Muchamiel', 'De la Pera', 'Pera Morunos' and 'Cherry' cultivars.¹⁰ As a preliminary result of the breeding programme, we have obtained promising breeding lines, which have to be further adapted to the specific agro-climatic conditions of different localities.¹¹

* Correspondence to: Juan J Ruiz, Departamento Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, km 3,2. 03312-Orihuela, Alicante, Spain. E-mail: juanj.ruiz@umh.es

a Departamento Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, km 3,2. 03312-Orihuela, Alicante, Spain

b Departamento Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, km 3,2. 03312-Orihuela, Alicante, Spain



In the last steps of our breeding programme, a large number of breeding lines had to be evaluated for agronomic (virus resistance, average fruit weight and yield) and organoleptic quality parameters. Organoleptic quality involves fruit taste, aroma, colour and texture.¹² Breeding for organoleptic quality has been severely restricted by the lack of efficient criteria and by the polygenic nature of the traits. One of the current preoccupations of tomato breeders is to associate high fruit firmness, long shelf life, good flavour and the existence of multiple disease resistance genes within the same variety. The measurement of quality parameters using traditional analytical methods is time-consuming, costly, destructive and requires the use of chemical reagents that become hazardous wastes that need special management. The development of rapid, simple, low-cost, non-contaminating and non-invasive quality-analysis techniques should be regarded as crucial for tomato breeders. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology shows considerable promise for the non-destructive analysis of food products, and is ideally suited to the requirements of breeders: it requires little or no sample preparation, measurements take less than 1 min for all the studied parameters, without any cost associated to chemicals or technical gases, being a technique that reduces to zero the analytical wastes associated to chemical analysis, exhausted reagents and gas emissions; it is both flexible and versatile, and it can be used in the last steps of the programmes.^{13,14} Several studies have looked into the potential of NIRS technology for assessing internal quality parameters in tomatoes,^{15–19} although to date there have been no studies of traditional Spanish cultivars. Most research has centred on soluble solids content (SSC) or acidity (pH), but little work has been done on titratable acidity and especially mineral content, which is also a key element in tomato selection.¹⁶ To our knowledge, no other study using NIRS to estimate tomato fruit mineral content has been published. This study is focused on the assessment of the quality and mineral content of tomato landraces and virus-resistant breeding lines. In addition, the feasibility of NIRS to evaluate these parameters in tomato fruits was established.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and crop conditions

A set of 35 tomato (*Solanum lycopersicum* L.) breeding lines, seven landraces and one commercial hybrid (Boludo F₁ hybrid from Seminis Iberica Seeds) were studied (Table 1). Breeding lines derived from our breeding programme have ToMV, TYLCV and TSWV genetic resistance genes in genetic backgrounds of the 'Muchamiel', 'De la Pera', 'Pera morenos' and 'Cherry' cultivar types, all of which are very popular tomato landraces in the south-east of Spain. The breeding lines have been obtained by back-crossing, varying the number of back-crosses between six and eight, depending on the type of landrace. A field trial was carried out from April to August 2009, in a field at the Experimental Farm located on the campus of Miguel Hernández University in Orihuela, Alicante (Spain). A randomised block design with three replicates and seven to ten plants per plot was used. The plants were grown vertically with one stem, with a density of 2.7 plants m⁻². All plants (20–30 plants per line) received the same irrigation and quantity of fertiliser (350 N, 130 P₂O₅, 500 K₂O kg ha⁻¹) using a drip fertigation system.

Quality and mineral parameters

At commercial harvesting state (>50% of the surface showing red colour), 30 representative fruits of each line were harvested by

Cultivar type	Group	Cultivar and line names
Muchamiel	Landraces	Much4, Much18 and Much29
	Breeding lines	AU620, AU621, AU966, AU967, AU975, AU977, AU1091, AU1092, AU1093 and AU1094
De la pera	Landraces	Pera7, Pera19 and Pera21
	Breeding lines	AU638, AU640, AU690, AU968, AU970, AU971, AU972, AU973, AU974, AU986, AU993, AU1043, AU1052, AU1058, AU1060 and AU1066
Pera moruno	Breeding lines	AU627, AU987 and AU988
Cherry	Landrace	Cherry
	Breeding lines	AU1068, AU1073, AU1076, AU1077, AU1080 and AU1085
Commercial hybrid	(1)	Boludo F ₁

hand. For the fruit quality parameters SSC and titratable acidity (TA) two opposite slices from each fruit were homogenised, and the filtered juice was used for determinations. SSC was estimated using a digital refractometer (Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan), and the results were expressed in °Brix. TA was measured by potentiometric titration with 0.1 mol L⁻¹ NaOH up to pH 8.1 using 1 mL of juice, and expressed as the percentage of citric acid in the juice or g 100 g⁻¹. For fruit mineral content, the rest of each fruit sample was dried at 105 °C, ground and stored prior to analysis. Total organic carbon and total nitrogen were determined by dry combustion at 950 °C using a Leco TruSpec C–N Elemental Analyzer (Leco Corp., St Joseph, MI, USA) according to Navarro *et al.*²⁰ and Paredes *et al.*²¹ After HNO₃/HClO₄ digestion, phosphorus content was assessed colorimetrically as molybdovanadate phosphoric acid²² and K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn and Zn contents were determined by optical emission-inductively coupled plasma (OE-ICP) spectroscopy. All analytical determinations were done in quadruplicate. Since both the differences between landraces of the same type and the differences between the breeding lines of the same type were small, the data from quality parameters and mineral content were subjected to a one-way analysis of variance, grouping the landraces and breeding lines by cultivar type. The Duncan test was used for mean separation.

Analysis by near infrared spectroscopy

Dry ground fruit samples were used for NIRS analysis. Water has an absorption band in the near infrared region at 7500–6400 and 5400–4900 cm⁻¹. So, the water content of the sample can modify the obtained absorbance spectra, over-estimating the real absorbance value and affecting the final accuracy of the obtained prediction model. NIRS analyses were performed using a Fourier transform (FT)-NIR spectrometer (MPA, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) with wavenumbers in the range of 12 000 to 3800 cm⁻¹ (830–2600 nm) with steps of 8 cm⁻¹. Each sample was scanned three times using Opus software (version 6, ©Bruker Optik), recording absorbance as log(1/R), where R is reflectance, and averaging the three spectra. Figure 1 shows the NIRS spectra of dry ground tomato fruit samples. Calibration was carried out using a partial least squares regression model and the validation step was carried out using the full cross-validation method, following the leave-one-out procedure. This method was used to ensure the predictive ability and to avoid any over-fitting of the data.²³ All the pre-

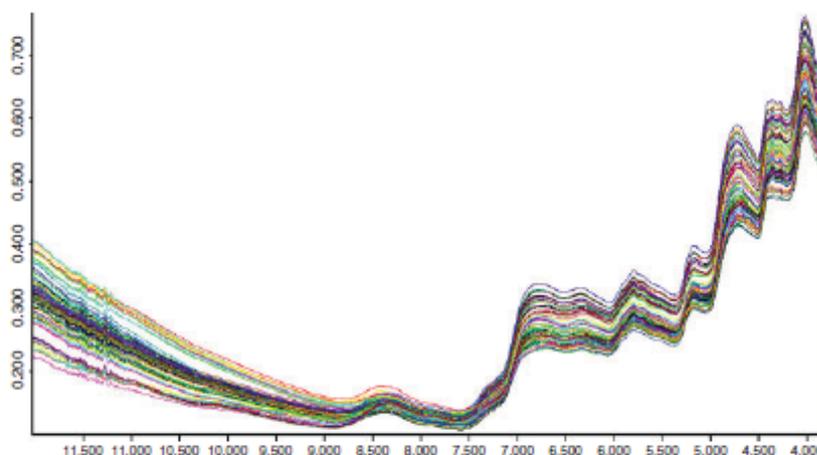


Figure 1. Typical $\log(1/R)$ spectra for dry ground tomato fruit samples [wave number (cm^{-1})] in abscissa and absorbance in ordinate.

diction residuals were combined to compute the validation residual variance and root mean square error of cross-validation (RMSECV). To ensure a good correlation between the spectral data and the concentration values, different spectra pre-treatments were tested, such as vector normalisation, which normalises a spectrum by an initial calculation of the average intensity value, which was subsequently subtracted from the spectrum. Next, the sum of the squared intensities was calculated and the spectrum was divided by the square root of this sum; min-max normalisation, in which a linear offset was first subtracted, and then the y-maximum was set to a value of 2 by multiplication by a constant. Multiplicative scatter correction, similar to vector normalisation, was used by performing a linear transformation of each spectrum to best match the mean spectrum of the whole set; first derivative, which calculates the first derivative of the spectrum. This method emphasises steep edges as a peak. It is used to emphasise pronounced, but small features over a broad background. Spectral noise was enhanced, and straight line subtraction was also used, fitting a straight line to the spectrum and subtracting it. This accounts for a tilt in the recorded spectrum.

To evaluate the estimation, several statistical parameters were performed: R^2 , the coefficient of determination for calibration; the root mean square error of estimation (RMSEE); the ratio of prediction to deviation (RPD), calculated as the standard deviation divided by the standard error of prediction; the number of factors, F ; the coefficient of determination for validation, r^2 ; the root mean square error of cross validation, RMSECV; and bias, the difference between the real mean value and the estimated mean value for the validation set samples. Malley *et al.*²⁴ suggested a guideline for describing the performance of calibrations for environmental samples as follows: for excellent calibrations $R^2 > 0.95$, RPD > 4 ; for successful calibrations, $R^2 = 0.9-0.95$, RPD 3-4; moderately successful, $R^2 = 0.8-0.9$, RPD 2.25-3; and moderately useful, $R^2 = 0.7-0.8$, RPD 1.75-2.25. Some calibrations with $R^2 < 0.7$ may be useful for screening purposes. This guideline was used to evaluate the calibrations in the present work.

RESULTS AND DISCUSSION

Variations in the studied parameters

Some recent studies describe the mineral content of tomato fruit,¹⁻⁴ but there are no studies reporting the effect of genetic

Table 2. Concentration range, mean value and standard deviation for the different quality parameters and mineral content studied

Parameter	Range	Mean	SD
SSC ($^{\circ}$ Brix)	4.06-5.69	4.80	0.38
TA ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	0.36-0.78	0.54	0.10
C ($\text{g } \text{kg}^{-1}$)	410-465	437	11
N ($\text{g } \text{kg}^{-1}$)	20.2-43.8	28.1	4.9
P ($\text{g } \text{kg}^{-1}$)	2.54-6.61	4.39	0.92
K ($\text{g } \text{kg}^{-1}$)	11.1-87.4	36.4	15.7
Ca ($\text{g } \text{kg}^{-1}$)	0.98-6.23	2.39	1.08
Mg ($\text{g } \text{kg}^{-1}$)	0.59-3.35	1.70	0.58
Na ($\text{g } \text{kg}^{-1}$)	0.28-1.63	0.93	0.37
Fe ($\text{mg } \text{kg}^{-1}$)	7.2-100.6	33.5	18.1
Cu ($\text{mg } \text{kg}^{-1}$)	2.3-17.7	7.96	3.9
Mn ($\text{mg } \text{kg}^{-1}$)	2.3-20.9	9.4	4.2
Zn ($\text{mg } \text{kg}^{-1}$)	17.4-69.1	39.5	9.9

introgressions for virus resistance on the mineral content of tomato fruit. Table 2 shows the concentration range, mean value and standard deviation for the different parameters studied. Wide variation was observed in all the evaluated attributes, probably due to the wide genetic basis of the tested tomato genotypes. For all the parameters, the obtained range was consistent with previous reports.¹⁻⁴ However, for SSC and TA, the main components responsible for tomato flavour, Guillén *et al.*²⁵ reported the highest values for commercial 'Cherry' and 'Ra' (a traditional cultivar from Vega de Almería, Spain). Potassium content in tomato fruit ranged between 11.07 and 87.35 $\text{g } \text{kg}^{-1}$. Tomato fruits are considered a rich source of K.²⁶

The ANOVA showed significant differences among cultivar types ($P < 0.001$) for all the studied parameters, both quality parameters and mineral content (Table 3), suggesting that there are considerable levels of genetic diversity between the cultivar groups studied. The range of values obtained for the studied parameters was consistent with previous data reported for traditional cultivars and lines derived from our breeding programme,^{2,3,27,28} as well as with other results reported for different traditional and commercial cultivars.^{1,25} Important



Table 3. Quality parameters and mineral content of the landraces and breeding lines, grouped by type of landrace and type of breeding line

Line	Parameter												
	SSC (°Brix)	TA (g 100 g ⁻¹)	C (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	P (g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)	Ca (g kg ⁻¹)	Mg (g kg ⁻¹)	Na (g kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
Muchamiel landraces	4.4 ^b	0.54 ^{bc}	44.2 ^c	27.1 ^{bc}	4.39 ^b	30.3 ^a	3.55 ^d	1.90 ^{bc}	1.37 ^d	31.5 ^{ab}	6.3 ^b	9.8 ^b	52.5 ^d
Muchamiel breeding lines	4.4 ^b	0.58 ^{cd}	44.1 ^c	29.1 ^c	4.63 ^b	24.5 ^a	1.74 ^d	1.28 ^b	0.73 ^b	25.8 ^a	5.5 ^a	6.2 ^a	36.7 ^{ab}
De la peralandraces	4.9 ^b	0.50 ^b	42.5 ^a	24.3 ^{bc}	3.48 ^a	44.9 ^b	1.81 ^d	1.73 ^b	0.99 ^c	42.4 ^{bc}	9.1 ^b	12.8 ^{cd}	37.9 ^{abc}
De la pera breeding lines	4.8 ^b	0.48 ^b	42.4 ^a	29.2 ^c	4.24 ^b	58.4 ^c	2.80 ^{bc}	2.27 ^c	1.19 ^{cd}	43.6 ^{bc}	12.0 ^{cd}	14.2 ^d	40.8 ^{bc}
Pera Moreno breeding lines	4.8 ^b	0.44 ^a	42.9 ^b	20.7 ^a	3.50 ^a	43.9 ^b	1.89 ^d	1.67 ^b	0.76 ^b	33.9 ^{ab}	10.4 ^{bc}	9.9 ^b	32.6 ^a
Cherry landraces	5.7 ^d	0.72 ^c	43.8 ^{bc}	22.3 ^b	4.02 ^b	43.6 ^b	2.26 ^b	1.81 ^d	0.49 ^a	42.0 ^{bc}	12.8 ^{cd}	11.5 ^{bc}	40.9 ^{bc}
Cherry breeding lines	5.2 ^c	0.74 ^b	44.4 ^c	25.9 ^{cd}	4.67 ^b	47.4 ^b	2.59 ^{cd}	2.00 ^{bc}	0.59 ^{bc}	55.2 ^c	14.2 ^d	13.6 ^{cd}	44.1 ^c
Hybrid	5.2 ^c	0.62 ^d	44.2 ^c	26.6 ^{cd}	4.13 ^b	49.1 ^b	3.18 ^{cd}	2.29 ^c	1.02 ^a	43.8 ^{bc}	11.2 ^{bcd}	13.1 ^{cd}	38.9 ^{abc}
ANOVA significance	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

*** Significant F ratio at $P < 0.001$. Means within a column followed by the same letter are not different at $P < 0.05$ (Duncan test).

differences were found for SSC among all cultivar types. 'Cherry' landrace, 'Cherry' breeding lines and 'Boludo' hybrid showed the highest content (5.7 °Brix, 5.2 °Brix and 5.2 °Brix, respectively). The lowest SSC contents were found in 'Muchamiel' landraces and 'Muchamiel' breeding lines (4.4 °Brix). Similar differences between cultivars and values have been previously reported.^{1,2,25} Titratable acidity varied from 0.44 to 0.75 g 100 g⁻¹. 'Cherry' breeding lines and the 'Cherry' landrace showed the highest values, as in other studies with different cultivar types.²⁵ For C concentration, there were moderate differences among cultivar types, with values ranging between 424 and 444 g kg⁻¹. The group of 'De la Pera' cultivars ('Pera' and 'Pera moruno' breeding lines and landraces) had the lowest C content. 'De la Pera' and breeding 'Pera Moreno' showed the lowest P content, and breeding 'Cherry' and breeding 'Muchamiel' the highest, although overall the differences were not very significant. For K concentration, there were huge differences among cultivar types, with values ranging between 24.5 and 58.4 g kg⁻¹. 'Muchamiel' breeding lines and landraces showed the lowest content, and 'De la Pera' breeding lines the highest.

Duncan's multiple-range tests detected significant differences between cultivar groups for Ca content, ranging from 1.74 g kg⁻¹ for 'Muchamiel' breeding lines to 3.55 for 'Muchamiel' landraces. Differences between landraces and breeding lines were also found for 'De la Pera' and 'Cherry' groups. 'Muchamiel' breeding lines showed the lowest Mg content, with 1.28 g kg⁻¹, whereas 'Boludo' hybrid showed the highest content, with 2.29 g kg⁻¹. For Na content, landrace and 'Cherry' breeding lines showed the lowest value, and 'Muchamiel' landraces the highest. Ruiz *et al.*³ also reported the highest Na content for 'Muchamiel' landraces.

Important differences in Fe concentration were found, ranging from 25.8 mg kg⁻¹ for 'Muchamiel' breeding lines to 55.2 for 'Cherry' breeding lines. Values reported by other authors ranged from 6.1 to 17.7 mg kg⁻¹ for Indian landraces,⁴ and from 9.1 to 77.5 mg kg⁻¹ for Spanish landraces.² For Cu concentration, 'Muchamiel' breeding lines and landraces showed the lowest content, with 5.5 and 6.3 mg kg⁻¹, respectively. This result was also observed for SSC and K, and these three parameters were highly correlated (Table 4). 'Cherry' breeding lines, with 14.2 mg kg⁻¹, showed the highest value. Mn content varied between 6.2 mg kg⁻¹ for 'Muchamiel' breeding lines and 14.2 mg kg⁻¹ for 'De la Pera' breeding lines. This range of values is consistent with that obtained by Ruiz *et al.*,² studying Spanish landraces, but clearly different to that reported by Saha *et al.*⁴ studying Indian landraces (1.08–1.97 mg kg⁻¹). This result suggests that there are considerable differences among these landraces for Mn content. Duncan's multiple-range tests detected significant differences between cultivar groups for Zn content, ranging from 37.9 mg kg⁻¹ for 'De la Pera' landraces to 52.5 mg kg⁻¹ for 'Muchamiel' landraces.

In spite of the six to eight back-crosses performed in the breeding programme, significant differences were found for some parameters between the landrace group and their corresponding breeding lines with genetic resistances. However, we can not confirm that these differences were due to the introgression of the three resistant genes, since the possible effect of the introgressions would be different depending on the landrace group. For example, 'Muchamiel' breeding lines showed lower Ca content than 'Muchamiel' landraces, but the opposite effect was true for 'De la Pera' groups, with a Ca content higher in the breeding lines.

Since the differences between breeding lines of the same type were also important for most parameters (data not shown), mineral content measurements could be useful to assist in the selection of a particular breeding line at the end of the breeding



Table 4. Correlation coefficients of quality parameters and mineral content

Parameter	TA	C	N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Mn	Zn
SSC	0.270 ^a	0.049	-0.106	-0.124	0.445 ^{***}	0.249	0.446 ^{***}	0.117	0.569 ^{***}	0.592 ^{***}	0.472 ^{***}	0.224
TA	-	0.491 ^{***}	-0.238	0.053	-0.319 ^a	-0.139	-0.219	-0.491 ^{***}	0.085	0.080	-0.168	0.038
C	-	-	-0.046	0.207	-0.569 ^{***}	-0.089	-0.356 ^{**}	-0.305 ^a	-0.106	-0.429 ^{**}	-0.326 ^a	0.039
N	-	-	-	0.809 ^{***}	0.373 ^{**}	0.508 ^{***}	0.517 ^{***}	0.328 ^a	0.323 ^a	0.195	0.389 ^{**}	0.511 ^{***}
P	-	-	-	-	0.146	0.487 ^{***}	0.338 ^a	-0.001	0.250	0.155	0.247	0.450 ^{***}
K	-	-	-	-	-	0.542 ^{***}	0.882 ^{***}	0.525 ^{***}	0.700 ^{***}	0.806 ^{***}	0.837 ^{***}	0.4276 ^{**}
Ca	-	-	-	-	-	-	0.775 ^{***}	0.564 ^{***}	0.529 ^{***}	0.465 ^{***}	0.639 ^{***}	0.703 ^{***}
Mg	-	-	-	-	-	-	-	0.662 ^{***}	0.711 ^{***}	0.766 ^{***}	0.889 ^{***}	0.698 ^{***}
Na	-	-	-	-	-	-	-	-	0.215	0.258	0.527 ^{***}	0.519 ^{***}
Fe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.742 ^{***}	0.772 ^{***}	0.556 ^{***}
Cu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.774 ^{***}	0.455 ^{***}
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.589 ^{***}

^a, ^{**}, ^{***} Significant at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

Table 5. NIRS calibration and validation results for parameters analysed

Parameter	Calibration			Validation				Factors	Spectrum region (cm ⁻¹)	Pre-treatment
	R ²	RMSEE	RPD	r ²	RMSECV	RPD	Bias			
C (g kg ⁻¹)	0.966	2.37	5.44	0.914	3.46	3.42	-0.103	18	7502-4247 7502-6098	FD + MSC
N (g kg ⁻¹)	0.951	1.12	4.53	0.94	1.19	4.11	-0.0016	6	5450-4598 11 996-7498	FD + VN
P (g kg ⁻¹)	0.982	0.13	7.62	0.841	0.36	2.51	-0.0062	15	5450-4598 11 996-7498	-
K (g kg ⁻¹)	0.95	3.69	4.48	0.865	5.74	2.73	-0.0151	11	5450-4598	VN
Ca (g kg ⁻¹)	0.958	0.23	4.89	0.886	0.36	2.97	-0.0028	12	7502-4598 11 996-7498	MSC
Mg (g kg ⁻¹)	0.943	0.15	4.19	0.84	0.23	2.51	0.0023	11	6102-5446	SLS
Na (g kg ⁻¹)	0.952	0.09	4.59	0.768	0.18	2.08	-0.0008	13	11 996-5446	N _{min-max}
Fe (mg kg ⁻¹)	0.832	7.82	2.44	0.41	13.8	1.3	0.0755	12	11 996-4598 11 996-7498	MSC
Cu (mg kg ⁻¹)	0.94	0.99	4.08	0.87	1.39	2.78	0.0379	9	6102-5774 11 996-7498	N _{min-max}
Mn (mg kg ⁻¹)	0.973	0.72	6.14	0.904	1.29	3.24	0.0092	12	6102-5446 9747-7498	N _{min-max}
Zn (mg kg ⁻¹)	0.888	3.61	3	0.681	5.62	1.77	-0.0522	17	5450-4598 11 996-7498	-
SSC (°Brix)	0.616	0.28	1.61	0.456	0.32	1.36	-0.007	8	4602-4247	-
TA (g 100 g ⁻¹)	0.483	0.08	1.39	0.435	0.08	1.33	0.0016	4	11 996-4247	FD + SLS

R², coefficient of determination for calibration; RMSEE, root mean square error of estimation; RPD, calculated as the standard deviation divided by the standard error of prediction.

r², coefficient of determination for validation; RMSECV, root mean square error of cross validation; Bias, the difference between the mean real value and the mean estimated value for the validation set samples.

Pre-treatment: VN, vector normalisation; MSC, multiplicative scatter correction; FD, first derivative; SLS, straight line subtraction; N_{min-max}, min-max normalisation.

cycle. Similarity with the original landraces could be used as criteria of selection, but other criteria could be adopted; for example, lines might be selected for their high or low content in a particular mineral, depending on its nutrient significance.

Correlations between quality parameters and mineral content

Table 4 shows the correlations involving the studied parameters. Generally, tomato quality is measured by colour (related to

lycopene content) and soluble solids content and acidity (SSC and TA, respectively). We also found a positive correlation between SSC and TA ($r = 0.27$; $P < 0.05$). SSC was positively correlated with K, Mg, Fe, Cu and Mn. Correlations found for TA were lower; only one positive correlation was detected with C and two negative correlations with K and Na. Carbon was the only mineral for which all the significant correlations found were negative (K, Mg, Na, Cu and Mn). Nitrogen was positively correlated with all

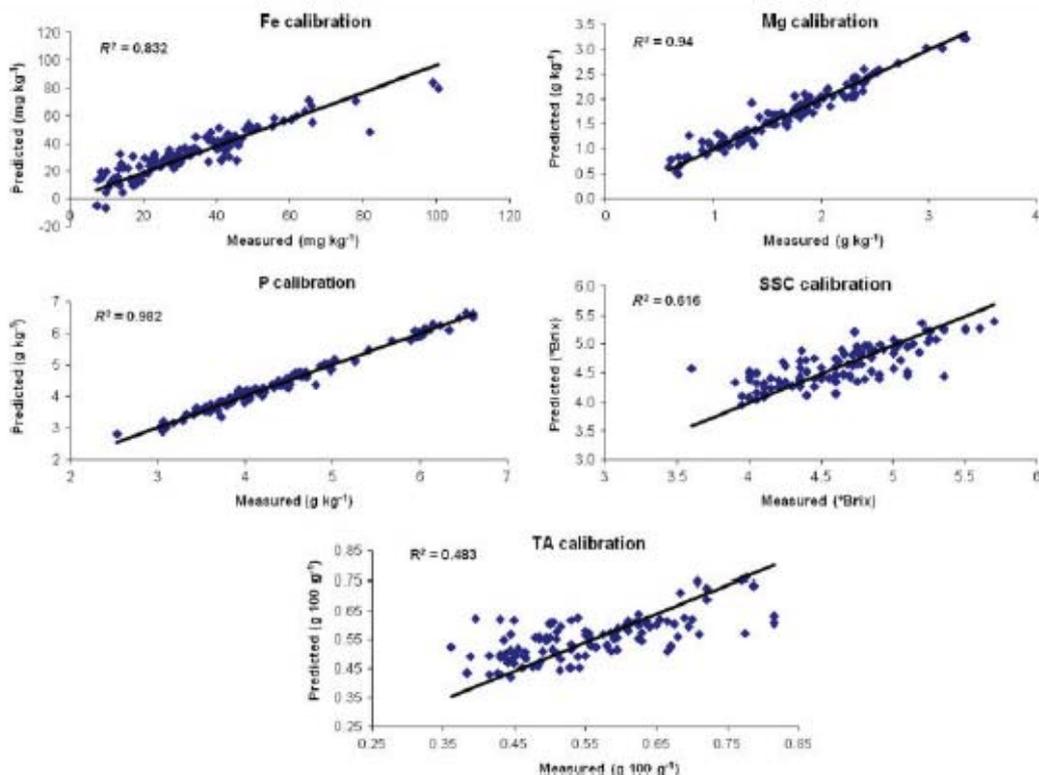


Figure 2. NIRS calibration plots between predicted values and measured values for P, Mg, Fe, SSC and TA.

the minerals, except with C and Cu, where the correlation was not significant, whereas P was positively correlated with N, Ca, Mg and Zn. Potassium was positively correlated with all the minerals, except with P, much like Mn. Similarly, Ca and Zn were positively correlated with all the minerals, except with C. Magnesium is the only mineral correlated with all the others. The highest value of R was reached between Mg and Mn. Na, Fe and Mn were correlated with eight of the 11 analysed minerals. Ruiz *et al.*² also reported positive correlations between SSC and TA ($r = 0.43, P < 0.001$), as well as for Cu, Mn and Zn. For these three minerals, these authors found basically the same correlation values ($r = 0.75$ between Cu and Mn; $r = 0.45$ between Cu and Zn; $r = 0.62$ between Mn and Zn) as in this work, studying only hybrids and landraces. However, correlation values obtained in this study between quality parameters and minerals (SSC–Fe; SSC–Cu; SSC–Zn; TA–P; TA–K; TA–Cu; TA–Zn), as well as for several other minerals (P–K; K–Na; Fe–Cu; Fe–Mn; Fe–Zn), do not agree with those found by Ruiz *et al.*²

Estimation of quality parameters and mineral content by near infrared spectroscopy

Typical $\log(1/R)$ spectra for dry ground tomato fruits, captured by the FT-NIR spectrometer, together with the most relevant absorption bands, are shown in Fig. 1. Pre-treatment of spectral data is very important in order to fully or partially eliminate the systematic error that can be caused by various factors. Table 5 shows the pre-treatment methods. First derivative, multiplicative scatter correction and Straight line subtraction were the most

used, in three parameters each. In three parameters (C, N and TA), two combined pre-treatments were used, whereas for P, Zn and SSC no pre-treatment was used. For the calibrations, a lower RMSECV and a higher R^2 are considered better and more accurate.²⁹ Moreover, lower RMSECV and higher r^2 and RPD values indicate the validation precision of the calibration model. In addition, the spectral range considered in the calibrations for parameters varied from $11\,996\text{ cm}^{-1}$ to 4247 cm^{-1} , but the spectral range can change depending on the pre-treatment used in each parameter. For eight parameters, two spectrum regions were used, whereas for five only one spectrum region was used.

Calibrations for C, N, P and Mn were the best obtained (Table 5) because of the high coefficient of determination (higher than 0.95) and low error in the calibration process, so the accuracy obtained for these parameters was reliable. For K, Ca and Na, with coefficients of determination equal to or higher than 0.95, it is necessary to improve the results of the cross-validation process, because the RMSECV was not low. As a result, it is necessary to modify the samples of the calibration set either for a more narrow concentration range or with lower standard deviation of this element. For Mg and Cu, the calibrations were good. The values of the RMSECV for each parameter were acceptable, especially for Mg, with error levels similar to those of classical laboratory analysis. Calibrations for Zn and Fe were moderately good. The R^2 of 0.888 for Zn and 0.832 for Fe, and the RMSECV for each parameter in the cross-validation process was not too low, but acceptable for monitoring purposes. Results for Zn could be improved by modifying



the calibration set in the same way that was suggested for K, Ca and Na. An example of the calibration plots between measured and predicted values for several parameters are shown in Fig. 2.

Calibration results for SSC and TA were not successful because of the low determination coefficient (0.616 and 0.483, respectively) and high estimation error (1.61 and 1.39, respectively), in line with the validation, with r^2 values of 0.456 and 0.435, respectively. This result is due to the fact that SSC and TA were measured in the filtered fruit, but NIRS was performed in the ground dry fruit. Other studies of SSC prediction in tomatoes using NIRS technology report disparate findings, with r^2 values ranging from 0.49 to 0.97.^{15–19} Flores et al.,³⁰ measuring intact tomato fruits, found r^2 values of 0.77 for SSC and 0.67 for TA, using a new-generation instrument which can be adapted for on-site analysis. This type of instrument may be very useful, allowing the study of large quantities of fruits in short periods of time, as this activity is very frequent even up to the last stages of breeding programs. Sugars and total acid content are key components of flavour,³¹ but even for sugar and acids, additional information is still required regarding the optimal ranges and ratios required for good flavour.³² Some studies point to total sugar and acid content as critical to fresh tomato flavour, whereas others emphasise the importance of a balance of soluble solids and titratable acidity. One study suggests that consumer acceptability increases with increasing sugar concentration but that there is an optimal level of acidity.³³

According to the guideline mentioned in Materials and Methods,²⁴ the NIRS calibrations obtained for C, N, P, K, Ca, Na and Mn were excellent, for Mg and Cu they were successful, and for Zn and Fe they were moderately successful. However, NIRS calibrations for SSC and TA may be useful only for screening purposes.

CONCLUSIONS

Significant variations were observed in quality parameters and mineral content, suggesting that there are considerable levels of genetic diversity between the cultivar types studied. The results showed that using NIRS on dry samples of tomato constitutes a feasible technique to estimate C, N, P, K, Ca, Na, Mn, Mg and Cu contents, using partial least squares regression, with a coefficient of determination for calibration values (R^2) higher than 0.90. We have used NIRS technology in order to estimate mineral content of our breeding lines at the end of the breeding cycle. Our results suggest that NIRS could also be used in the selection of lines during a breeding programme, an issue that we will try to address in our future breeding work. Estimation of SSC and TA obtained using dry samples of tomato may be useful only for screening purposes. More research must be done on NIRS analysis using dry samples, fresh samples and intact tomatoes, in order to improve the estimation of SSC and TA.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank J.M. Sánchez and C. Ballester for assisting in analysis. The authors would also like to thank A. Grau for crop practices. This work has been supported by the Spanish MICINN (CICYT CTM2006-01363/TECNO and AGL2008-03822/AGR).

REFERENCES

1 Gómez R, Costa J, Amo M, Alvarruiz A, Picazo M and Pardo JE. Physicochemical and colorimetric evaluation of local varieties of tomato grown in SE Spain. *J Sci Food Agric* **81**:1101–1105 (2001).

2 Ruiz JJ, Martínez N, Valero M, García-Martínez S, Moral R and Serrano M. Micronutrient composition and quality characteristics of traditional tomato cultivars in the South-East of Spain. *Commun Soil Sci Plant Anal* **36**:649–660 (2005).

3 Ruiz JJ, Valero M, García-Martínez S, Serrano M and Moral R. Effect of recent genetic improvement on some analytical parameters of tomato fruit quality. *Commun Soil Sci Plant Anal* **37**:2647–2658 (2006).

4 Saha S, Hedau NK, Mahajan V, Singh G, Gupta HS and Gahalain A. Textural, nutritional and functional attributes in tomato genotypes for breeding better quality varieties. *J Sci Food Agric* **90**:239–244 (2010).

5 Ramakrishnan U, Manjrekar R, Rivera J, Gonzales-Cossio T and Martorell R. Micronutrients and pregnancy outcome: A review of the literature. *Nutr Res* **19**:103–159 (1999).

6 Branca F and Ferrari M. Impact of micronutrient deficiencies on growth: The stunting syndrome. *Ann Nutr Metab* **46**:8–17 (2002).

7 Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* **91**:317–331 (1999).

8 Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G and Chesson A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Sci Food Agric* **82**:323–330 (2002).

9 Picó B, Herraiz J, Ruiz JJ and Nuez F. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Sci Hort* **94**:73–89 (2002).

10 Ruiz JJ and 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 number 15, ed. by Veteläinen M, Negri V and Maxted N. Bioversity, Rome, pp. 171–176 (2009).

11 García-Martínez S, Alonso A, Rubio F, Valero M and Ruiz JJ. Simultaneous introgression of three resistance genes into tomato landraces using marker-assisted selection: Results of a breeding program. In *Plant Genomics European Meeting Proceedings*, 4–7 May 2011, Plant GEM, Istanbul, (2011).

12 Baldwin EA, Scott JW, Einstein MA, Malundo TMM, Carr BT, Shewfelt RL, et al. Relationships between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *J Am Soc Hort Sci* **123**:906–915 (1998).

13 Osborne BG, Fearn T and Hindle PH. Practical NIR spectroscopy with applications, in *Food and Beverage Analysis*, ed. by Osborne BG, Fearn T and Hindle PH. Longman, Harlow, pp. 11–35 (1993).

14 Shenk JS and Westerhaus MO. *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. NIR Systems, Silver Spring, Maryland, USA, (1995).

15 Slaughter DC, Barrett D and Boersig M. Nondestructive determination of soluble solids in tomatoes using near infrared spectroscopy. *J Food Sci* **61**:695–697 (1996).

16 Hong TL and Tsou SCS. Determination of tomato quality by near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc* **6**:321–324 (1998).

17 Walsh KB, Golic M and Greensill CV. Sorting of fruit using near infrared spectroscopy: Application to a range of fruit and vegetables for soluble solids and dry matter content. *J Near Infrared Spectrosc* **12**:141–148 (2004).

18 He Y, Zhang Y, Pereira AG, Gómez AH and Wang J. Nondestructive determination of tomato fruit quality characteristics using VIS/NIR spectroscopy technique. *Int J Inf Technol* **11**:97–108 (2005).

19 Shao Y, He Y, Gómez AH, Pereira AG, Qiu Z and Zhang Y. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicon esculentum*) quality characteristics. *J Food Eng* **81**:672–678 (2007).

20 Navarro AF, Cegarra J, Roig A and Bernal MP. An automatic microanalysis method for the determination of organic carbon in wastes. *Commun Soil Sci Plant Anal* **22**:2137–2144 (1991).

21 Paredes C, Bernal MP, Roig A, Cegarra J and Sánchez-Monedero MA. Influence of the bulking agent on the degradation of olive-mill wastewater sludge during composting. *Int Biodeterior Biodegrad* **38**:205–210 (1996).

22 Kitson RE and Mellon MG. Colorimetric determination of P as molybdovanadate phosphoric acid. *Ind Eng Chem Anal Ed* **16**:379–383 (1944).

23 Martens H and Næs T. *Multivariate Calibration*. Wiley & Sons, New York, p. 419 (1989).

24 Malley DF, McClure C, Martin PD, Buckley K and McCaughey WP. Compositional analysis of cattle manure during composting using



- a field-portable near-infrared spectrometer. *Commun Soil Sci Plant Anal* **36**:455–475 (2005).
- 25 Guillén F, Castillo S, Zapata PJ, Martínez-Romero D, Valero D and Serrano M, Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. *Postharvest Biol Technol* **42**:81–93 (2006).
 - 26 Beecher G, Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proc Soc Exp Biol Med* **218**:98–100 (1998).
 - 27 Ruiz JJ, Alonso A, García-Martínez S, Valero M, Blasco P and Ruiz-Bevia F, Quantitative analysis of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *J Sci Food Agric* **85**:54–60 (2005).
 - 28 Alonso A, García-Martínez S, Vázquez-Araujo L, Ruiz JJ and Carbonell-Barrachina AA, Comparative post-harvest behaviour of traditional and virus-resistant Muchamiel tomatoes. *J Sci Food Agric* **90**:1056–1062 (2010).
 - 29 Windham WR, Robertson JA and Leffler RG, A comparison among methods of moisture determination of forage for NIRS calibration and validation. *Crop Sci* **27**:777–783 (1987).
 - 30 Flores K, Sánchez MT, Pérez-Martín D, Guerrero JE and Garrido-Varo A, Feasibility in NIRS instruments for predicting internal quality in intact tomato. *J Food Eng* **91**:311–318 (2009).
 - 31 Fulton TM, Bucheli P, Voirol E, Lopez J, Petiard V and Tanksley SD, Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica* **127**:163–177 (2002).
 - 32 Causse M, Buret M, Robini Kand Verschave P, Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *J Food Sci* **68**:2342–2350 (2003).
 - 33 Tandon KS, Baldwin EA, Scott JW and Shewfelt RL, Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. *J Food Sci* **68**:2366–2371 (2003).



3.3.-Títulos de obtención vegetal

Registro de las variedades vegetales

3.3.1.-Variedad de tomate UMH 1200. Número título: 2618. Número registro:
20114962



MINISTERIO DE AGRICULTURA, 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

El Sr. Ministro de Agricultura, 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 7 de julio de 2013 hasta el día 31 de diciembre de 2038, el siguiente Título de Obtención Vegetal:

A : UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ
Nº de Título : 2618
Especie : TOMATE
Variedad : UMH 1200
Nº 20114962



Madrid 15 de julio de 2013.
SD. GRAL. MEDIOS PROD. AGRÍCOLAS Y
OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES,

Andrés de León
Andrés de León Llamazares.



Registro de las variedades vegetales

3.3.2.-Variedad de tomate UMH 1203. Número título: 2619. Número registro:
20114963



MINISTERIO DE AGRICULTURA, 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

El Sr. Ministro de Agricultura, 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 7 de julio de 2013 hasta el día 31 de diciembre de 2038, el siguiente Título de Obtención Vegetal:

A : UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ
Nº de Título : 2619
Especie : TOMATE
Variedad : UMH 1203
Nº 20114963



Madrid 15 de julio de 2013.
D. GRAL. MEDIOS PROD. AGRÍCOLAS Y
OFICINA ESPAÑOLA DE VARIEDADES VEGETALES,

Andrés de León Llamazares.

4. MATERIAL Y MÉTODOS



4.- MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto de la introducción de resistencia genética a virosis

Para conseguir las líneas de tomate “De la Pera” y “Muchamiel” que contengan todas las combinaciones de los genes de resistencia en homocigosis introducidos (*Tm-2a*, *Ty-1* y *Sw-5*), se autofecundaron dos plantas heterocigotas para los tres genes de resistencia derivadas del programa de mejora en marcha. Para seleccionar las plantas con todos los genotipos deseados se usaron marcadores CAPS (*To-3*, *Aps-F2* y *CT220*), ligados a los genes de resistencia, usados de forma rutinaria en el programa de mejora (Ruiz y García-Martínez, 2009). Se tardó 2 años en conseguir cantidad suficiente de semilla de todos los genotipos para realizar los ensayos previstos. Todas las líneas se evaluaron en diferentes campañas durante los años 2009 a 2013, en distintos sistemas de cultivo y localidades. Los ensayos dispusieron de varias repeticiones, de entre 6 a 15 plantas cultivadas verticalmente a un solo brazo, excepto en un ensayo, que fue injertado sobre el patrón comercial Beaufort y conducido a 2 brazos, en condiciones de producción intensiva según las prácticas culturales de la zona. Se estudiaron diferentes parámetros tanto agronómicos como de calidad. Para estudiar el efecto de las tres resistencias introducidas se realizó un análisis de la varianza multifactorial con 3 factores (cada uno de los genes de resistencia introducidos) y dos niveles cada uno (homocigoto resistente y homocigoto sensible). Para estudiar todos los ensayos se realizó una estandarización restando a cada valor el valor medio de cada ensayo y dividiéndolo por la desviación estándar de cada ensayo. De estos estudios fueron excluidos tres ensayos de ocho por una posible alteración de los resultados/ o falta de representatividad:

Líneas del programa de mejora enviadas al registro

Como ya se ha descrito en el apartado 1.3 (Programa de mejora) de la introducción, en 1998, se empezó en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) un programa de mejora para la introducción de genes de resistencia a las tres virosis más importantes que afectan al cultivo del tomate en el sureste español. Estas virosis son el virus del mosaico del tomate (ToMV), el virus del bronceado del tomate (TSWV) y el virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (TYLCV). El método elegido para la introducción simultánea para las tres resistencias fue un retorcruzamiento, usando marcadores moleculares para realizar la selección precoz en semillero y trasplantar los individuos que tienen los tres genes. Todo el proceso se



realizó en un invernadero, para tener un mayor control del proceso. Se obtenían dos ciclos de retrocruzamiento al año. En 2011 se iniciaron los trámites para la inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas de dos líneas de mejora de tomate de los tipos “Muchamiel” (UMH1200) y “De la Pera” (UMH1203), cuyos títulos de obtención vegetal fueron emitidos por la Oficina Española de Variedades Vegetales.

Análisis de la variabilidad del material vegetal

Se estudiaron 35 líneas de mejora y 7 variedades tradicionales de los tipos “Muchamiel”, “De la Pera”, “Cherry” y “De la pera moruno”, junto a un híbrido comercial. Se analizaron el contenido mineral (C, N, P, K, Ca, Na, Mn, Mg, Fe, Zn y Cu) mediante espectrofotometría U-UV y espectroscopía de emisión atómica de plasma, de acuerdo con los trabajos de Navarro *et al.* (1991) y Paredes *et al.* (1996). Previamente se realizó una mineralización de las muestras mediante una digestión nítrico-perclórica, según Abrisqueta y Romero (1969). Los análisis NIRS se hicieron usando un espectrofotómetro FT-NIR (MPA, Bruker Optik GmbH, Alemania) en el rango de número de onda de 12000 a 3800 cm^{-1} (830-2600 nm) con un paso de 8 cm^{-1} . Cada muestra fue escaneada tres veces usando el software Opus (versión 6.0, Bruker Optik), determinado la absorbancia como $\log(1/R)$, donde R es la reflectancia. Con los tres espectros de cada muestra se obtuvo un espectro promedio para cada una de ellas, para un total de 42 muestras de tomate, que se analizaron por triplicado mediante técnicas estandarizadas. Para ello se utilizaron muestras deshidratadas a 105°C, molidas y obtenidas a partir de 30 frutos recolectados en el estado de madurez comercial con al menos el 50% de la superficie de color rojo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la introducción de resistencia genética a virosis

La evaluación en distintas campañas y condiciones de cultivo de las dos colecciones de líneas que contienen todas las combinaciones posibles de los tres genes de resistencia a virosis introducidos en homocigosis, una del tipo “De la pera” y otra del “Muchamiel”, ha permitido estudiar el efecto de la introducción de dichas resistencias sobre algunos parámetros agronómicos y de calidad en tomate.

Analizando conjuntamente los tipos “De la pera” y “Muchamiel”, para el gen de resistencia a ToMV se han encontrado diferencias significativas entre los genotipos homocigotos resistentes y sensibles (RR y ss) en todos los caracteres estudiados, excepto para el peso medio del fruto. Los caracteres donde se observaron mayores diferencias entre los dos genotipos, a favor del RR, fueron la producción comercial, la producción total y el número de frutos recolectados por planta, con unos valores del 11,7%, 10,9% y 8,1%, respectivamente. La presencia de ToMV en algunas plantas sensibles pudo ser el responsable del descenso obtenido respecto a las plantas resistentes, que no fueron infectadas.

Para el gen de resistencia a TSWV se encontraron diferencias significativas en cinco de los ocho parámetros estudiados: número de inflorescencias con frutos, número de frutos recolectados, peso medio del fruto, contenido de sólidos solubles y acidez. En los dos primeros parámetros el genotipo RR superó al ss, mientras que en los tres restantes ocurrió lo contrario, fue el genotipo ss el que obtuvo mayor valor. El efecto de este gen de resistencia obtenido osciló entre el 3,2% y el -7,1%.

En todos los casos (usando los análisis individuales o agrupando por tipo varietal o analizando los ensayos conjuntamente) el fragmento que tuvo un mayor efecto fue el que confiere resistencia a TYLCV (mediante el gen *Ty-1*). Este fragmento afectó negativamente a todos los parámetros estudiados, excepto para sólidos solubles, y sus efectos fueron particularmente importantes en producción total y comercial alrededor del -50%. Esta reducción en producción agrícola debería ser aceptable con altos niveles de esta infección. Los otros fragmentos introducidos (*Tm-2a* y *Sw-5*) fueron menores y más aceptables, variando en función del ensayo y el parámetro estudiado.

Líneas del programa de mejora enviadas al registro

La línea de mejora UMH1200 es homocigota para los genes *Tm-2^a*, *Sw-5* y *Ty-1*, que confieren resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), al virus del bronceado del tomate (TSWV) y al virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara



(TYLCV), respectivamente. Estos virus se encuentran entre los más importantes que afectan al cultivo del tomate en el sureste de España. Esta línea, del tipo “Muchamiel”, se obtuvo por autofecundación de un triple heterocigoto, tras cinco retrocruces. Es una línea de crecimiento indeterminado, con densidad de hojas intermedia, y sus frutos maduros (de tamaño medio, con un peso comprendido entre 150 y 190 g) no se separan con facilidad del pedúnculo durante la recolección. La línea de mejora es similar a la accesión (M18) de la variedad tradicional de la que deriva, con la excepción del hombro del fruto, que es menos intenso. En el ensayo realizado en invernadero, no se encontraron diferencias significativas entre la línea de mejora UMH1200 y la accesión (M18) de la variedad tradicional para la producción comercial, el peso medio de los frutos, el número de frutos recolectados por planta y el contenido de sólidos solubles. Para la acidez sí que se obtuvo un ligero descenso. Sin embargo, en los ensayos realizados al aire libre, la línea de mejora sufrió un acusado descenso de producción, de más del 50% respecto a la accesión tradicional, y del peso medio del fruto, entre el 16 y el 34 %. En este caso no se encontraron diferencias para la acidez.

La línea de mejora UMH1203, del tipo varietal “De la pera”, cuenta con las mismas resistencias que la anterior, y también se obtuvo tras cinco retrocruces por autofecundación de un triple heterocigoto. Es una línea de crecimiento indeterminado, con densidad de hojas intermedia, y sus frutos maduros (con un peso comprendido entre 70 y 90 g) y sí se separan con facilidad del pedúnculo durante la recolección. Los frutos de la línea de mejora tienen un tamaño, forma (variando entre ovalada-alargada y piriforme) y características organolépticas similares a los de la accesión (P21) de la variedad tradicional, de la que deriva, aunque la intensidad del hombro verde frecuentemente es menor. La producción de la línea de mejora es similar a la de variedad tradicional en los ensayos realizados al aire libre. Sin embargo, en los ensayos realizados bajo invernadero se obtuvo un descenso de producción que osciló entre el 30 y el 50%. El peso medio de los frutos de la línea de mejora sólo fue distinto al de la variedad tradicional en uno de los cinco ensayos realizados, el de invernadero en 2010. Por lo que se refiere a la composición, sólo en el ensayo realizado al aire libre en 2011 la acidez de la línea de mejora fue distinta a la variedad tradicional a favor de la primera (0,45 g/100g frente a 0,34 g/100g), mientras que para el contenido de sólidos solubles en tres ensayos no se encontraron diferencias. En los dos ensayos en los que se encontraron, en 2009 la variedad tradicional superó a la línea de mejora, mientras que en 2010 ocurrió lo contrario. La introducción de la resistencia genética no ha tenido un gran efecto en las características organolépticas, ya que se detectaron diferencias significativas entre la línea de mejora UMH1203 y accesión (P21) para el aspecto externo, pero no para el sabor, la textura y la aceptabilidad general.



La incidencia de éstos virus reduce en gran medida los beneficios obtenidos por los agricultores e incluso hace que el cultivo de las variedades locales sean inviábiles en muchas zonas, especialmente al aire libre. A pesar de la reducción de la producción asociada con la introgresión de genes de resistencia, las líneas de mejora pueden ser adecuadas para su cultivo al aire libre, en donde la incidencia de virus es especialmente intensa, lo que permite a los agricultores obtener una cosecha aceptable. Estas líneas de mejora se pueden utilizar en programas para facilitar la introgresión de los genes de resistencia en otras variedades locales. También se pueden desarrollar híbridos F_1 cruzando con otras líneas “Muchamiel” y “De la Pera”, para aumentar la producción mediante el uso de los genes de resistencia genética en un estado heterocigótico. En julio de 2013 se consiguieron los títulos de obtención vegetal de las líneas de mejora de tomate UMH1200 y UMH1203.

Como alternativa para superar el descenso de producción obtenido en las líneas con resistencia en homocigosis a las tres virosis, se desarrollaron líneas con diferentes combinaciones de los genes de resistencia. Todas ellas tienen en común que no contienen el gen *Ty-1*, que confiere resistencia a TYLCV, que es el que parecía tener un mayor efecto negativo en los ensayos preliminares (Alonso *et al.*, 2008). En los últimos años, la incidencia de TYLCV en el ciclo de primavera-verano en el levante español ha sido menor, especialmente en cultivos protegidos bajo invernadero de plástico o malla, por lo que el cultivo de líneas sin resistencia a este virus puede ser viable. A finales de 2013 se solicitó la inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas de líneas de mejora “De la pera” y “Muchamiel” con resistencia a ToMV y/o TSWV. Para el tipo “De la pera” se desarrollaron las líneas UMH1415, con resistencia a ToMV y TSWV, y la UMH1422, resistente únicamente a ToMV, ambas tras nueve retrocruces. Como en los casos anteriores, ambas líneas tienen crecimiento indeterminado y una densidad de hojas intermedia. Los frutos de estas líneas tienen también un tamaño medio, entre 70 y 90 gramos, forma aplanada, hombro verde bastante intenso, y se separan con facilidad del pedúnculo durante la recolección. Además, su calidad organoléptica es similar a la de la variedad tradicional, como lo corrobora el hecho de que no se encontraran diferencias para el sabor, la textura y la aceptación global evaluados mediante análisis sensorial. La producción obtenida por estas líneas, comparada con la variedad tradicional, varía en función de las condiciones. Al aire libre no se encontraron diferencias, bajo invernadero produjeron más que la variedad tradicional, mientras que bajo malla la línea UMH1415 obtuvo una producción ligeramente inferior. La línea UMH1422 mostró mejores resultados en parámetros agronómicos que la variedad original P21. Sin embargo, la línea UMH 1415 mostró una producción similar o menor respecto la línea UMH1422, mientras que las diferencias con la tradicional P21 dependía del ensayo.



Análisis de la variabilidad del material vegetal

Se ha utilizado la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) para estimar el contenido mineral de 35 líneas de mejora y 7 variedades tradicionales de los tipos “Muchamiel”, “De la Pera”, “Cherry” y “De la pera moruno”, junto a un híbrido comercial, en las últimas etapas del programa de mejora. Se observaron variaciones significativas en los parámetros de calidad (contenido de sólidos solubles y acidez) y contenido mineral (C, N, P, K, Ca, Na, Mn, Mg, Fe, Zn y Cu), lo que sugiere que hay niveles considerables de diversidad genética entre los tipos de cultivo estudiados. Los resultados mostraron que el uso de la técnica NIRS en muestras secas de tomate constituye una técnica viable para estimar el contenido de C, N, P, K, Ca, Na, Mn, Mg y Cu, ya que el coeficiente de determinación de los valores de calibración (R^2) obtenido, utilizando la regresión de mínimos cuadrados parciales, fue superior a 0,90. Podemos destacar que los valores obtenidos para C, N, P, Ca, Na y Mn son superiores a 0,95. Nuestros resultados sugirieron que la técnica NIRS también podría ser utilizada en la selección de líneas durante un programa de mejora, un objetivo que se intentará abordar en el futuro. La estimación de la cantidad de sólidos solubles y la acidez obtenida a partir de muestras secas de tomate puede ser útil sólo para cribado o selección preliminar, ya que los coeficientes de determinación de los valores de calibración (R^2) obtenidos han sido de 0,616 y 0,483, respectivamente. Sería interesante poner a punto el análisis NIRS usando muestras frescas y frutos intactos para la estimación de la cantidad de sólidos solubles y acidez. Si se consigue estimar con buena precisión (coeficientes de determinación altos) dichos parámetros en frutos intactos, se evitaría el procesado de las muestras en laboratorio. Este hecho sería muy interesante, pues reduciría la carga de trabajo en el periodo de recolección de los frutos, que es una de las épocas más críticas del ciclo de cultivo, debido a su elevada carga de trabajo.

6. CONCLUSIONES



6.-CONCLUSIONES

Según lo establecido en la norma de doctorado de la Universidad Miguel Hernández para la defensa de una tesis doctoral con mención internacional es necesario: "Que parte de la tesis doctoral, al menos el resumen y las conclusiones, se haya redactado y sea presentado en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en su campo de conocimiento, distinta a cualquier de las lenguas oficiales en España." En este caso se ha escogido la lengua inglesa.

CONCLUSIONS

Effect of the introgression virus resistance genes

In all cases, whether using individual analysis, grouping by varietal type or analyzing all the trials jointly, the fragment that had a greater effect was that containing the *Ty-1* gene, which conferred resistance to TYLCV. This fragment affected negatively all studied parameters, except for SSC, and its effects were particularly important in total and commercial yields (around -50%). This reduction in agricultural yield would only be acceptable with high levels of virus infection. The effect of the others introduced fragments (*Tm-2a* and *Sw-5*) were lower and more variable, increasing or decreasing according to the trial and the studied parameters. These results may be due to the introgressed genes themselves or associated genes via linkage drag.

Plant variety right titles for the breeding lines

UMH1200 is homozygous for the *Tm-2a*, *Sw-5*, and *Ty-1* genes conferring resistance to *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), and *Tomato yellow curl virus* (TYLCV), respectively. The breeding line was similar to cultivar M18. However, the green shoulders of UMH1200 fruits were frequently less intense than those of the original landrace fruits. In trials carried out in greenhouse no significant differences in yield were found between the breeding line and cultivar M18. However, there was a substantial drop in yield (around 50%) in UMH1200 in the open field crops.

"De la pera" breeding line UMH1203 has been developed following the same breeding scheme as that used for UMH1200. Breeding line had fruit morphological characteristics, yield and uniformity similar to cultivar P21. No significant differences in yield were found between UMH1203 and P21 in the open-field crop trials. However, UMH 1203 showed a very important yield decrease in greenhouse trials, ranging



between 30 and 50 %. Introgression of resistance genes had not severely affected organoleptic parameters. Significant differences between the breeding line UMH1203 and line P21 were detected for external appearance, but not for flavor, texture, and overall acceptability.

Plant variety right titles for both breeding lines with the three resistance genes were obtained in July 2013. We are also developing F1 hybrids by crossing UMH1200 and UMH1203 with other selected “Muchamiel” and “De la Pera” lines to increase yield by using the genetic resistance in a heterozygous state.

As an alternative to overcome the yield decreases observed in the breeding lines with the three resistance genes in homozygous state, breeding lines without *Ty-1* gene (which confers resistance to TYLCV and had the greater negative effect in previous essays) were developed. Procedures for inclusion in Plant variety right titles for “De la pera” and “Muchamiel” breeding lines with ToMV and/or TSWV resistance genes were initiated in 2013. The “De la pera” breeding line UMH1415 was developed with resistant genes to ToMV and TSWV, while breeding line UMH1422 was only resistant to ToMV, after nine backcrossing generations. Both lines had bell shape, medium-sized fruits (70 to 90 g), with green shoulders and similar organoleptic characteristics to those of the original landrace. The yields obtained by the breeding lines were similar to the original landrace in several trials. Results of sensory analysis indicated similar organoleptic values of the breeding lines and the traditional cultivar.

Variability analysis of plant material

We have used NIRS technology in order to estimate mineral content of our breeding lines at the end of the breeding cycle. Significant variations were observed in quality parameters and mineral content. The results showed that using NIRS on dry samples of tomato constitutes a feasible technique to estimate C, N, P, K, Ca, Na, Mn, Mg and Cu contents, using partial least squares regression, with a coefficient of determination for calibration values (R^2) higher than 0,90. Estimation of SSC and TA obtained using dry samples of tomato may be useful only for screening purposes. More research must be done on NIRS analysis using dry samples, fresh samples and intact tomatoes, in order to improve the estimation of SSC and TA, before using this technology in the breeding program selection.



CONCLUSIONES

Efecto de la introducción de resistencia genética a virosis

En todos los casos usando análisis individuales o agrupando por tipo varietal o analizando los ensayos conjuntamente, el fragmento que tuvo un mayor efecto fue el que contenía el gen *Ty-1*, el cual confiere resistencia a TYLCV. Este fragmento afectó negativamente a todos los parámetros estudiados, excepto para sólidos solubles, y sus efectos fueron particularmente importantes en producción total y comercial alrededor del -50%. Esta reducción en producción agrícola debería ser aceptable con altos niveles de esta infección. Los otros fragmentos introducidos (*Tm-2a* y *Sw-5*) fueron menores y más aceptables, respecto al ensayo y el parámetro estudiado. Estos resultados pueden ser debidos a los genes introducidos o a la carga de ligamiento asociado a los genes.

Líneas del programa de mejora enviadas al registro

La línea de mejora UMH1200 es homocigota para los genes *Tm-2^a*, *Sw-5* y *Ty-1*, que confieren resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), al virus del bronceado del tomate (TSWV) y al virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (TYLCV), respectivamente. La línea de mejora es similar a la accesión (M18) de la variedad tradicional de la que deriva, con la excepción del hombro del fruto, que es menos intenso. En el ensayo realizado en invernadero, no se encontraron diferencias significativas entre la línea de mejora UMH1200 y la accesión (M18) de la variedad tradicional. Sin embargo, en el ensayo realizado al aire libre, la línea de mejora sufrió un acusado descenso de producción, de más del 50% respecto a la accesión tradicional. Esta línea tiene tolerancia/resistencia genética a los tres virus más importantes del tomate en el sureste de España.

La línea de mejora UMH1203, del tipo varietal "De la pera", cuenta con las mismas resistencias que la anterior, y fue obtenida siguiendo el mismo esquema. La línea de mejora tiene un tamaño, forma y características organolépticas similares a la accesión (P21) de la variedad tradicional, de la que deriva. La producción de la línea de mejora es similar a la de variedad tradicional en los ensayos al aire realizados. Sin embargo, en los ensayos realizados bajo invernadero se obtuvo un descenso de producción que osciló entre el 30 y el 50%. La introducción de la resistencia genética no ha tenido un gran efecto en las características organolépticas, ya que se detectaron diferencias significativas entre la línea de mejora UMH1203 y accesión (P21) para el aspecto externo, pero no para el sabor, la textura y la aceptabilidad general.



En julio de 2013 se consiguieron los títulos de obtención vegetal de las líneas de mejora de tomate UMH1200 y UMH1203. También se pueden desarrollar híbridos F1 cruzando UMH1200 y UMH1203 con otras líneas “Muchamiel” y “De la Pera”, respectivamente, para aumentar la producción mediante el uso de los genes de resistencia genética en un estado heterocigótico.

Como alternativa para superar el descenso de producción obtenido en las líneas con resistencia en homocigosis a las tres virosis, se desarrollaron líneas con diferentes combinaciones de resistencias. Todas ellas tienen en común que no contienen el gen *Ty-1*, que confiere resistencia a TYLCV, que es el que parecía tener un mayor efecto negativo en los ensayos preliminares. A finales de 2013 se solicitó la inscripción en los Registros de Variedades Comerciales y Protegidas de líneas de mejora “De la pera” y “Muchamiel” con resistencia a ToMV y/o TSWV. Para el tipo “De la pera” se desarrollaron las líneas UMH1415, con resistencia a ToMV y TSWV, y la UMH1422, resistente únicamente a ToMV, ambas tras nueve retrocruces. Los frutos de estas líneas tienen también un tamaño medio, entre 70 y 90 gramos, forma aplanada y hombro verde bastante intenso, además su calidad organoléptica es similar a la de la variedad tradicional. La producción obtenida por estas líneas, comparada con la variedad tradicional, varía en función de las condiciones. Los resultados del análisis sensorial indicaron unas valoraciones similares entre las líneas de mejora y la variedad tradicional.

Análisis de la variabilidad del material vegetal

Se ha utilizado la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) para estimar el contenido mineral de nuestras líneas de mejora al final del ciclo del programa de mejora. No se observaron variaciones significativas en los parámetros de calidad y contenido mineral. Los resultados mostraron que el uso de NIRS en muestras secas de tomate constituye una técnica viable para estimar el contenido de C, N, P, K, Ca, Na, Mn, Mg y Cu, ya que el coeficiente de determinación de los valores de calibración (R^2) obtenido, utilizando la regresión de mínimos cuadrados parciales, fue superior a 0,90. Nuestros resultados sugirieron que la técnica NIRS también podría ser utilizada en la selección de líneas durante un programa de mejora, un objetivo que se intentará abordar en el futuro. La estimación de la cantidad de sólidos solubles y la acidez obtenida a partir de muestras secas de tomate puede ser útil sólo para cribado o selección preliminar. Sería interesante continuar el análisis NIRS usando muestras frescas y frutos intactos, con el fin de mejorar la estimación de la cantidad de sólidos solubles y acidez, antes de utilizar esta técnica en la selección dentro del programa de mejora.

7. BIBLIOGRAFÍA



7.- BIBLIOGRAFÍA

- Abrisqueta, C., Romero, M. (1969) Digestion húmeda rápida de suelos y materiales orgánicos. *Anal. Edafol. Agrobiol.*, **27**, pp. 855–867.
- Adalid, A.M.; Roselló, S. and Nuez, F. (2008). Evaluation of main functional constituents of tomato fruits in *Solanum lycopersicon* germplasm. Modern variety breeding for present and future needs. *18th Eucarpia General Congress. Valencia*.
- Almarcha, O. (2012). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en línea de mejora de tomate "Muchamiel" (*S. lycopersicum*) cultivadas en invernadero. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.
- Alonso, A. (1998) Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "Muchamiel". Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.
- Alonso, A., García-Martínez, S., Arroyo, A., García-Gusano, M., Grau, A., Giménez-Ros, M., Romano, M.E., Valero, M., Ruiz, J.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.
- Alvarez, A.E., Van de Wiwl, C.C.M., Smulders, M.J.M., and Vosman, B. (2001). Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical & Applied Genetics* **103**: 1283-1292.
- Bai, Y. and Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* **100**: 1085-1094.
- Barrantes, W. (2014). Desarrollo de una genoteca de líneas de introgresión entre *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* utilizando herramientas genómicas de alto rendimiento y detección de QTLs simplificados en calidad de fruto. Tesis doctoral en Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universidad Politécnica de Valencia.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M.J. and Nuez F (2012) Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLoS ONE* **7**(10):e48198.doi:10.1371/journal.pone.0048198.



- Blas, A.L., Yu, Q., Veatch, O.J., Paull, R.E., Moore, P.H., Ming, R. (2012). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. *Molecular Breeding* **29**, 457-466.
- Brown JKM, Yield penalties of disease resistance in crops. *Curr Opin Plant Biol* **5**:339-344 (2002).
- 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 & Applied Genetics* **108**: 628–638.
- Brugarolas, M., Martínez-Carrasco, L., Martínez-Poveda, A. and Ruiz, J.J. (2009). A competitive strategy for vegetable products: traditional varieties of tomato in the local market. *Spanish Journal of Agricultural Research* **7**(2), 294-304.
- Capel, J., Santalla, M., Ferreira, J.J., de Ron, A.M. y Lozano, R. (2000). Selección asistida por marcadores moleculares en la Mejora Vegetal. Nuez, F. y Carrillo, J.M. (Eds). Editorial de la UPV.
- Cebolla, J. y Nuez, F. (2005). Mejora genética de variedades tradicionales de tomate: un paso hacia la recuperación de su cultivo. *Actas Portuguesas de Horticultura* **4**: 62-68.
- Chacón, B. (2011). Efecto de la intruducción de genes de resistencia genética a virosis “De la Pera”. Trabajo Final de Carrera. UMH.
- Cooper, D.; Vellveé, R. and Hobbelink, H. (1992). Growing diversity. Genetic resources and local food security. Intermediate Technology Publications. London.
- Cooper, D.; Engels, J. and Frison, E. (1994). A multilateral system for plant genetic resources: imperatives, achievements and challenges. Issues in genetic resources 2. International Plant Genetic Resources Institute. Rome
- Corrado, G., Piffanelli, P., Caramante, M., Coppola, M. Rao, R. (2013). SNP genotyping reveals genetic diversity between cultivated landraces and contemporary varieties of tomato. *BMC Genomics* **14**: 835.
- Costa, J.M. and Heuvelink, E. (2005). Introduction: the tomato crop and industry. EN: Heuvelink, E. (Ed.) Tomatoes. CAB International Publishing, New York. pp: 1-21.
- Coves, C. (2010). Puesta a punto de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a virosis y caracterización agronómica en líneas de mejora de tomate “De la pera”. Trabajo final de carrera. Universidad Miguel Hernández.



- Cuartero, J. (2001). Tomate para consumo en fresco. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Mundi Prensa.
- Ercolano, M.R., Carli, P., Soria, A., Cascone, A., Fogliano, V., Frusciante, L., Barone, A. 2008. Biochemical, sensorial and genomic profiling of traditional Italian tomato varieties. *Euphytica*. **164**(2): 571-582.
- Esquinas-Alcázar, J.T. (1993). Plant Genetic Resources. En: Hayward, M.D., Bosermark, N.O., Romagosa, I. (Eds.) *Plant Breeding: Principles and prospects*. Chapman & Hall.
- Esquinas-Alcázar, J. y Nuez, F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: *El cultivo del tomate*. Nuez, F. (Ed). Mundi-Prensa. Madrid.
- FAO (2015). Anuario estadístico de la Organización para la Alimentación y Agricultura. www.fao.org.
- Frankel, O.H. and Hawkes, J.G. (Eds). (1975). *Crop Genetics Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press.
- Frary A., Xu, Y., Liu, J., Mitchell, S., Tedeschi, E., Tanksley, S. (2005). Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. Springer-Verlag.
- Francis, D.M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., St. Clair, D. (2001) Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* **85**:1171-1176
- Gao, Z. and van de Weg, W. (2006). The Vf gene for scab resistance in apple is linked to sub-lethal genes. *Euphytica* **151**: 123–132
- García-Martínez, S. (1998). Caracterización de variedades tradicionales de tomate tipo "De la pera". Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.
- García-Martínez, S. (2006). Mejora genética de variedades tradicionales del sureste Español. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- García-García, P., Nuez, F., Carrillo, J.M. y Pérez de la Vega, M. (2004). Herramientas biotecnológicas y uso de recursos fitogenéticos. En *Resistencia genética a patógenos vegetales*. (Eds). Editorial de la UPV.
- Gardner, R.G., Panthee, D.R. (2012). Tomato Spotted Wilt Virus-resistant Fresh-market Tomato Breeding Lines: NC58S, NC123S, NC127S, and NC132S. *Hortscience* **47**(4):531-532.



- Garland, S., Sharman, M., Persley, D. and McGrath, D. (2005). The development of an improved PCR-based marker system for Sw-5, an important TSWV resistance gene of tomato. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**: 285-289.
- Gonzalo, M.J., van der Knaap, E. (2008). A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 647-656.
- Gonzalo, M.J., Brewer, M.T., Anderson, C., Sullivan, D., Gray, S., van der Knaap, E. (2009). Tomato fruit shape analysis using morphometric and morphology attributes implemented in Tomato Analyzer Software Program. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **134** (1): 77-87
- Guzmán, G.; González de Molina, M. y Sevilla, E. (2000). Introducción a la agroecología como desarrollo rural sostenible. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Hajjar, R., Hodgkin, T. 2007. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, **156**: 1-13.
- INE (2015). Censo agrario del instituto Nacional de Estadística. www.ine.es
- IPGRI (1996). Descriptores para el tomate (*Lycopersicon spp.*). International Plant Genetic Resources Institute. Roma
- Joseph, M., Gopalakrishnan, S., Sharma, R.K., Singh, V.P., Singh, A.K., Singh, N.K. and Mohapatra, T. (2004). Combining bacterial blight resistance and Basmati characteristics by phenotypic and molecular marker-assisted selection in rice. *Molecular Breeding* **13** (4): 377-387.
- Jover, M. (2012). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate "Muchamiel", cultivadas al aire libre durante el ciclo primavera-verano 2011. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.
- Kimura, S. and Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. Cold Spring Harbor Protocols 105.
- Langella, R., Ercolano, M.R., Monti, L.M., Frusciante, L. and Barone, A. (2004). Molecular marker assisted transfer to resistance to TSWV in tomato elite lines. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **79** (5): 806-810.
- Lecoals, A.C., Bergougnoux, V., Rubio-Cabetas, M.J., Bosselut, N., Voisin, R., Poessel, J.L., Faurobert, M., Bounet, A., Salesses, G., Dirlwanger, E. and Esmenjaud, D. (2004). Marker-assisted selection for the wide-spectrum



- resistance to root-knot nematodes conferred by the *Ma* gene from Myrobalan plum (*Prunus cerasifera*) in interspecific *Prunus* material. *Molecular Breeding* **13**: 113-124.
- Lewis RS, Linger LR, Wolff M.F and Wernsman EA. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theor Appl Genet* **115**, 169-178 (2007).
- Linneo, C. (1753). *Species Plantarum*. Ed. 1. Stockholmiae.
- MAGRAMA (2015). Anuario estadístico del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. www.magrama.gob.es
- Martín, A. (2002). Los marcadores genéticos en la Mejora Vegetal. En: *Genómica y Mejora Vegetal*. Nuez, F., Carrillo, J.M. y Lozano, R. (Eds). Mundi-Prensa.
- Masuelli, R.W., Cuesta, G. and Piccolo, R. (2000). A multiplex PCR reaction for the screening of the nematode resistance gene *Mi*, and the tomato spotted wilt virus resistant gene *Sw-5* in tomato. *Journal of Genetics & Breeding* **54**: 233-235.
- Mazzucato, A., Ficcadenti, N., Caioni, M., Mosconi, P., Piccini, E., Sanampudi, V.R.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**: 55-62.
- Navarro, A.F., Cegarra, J., Roig, A. and Bernal, M.P., An automatic microanalysis method for the determination of organic carbon in wastes. *Commun Soil Sci Plant Anal* **22**:2137–2144 (1991).
- Nuez, F., Carrillo, J.M. y Pérez de la Vega, M. (2004). La resistencia genética a patógenos vegetales y la mejora vegetal. En: *Resistencia genética a patógenos vegetales*. Nuez, F., Carrillo, J.M. y Pérez de la Vega, M. (Eds). Editorial de la UPV.
- Nuez, F., Roselló, S. y Picó, B. (1998). La conservación y recuperación de nuestro patrimonio hortícola. *Mejorar para conservar. Agrícola Vergel* **194**: 74-80.
- Nuez, F. y Ruiz, J.J. (1999). *La Biodiversidad Agrícola Valenciana: estrategias para su conservación y utilización*. Editorial de la UPV.
- Paran I y van der Knaap E (2007) Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *J of Experimental botany* (**58**): 3841-3852.



- Paredes, C., Bernal, M.P., Roig, A., Cegarra, J. and Sánchez-Monedero, M.A., Influence of the bulking agent on the degradation of olive-mill wastewater sludge during composting. *Int Biodeterior Biodegrad* **38**:205–210 (1996).
- Park, Y.H., West, M.A.L, and St. Clair, D.A. (2004). Evaluation of AFLPs for germplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Genome* **47**: 510–518.
- Peralta, I.E., Knapp, S. and Spooner, D.M. (2005). New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon* : Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* **30**: 424-434.
- Pérez de Castro, A.; Blanca, J. M.; Diez, M. J. and Nuez, F. (2007). Identification of a CAPS marker tightly linked to the tomato yellow leaf curl disease resistance gene Ty-1 in tomato. *European Journal of Plant Pathology* **117** (4): 347-356.
- Prohens, J. y Nuez, F. (2008) Vegetables II. Handbook of plant breeding. Springer (ed). pp 249-326
- Plazas, M. Vilanova, S., Hurtado, M., Gramazio, P., Andújar, I., Herraiz, F. J., Prohens, J. (2013). Evaluation of Fruit Shape Variations in Spanish Eggplants using an Image Analysis Software. *Tropical Agricultural Research* **25** (1): 38 – 45
- Ragoussis, J. (2009). Genotyping technologies for genetic research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (**10**): 117-133.
- Rick, C.M. 1986. Germplasm resources in the wild tomato species. *Acta Horticulturae*. ISHS. **190**: 39-48.
- Robert, V.J.M., West, M.A.L., Inai, S., Caines, A., Arntzen, L., Smith, J.K. and St. Clair, D.A. 2001. Marker-assisted introgression of blackmold resistance QTL alleles from wild *Lycopersicon cheesmanii* to cultivated tomato (*L. esculentum*) and evaluation of QTL phenotypic effects. *Molecular Breeding* **8**: 217-233.
- Robertson, L.D., Labate, J.A. 2007. Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives. A: Razdan MK i Mattoo AK eds. Genetic Improvement of Solanaceous Crops. Volume 2: Tomato. New Hampshire: Science Publishers.
- Rodriguez GR, Munoz S, Anderson C, Sim SC, Michael A, Causse M, Gardener M, Francis D, van der Knaap E (2011). Distribution of SUN, OVATE, LC and FAS in the Tomato Germplasm and the Relationship to Fruit Shape Diversity. *Plant Physiol* **156**: 275-285.



- Rubio, F. (2011). Análisis sensorial de tomates “Muchamiel” en cultivo ecológico. Trabajo Final de Master. Universidad Miguel Hernández.
- Rubio, F., García-Martínez, S., Alonso A., Corrado, G., Rao, R., Coppola, V., Ruiz, J.J. (2013). Expresión cuantitativa de genes relacionados con la ruta biosintética de carotenoides en líneas de mejora de tomate resistente a virosis. VII Congreso Ibérico de agroingeniería y ciencias hortícolas. Póster Madrid.
- Rosa, A. (2013). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate De la Pera cultivadas bajo malla. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.
- Ruiz, F. (2011) Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate “De la Pera”. Trabajo Final de Carrera. UMH
- Ruiz, J.J., Martínez, N., Valero, M., García-Martínez, S., Moral, R., and Serrano, M. (2005a). Micronutrient Composition and Quality Characteristics of Traditional Tomato Cultivars in the South-East of Spain. *Communications in Soil Sciences and Plant Analysis*. **36**: 1-3.
- Ruiz, J.J., Alonso, A., García-Martínez, S., Valero, M., Blasco, P., and Ruiz-Beviá, F. (2005b). Quantitative analysis of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 54-60.
- Ruiz JJ and 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. (2009). *Biodiversity Technical Bulletin n° 15*, ed. by Vetelainen M, Negri V and Maxted N. Rome, pp. 171-176
- Ruiz, J.J., Valero, M., García-Martínez, S., Serrano, M., and Moral, R. (2006). Effect of recent genetic improvement on some analytical parameters of tomato fruit quality. *Communications in Soil Sciences and Plant Analysis* (en prensa).
- Sánchez, E. (2013). Efecto sobre algunas propiedades funcionales de la introducción de genes de resistencia a virosis en líneas de mejora de tomate Muchamiel. *Solanum lycopersicum* L. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.
- Saha, S.; Hedau, N.K.; Mahajan, V.; Singh, G.; Gupta, H.S. and Gahalain, A. (2009). Textural, nutritional and functional attributes in tomato genotypes for breeding better quality varieties. *Journal of Food and Agriculture* 2010, **90**: 239 - 244.



- Scarano, D., Rubio, F., Ruiz, J.J., Rao, R., Corrado, G. (2014). Morphological and genetic diversity among and within common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the Campania region (Southern Italy). *Scientia horticultrae*: **180**: 72-78.
- Sim, S.C., Robbins, M.D., Chilcott, C., Zhu, T. and Francis, D.M. (2009) Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of SNP variation associated with breeding. *BMC Genomics* **10**: 466.
- Sim S-C, Van Deynze A, Stoffel K, Douches DS, Zarka D, et al. (2012). High-Density SNP Genotyping of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Reveals Patterns of Genetic Variation Due to Breeding. *Public Library of Science ONE* **7(9)**: e45520. doi:10.1371/journal.pone.0045520.
- Skupinova, S., Vejl, P., Sedlak, P., Bardova, M., Srbek, L., Klapste, P., Zouhar, M. and Tesarova, B. (2004). Using DNA markers for characterization of tomato resistance against root nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant, Soil and Environment* **50** (2): 59-64.
- Smulders, M.J.M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P., and Vosman, B. (1997). Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical & Applied Genetics* **97**: 264-272.
- Tam, S.M., Mhiri, C., Vogelaar, A., Kerkveld, M., Pearce, S. R., and Grandbastien, M.L. 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical & Applied Genetics* **110**: 819–831.
- Tanksley SD, Bernachi D, BeckBunn T, Emmatty D, Eshed Y, Inai S, Lopez J, Petiard V, Sayama H, Uhlig J and Zamir D. 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 (1998).
- Tanhuanpää, P. and Vilkki, J. (1999). Marker-assisted selection for oleic acid content in spring turnip rape. *Plant Breeding* **118**: 568-570.
- Teruel, C. (2012). Efecto de la introducción de genes de resistencia genética a virosis en líneas de mejora de tomate “Muchamiel”, injertadas sobre el patrón Beaufort y cultivadas al aire libre. Trabajo Final de Carrera. Universidad Miguel Hernández.



Valcarcel, M. (2009). Optimización del proceso de evaluación y selección del germoplasma de tomate por características de calidad organoléptica: uso de tecnología NIR y sensores electrónicos. Tesis doctoral. UPV. Valencia.

Verlaan MG, Szinay D, Hutton SF, de Jong H, Kormelink R, Visser GF, Scott JW, Bai Y. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *Plant J* 1093–1103 (2011).

Yousef, G.G. and Juvik, J.A. (2001). Comparison of Phenotypic and Marker-Assisted Selection for Quantitative Traits in Sweet Corn. *Crop Science* **41**: 645-655.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el MCINN, mediante los proyectos de referencia AGL2008-03822, AGL2011-26957 y IT2009-0005. Durante la realización de la misma he disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación.